



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA AQUÁTICA EM RIOS E LAGOS DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

Danyelle Toyama

São Carlos - SP
2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA AQUÁTICA EM RIOS E LAGOS DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Danyelle Toyama

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique- Silva

São Carlos - SP
2011

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

T756ad Toyama, Danyelle.
Análise da diversidade microbiana aquática em rios e lagos da região amazônica / Danyelle Toyama. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
158 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Genética. 2. *Actinobacteria*. 3. Amazônia. 4. *Betaproteobacteria*. 5. *Crenarchaeota*. 6. *Polynucleobacter*.
I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA AQUÁTICA EM
RIOS E LAGOS DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação de Mestrado de **DANYELLE TOYAMA**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva



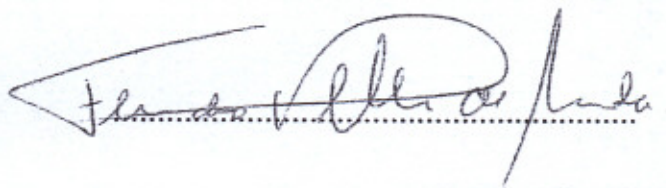
.....

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann



.....

Prof. Dr. Fernando Pellon de Miranda



.....

*"O segredo da felicidade consiste não em fazer o que se gosta,
mas em gostar do que se faz".*

(James M. Barrie)

Dedicatória

*Dedico este trabalho ao meu pai Celso Toyama,
por todo apoio e esforço para que eu chegasse até aqui.*

*Dedico ao meu avô Casimiro Toyama (in memoriam),
pelo apoio e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar os meus passos e me dar forças para seguir em frente.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique-Silva pela orientação, oportunidade, por todo aprendizado adquirido ao longo destes anos, que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Aos meus pais e à minha irmã por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando ao longo desta jornada.

À minha avó Cecília, minha tia Maria e à minha prima Julia pelo apoio, dicas e sugestões para que eu melhore cada vez mais.

Ao meu namorado Paulo Ricardo pelo apoio, paciência e ajuda com a elaboração das figuras e gráficos.

À Profa. Dra. Andréa Soares da Costa Fuentes pelos ensinamentos e sugestões.

À minha grande amiga Mariana Ferri pelo apoio, sugestões e correções, que muito contribuíram para o meu trabalho.

À minha grande amiga e companheira de laboratório Adelita pelas risadas, pelo apoio e pelos momentos difíceis e divertidos que passamos.

À Francine pela construção das árvores filogenéticas, correções e sugestões.

Ao Wilson que muito me ensinou e por ter sido um dos responsáveis pelo início da minha carreira no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Lígia, Augusto, Daniela Néó, Danilo, Darlan, Fernando, Gabriel, Kesser, Letícia, Lucas, Mariana, Natália, Priscila, Rafael, Wesley, pelas risadas, por todos os momentos que passamos, pelo apoio, sugestões e por me aguentar todos esses anos.

Ao Fernando Pellon de Miranda e à Petrobras pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

À Raquel Rinke pelo desenvolvimento inicial do projeto e pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, da Universidade Federal de São Carlos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos meus grandes amigos que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada.

RESUMO

A Região Amazônica apresenta a maior bacia hidrográfica do planeta, a do rio Amazonas, e também a maior floresta tropical do mundo. Além disso, apresenta uma grande diversidade biológica, tanto relacionada à fauna e flora, quanto microbiológica. Os micro-organismos são responsáveis pela maioria dos ciclos biogeoquímicos que moldam o ambiente terrestre e os ecossistemas de água doce e marinhos, e podem ser amplamente explorados biotecnologicamente. Estima-se que menos de 1% de todas as espécies bacterianas seja conhecida, devido à incapacidade de simulação do ambiente em que vivem. Contudo, novas técnicas têm possibilitado o estudo desses micro-organismos. Através do Metagenoma é possível estudar amostras ambientais complexas sem a necessidade de isolamento e cultivo individual desses organismos. Para tanto, utiliza-se, em bactérias e arqueias, o DNA ribossomal 16S (16S rDNA), para fins de estudos de filogenia e diversidade. Esta sequência é utilizada por se ter mantido bastante conservada durante os processos de evolução biológica, podendo servir como um indicador de como os organismos estão intimamente relacionados. Para estes estudos, esta região foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e clonada em vetores através da tecnologia do DNA recombinante, possibilitando, assim, a construção de bibliotecas de 16S rRNA. Estas bibliotecas foram então sequenciadas e os micro-organismos identificados por comparação com bancos de dados. Neste trabalho foi utilizado DNA extraído de filtrados de água do Rio Solimões, além de outros rios e lagos adjacentes, para construção de bibliotecas, com a finalidade de estudar a biodiversidade por meio de análise do 16S rRNA. Em todas as bibliotecas o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante, e a maioria dos gêneros observados pertence à classe *Betaproteobacteria*. Os *taxa* cosmopolitas de água doce *Candidatus Planktophila limnetica* e *Polynucleobacter* foram observados, assim como os produtores primários foram representados pelos gêneros *Synechococcus* e *Cyanobium*. Nas amostras em que a construção das bibliotecas de 16S rRNA foi possível para *Archaea*, obteve-se o filo *Crenarchaeota* como o mais abundante em todas as bibliotecas.

Palavras chave: *Actinobacteria*; Amazônia; *Betaproteobacteria*; *Crenarchaeota*; *Polynucleobacter*; Rio Solimões.

ABSTRACT

The Amazon region has the largest hydrographic basin on the planet, the one that includes Amazon River, and it also has the largest rainforest in the world. Moreover, it presents a great biological diversity, both related to the fauna and flora, and microbiological. Microorganisms are responsible for most biogeochemical cycles that shape the terrestrial environment and the freshwater and marine ecosystems, and they can be widely exploited biotechnologically. It is estimated that less than 1% of all bacterial species is known due to our inability to simulate the environment in which they live. However, new techniques have allowed the study of these microorganisms. Through Metagenomics it is possible to study complex environmental samples without the need for isolation and individual cultivation of these organisms. For this purpose, the 16S ribosomal DNA (16S rDNA) is used in bacteria and archaea in order to study phylogeny and diversity. This sequence is used because it has been fairly maintained during the processes of biological evolution and it may serve as an indicator of how organisms are closely related. For these studies, this region was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and cloned into vectors through the recombinant DNA technology, thus enabling the construction of 16S rRNA libraries. These libraries were then sequenced and the microorganisms were identified by comparison with databases. In this study it was used DNA extracted from Solimões River filtered water, in addition to water from other rivers and adjacent lakes, to the construction of libraries, in order to study the biodiversity through 16S rRNA analysis. In all libraries, phylum *Proteobacteria* was the most abundant, and most of the genera observed belong to the *Betaproteobacteria* class. The freshwater cosmopolitan taxa *Candidatus Planktophilia limnetica* and *Polynucleobacter* were observed, as well as primary producers were represented by the genera *Synechococcus* and *Cyanobium*. Samples in which the construction of 16S rRNA libraries was possible for *Archaea*, the phylum *Crenarchaeota* was the most abundant in all libraries.

Keywords: *Actinobacteria*; Amazonia; *Betaproteobacteria*; *Crenarchaeota*; *Polynucleobacter*; Solimões River.

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo da estrutura secundária do 16S rRNA.....	25
Figura 2 - Pontos de coleta das amostras de água para realização dos estudos de biodiversidade microbiana.....	30
Figura 3 - Mapa do Vetor pTZ57 R/T.....	35
Figura 4 - Exemplos de amplificação do 16S rRNA bacteriano de DNA extraído de filtrados de diferentes pontos de coleta.....	40
Figura 5 - Identificação das sequências em todos os conjuntos de dados.....	42
Figura 6 - Classificação das bactérias em nível taxonômico superior de todas as amostras de rios.....	45
Figura 7 - Classificação das bactérias em nível taxonômico superior de todas as amostras de lagos.....	47
Figura 8 - Diversidade microbiana ao longo do Rio Solimões, Rio Urucu e Rio Purus.....	49
Figura 9 - Diversidade microbiana nos lagos adjacente ao Rio Solimões.....	50
Figura 10 - Diversidade microbiana nas amostras de rios.....	51
Figura 11 - Diversidade microbiana nas amostras de lagos.....	53
Figura 12 - Abundância dos organismos nas amostras de rios e lagos.....	55
Figura 13 - Abundância do gênero <i>Polynucleobacter</i> nas amostras de rios.....	56
Figura 14 - Abundância do gênero <i>Polynucleobacter</i> nas amostras de lagos.....	56
Figura 15 - Representatividade do gênero <i>Polynucleobacter</i> nas amostras de rios e lagos.....	57
Figura 16 – Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Polynucleobacter</i> da amostra 8LP.....	63
Figura 17 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Polynucleobacter</i> da amostra 1S.....	64
Figura 18 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Limnohabitans</i> da amostra 8LP.....	67
Figura 19 - Abundância de <i>Candidatus Planktophila limnetica</i> nas amostras de rios.....	69
Figura 20 - Abundância de <i>Candidatus Planktophila limnetica</i> nas amostras de lagos.....	69
Figura 21 - Representatividade de <i>Candidatus Planktophila limnetica</i> nas amostras de rios e lagos.....	70
Figura 22 - Árvore filogenética das sequências associadas com a espécie <i>Candidatus Planktophila limnetica</i> da amostra 4S.....	72

Figura 23 - Representatividade das bactérias metanotróficas nas amostras de rios e lagos.....	74
Figura 24 - Abundância dos gêneros <i>Methylocella</i> , <i>Methylomonas</i> e <i>Methylosinus</i> nas amostras de lagos.....	75
Figura 25 - Abundância do gênero <i>Methylomonas</i> nas amostras de rios.....	79
Figura 26 - Árvore filogenética das sequências associadas com bactérias metanotróficas da amostra 3L.....	80
Figura 27 - Representatividade do gênero <i>Beijerinckia</i> nas amostras de rios e lagos.....	82
Figura 28 - Abundância do gênero <i>Beijerinckia</i> nas amostras de lagos.....	82
Figura 29 - Árvore filogenética das sequências associadas com o gênero <i>Beijerinckia</i> da amostra 1L.....	83
Figura 30 - Árvore filogenética das sequências associadas com a espécie <i>Pelomonas saccharophila</i> da amostra 5L.....	85
Figura 31 - Representatividade do gênero <i>Acinetobacter</i> nas amostras de rios e lagos....	86
Figura 32 - Abundância do gênero <i>Acinetobacter</i> nas amostras de rios.....	87
Figura 33 - Abundância do gênero <i>Acinetobacter</i> nas amostras de lagos.....	87
Figura 34 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> da amostra 4P.....	92
Figura 35 - Representatividade do gênero <i>Comamonas</i> nas amostras de rios e lagos.....	93
Figura 36 - Abundância do gênero <i>Comamonas</i> nas amostras de rios.....	94
Figura 37 - Abundância do gênero <i>Comamonas</i> nas amostras de lagos.....	94
Figura 38 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Comamonas</i> da amostra 2L.....	97
Figura 39 - Árvore filogenética das sequências associadas com a espécie <i>Curvibacter gracilis</i> da amostra 4S.....	100
Figura 40 - Árvore filogenética das sequências associadas com a espécie <i>Curvibacter delicatus</i> da amostra 2L.....	101
Figura 41 - Abundância do gênero <i>Acidovorax</i> nas amostras de rios.....	102
Figura 42 - Abundância do gênero <i>Acidovorax</i> nas amostras de lagos.....	103
Figura 43 - Representatividade do gênero <i>Acidovorax</i> nas amostras de rios e lagos.....	103
Figura 44 - Árvore filogenética das sequências associadas com a espécie <i>Acidovorax anthurii</i> da amostra 9U.....	106
Figura 45 - Representatividade do gênero <i>Aquabacterium</i> nas amostras de rios e lagos..	107
Figura 46 - Abundância do gênero <i>Aquabacterium</i> nas amostras de rios.....	108

Figura 47 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies do gênero <i>Aquabacterium</i> da amostra 8S.....	110
Figura 48 - Representatividade do gênero <i>Oxalicibacterium</i> nas amostras de rios e lagos.....	111
Figura 49 - Abundância do gênero <i>Oxalicibacterium</i> nas amostras de rios.....	112
Figura 50 - Árvore filogenética das sequências associadas com o gênero <i>Oxalicibacterium</i> da amostra 3S.....	113
Figura 51 - Representatividade do gênero <i>Bosea</i> nas amostras de rios e lagos.....	115
Figura 52 - Abundância do gênero <i>Bosea</i> nas amostras de lagos.....	115
Figura 53 - Árvore filogenética das sequências associadas com o gênero <i>Bosea</i> da amostra 7L.....	116
Figura 54 - Representatividade do gênero <i>Ilumatobacter</i> nas amostras de rios e lagos....	118
Figura 55 - Abundância do gênero <i>Ilumatobacter</i> nas amostras de rios.....	118
Figura 56 - Abundância do gênero <i>Ilumatobacter</i> nas amostras de lagos.....	119
Figura 57 - Árvore filogenética das sequências associadas com o gênero <i>Ilumatobacter</i> da amostra 8S.....	120
Figura 58 - Representatividade do gênero <i>Candidatus Pelagibacter</i> nas amostras de rios e lagos.....	122
Figura 59 - Abundância do gênero <i>Candidatus Pelagibacter</i> nas amostras de rios.....	122
Figura 60 - Árvore filogenética das sequências associadas com o gênero <i>Candidatus Pelagibacter</i> da amostra 6S.....	123
Figura 61 - Cianobactérias presentes nas amostras de lagos.....	124
Figura 62 - Árvore filogenética das sequências associadas com espécies de cianobactérias da amostra 5L.....	127
Figura 63 - Representatividade dos gêneros <i>Synechococcus</i> e <i>Cyanobium</i> nas amostras de rios e lagos.....	128
Figura 64 - Exemplos de amplificação do 16S rRNA de arqueia.....	130
Figura 65 - Classificação em nível taxonômico superior para as amostras de rios.....	133
Figura 66 - Classificação em nível de classe para sequências de <i>Euryarchaeota</i> no Rio Urucu (9U).....	135
Figura 67 - Classificação em nível de classe para sequências de <i>Euryarchaeota</i> no Rio Solimões (6S).....	135
Figura 68 - Classificação em nível de classe para sequências de <i>Euryarchaeota</i> no Rio Solimões (1S).....	136

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição detalhada dos pontos de coleta.....	31
Tabela 2 - Número de sequências utilizadas para análise da diversidade bacteriana em cada local amostrado.....	41
Tabela 3 – Espécies encontradas nas amostras de rios da Amazônia.....	52
Tabela 4 - Espécies encontradas nas amostras de lagos da Amazônia.....	54
Tabela 5 - Espécies do gênero <i>Polynucleobacter</i> encontradas nas amostras de rios.....	59
Tabela 6 - Espécies do gênero <i>Polynucleobacter</i> encontradas nas amostras de lagos.....	59
Tabela 7 - Espécies do gênero <i>Limnohabitans</i> encontradas nas amostras de lagos.....	66
Tabela 8 - <i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> encontrada nas amostras de lagos.....	70
Tabela 9 - <i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> encontrada nas amostras de rios.....	71
Tabela 10 - Espécies de bactérias metanotróficas encontradas nas amostras de lagos....	77
Tabela 11 - Espécies de bactérias metanotróficas encontradas nas amostras de rios.....	78
Tabela 12 - Espécie do gênero <i>Pelomonas</i> encontrada na amostra 5L.....	84
Tabela 13 - Espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> encontradas nas amostras de rios.....	88
Tabela 14 - Espécies do gênero <i>Acinetobacter</i> encontradas nas amostras de lagos.....	88
Tabela 15 - Espécies do gênero <i>Comamonas</i> encontradas nas amostras de rios.....	95
Tabela 16 - Espécies do gênero <i>Comamonas</i> encontradas nas amostras de lagos.....	96
Tabela 17 - Espécies do gênero <i>Curvibacter</i> encontradas nas amostras de rios.....	99
Tabela 18 - Espécies do gênero <i>Curvibacter</i> encontradas nas amostras de lagos.....	99
Tabela 19 - Espécies do gênero <i>Acidovorax</i> encontradas nas amostras de lagos.....	105
Tabela 20 - Espécies do gênero <i>Acidovorax</i> encontradas nas amostras de rios.....	105
Tabela 21 - Espécies do gênero <i>Aquabacterium</i> encontradas nas amostras de rios.....	109
Tabela 22 - Espécies do gênero <i>Cyanobium</i> e <i>Synechococcus</i> encontradas nas amostras de lagos.....	125
Tabela 23 - Espécies do gênero <i>Synechococcus</i> encontradas nas amostras de rios.....	126
Tabela 24 - Número total e número de sequências utilizadas para análise da diversidade de arqueias.....	132

Lista de Abreviaturas

1S - Rio Solimões

1L - Lago Baixio

2L - Lago Preto

3L - Lago Grande de Manacapuru

3S - Rio Solimões

4P - Foz do Rio Purus

4S - Rio Solimões depois da mistura das águas do Rio Purus

5L - Lago Ananá

6S - Rio Solimões

7L - Lago Sodré ou Lago do Jacaré

8LP - Lago Poraquê

8S - Rio Solimões, a montante do Terminal do Solimões (TSOL)

9U - Foz do Rio Urucu

16S rRNA – RNA Ribossomal 16S

°C – Grau Celsius

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

g- grama

h - hora

IPTG - Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

KV - Kilovolt

L - Litro

LB – Luria-Bertani

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio

ng - nanograma

pb – Pares de bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (“reação em cadeia da polimerase”)

pH - Potencial hidrogeniônico

PIATAM - Inteligência Sócio-Ambiental Estratégica da Indústria do Petróleo na Amazônia

RDP - Ribosomal Database Project

RNA - Ácido ribonucléico

rpm - Rotações por minuto

U - Unidade enzimática

UV - Ultravioleta

X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

μ F – Micro Faraday

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ m - Micrômetro

μ M – Micromolar

Ω - Ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Região Amazônica.....	18
1.2 Micro-organismos.....	19
1.2.1 Diversidade dos organismos vivos.....	20
1.3 Análises Moleculares.....	23
1.4 Abordagem Metagenômica.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Coleta.....	29
3.2 Extração de DNA.....	33
3.3 Amplificação do Material Genético.....	34
3.4 Clonagem.....	35
3.5 Transformação.....	36
3.6 Seleção dos clones recombinantes.....	36
3.7 Análises do sequenciamento.....	37
3.7.1 Análises bioinformáticas para as sequências de 16S rRNA de bactérias.....	37
3.7.2 Análises bioinformáticas para as sequências de 16S rRNA de arqueias.....	38
3.7.3 Construção das árvores filogenéticas.....	38
4. Resultados e Discussão – Parte A: Biodiversidade bacteriana.....	39
4.1 Amplificação do 16S rRNA.....	40
4.2 Análises das sequências de 16S rRNA.....	40
4.3 Diversidade bacteriana.....	42
4.3.1 Diversidade bacteriana nas amostras de rios e lagos da Amazônia.....	51
4.3.2 Bactérias típicas de água doce.....	55
4.3.3 Bactérias metanotróficas encontradas neste estudo.....	73
4.3.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio observadas nas amostras de rios e lagos da Amazônia.....	81

4.3.5 Bactérias encontradas neste estudo e que são presentes nos mais diversos ambientes.....	86
4.3.6 Bactérias encontradas neste estudo e que são típicas de ambientes marinhos.....	117
4.3.7 Produtores primários.....	124
5. Resultados e Discussão – Parte B: Estudo da biodiversidade de arqueia	129
5.1 Resultados e Discussão.....	130
5.1.1 Amplificação do 16S rRNA.....	130
5.1.2 Diversidade de arqueia em rios da Amazônia.....	131
6. CONCLUSÕES.....	138
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
8. ANEXOS.....	156
Anexo A – Garrafa Ninski de 10 L utilizada para coleta de água.....	156
Anexo B – Equipamentos utilizados para filtragem da água coletada.....	157
Anexo C - Metagenomics of the water column in a pristine portion of the Solimões-Amazon River, Brazil.....	158

1. INTRODUÇÃO

1.1 Região Amazônica

O bioma Amazônico se formou ao longo de milhões de anos, sendo o mais rico, heterogêneo e desconhecido domínio ecológico do planeta. Alguns dos fatores que contribuem para a formação da diversidade amazônica são as condições climáticas, a abundância de luz, calor e água, a ausência de períodos consideráveis de falta de alimentos, a diversidade de solo, os diferentes índices pluviométricos e as altitudes, além das variações ambientais e ecológicas, da competição acirrada e constante por nutrientes, e de uma complexa cadeia de interações entre os seres vivos (MEIRELLES, 2006).

A Amazônia é o maior conjunto de florestas tropicais do planeta. Ela ocupa 50% da superfície da América do Sul, abrangendo nove países: Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname, Venezuela e Brasil. A região apresenta a maior bacia hidrográfica do planeta, a do rio Amazonas, com cerca de 6.925 milhões de km², drenando 1/3 da superfície da América do Sul em seis países: Brasil, Bolívia, Equador, Peru, Colômbia e Venezuela. Na Amazônia encontram-se cerca de 15% das águas doces superficiais em forma líquida do planeta, sendo assim a maior reserva mundial (MEIRELLES, 2006; COPRAPHI, 1984).

A bacia Amazônica representa 16% do que todos os rios do planeta despejam de água nos oceanos, sendo sua descarga média anual de 6,3 trilhões m³ (OLTMAN, 1968).

A grande quantidade de chuva na Amazônia também contribui para que ela seja a maior bacia hidrográfica do planeta. Uma das principais características da Amazônia é a constância das altas temperaturas, sendo a umidade alta um dos principais responsáveis, pois ao absorver os raios infravermelhos emitidos pela superfície, a umidade não permite grandes e drásticas variações. A temperatura média anual está entre 26 °C na estação chuvosa e 27,5 °C na estação seca, uma variação anual inferior a 2 °C (MEIRELLES, 2006).

O Rio Amazonas é o mais longo, o maior em volume de água e o rio com maior foz no mundo. Ele nasce nos Andes peruanos, nas geleiras de Yarupa, e troca

sete vezes de nome ao longo de seu curso. Quando entra no Brasil, recebe o nome de Solimões, até a confluência com o Negro (MEIRELLES, 2006; BARTHEM *et al.*, 1995).

O Rio Amazonas e seus afluentes principais, incluindo as várzeas, cobrem cerca de 300.000 km² (JUNK, 1993). As várzeas são de fundamental importância para a flora e fauna da região.

Na bacia Amazônica, existem três tipos de águas, que variam conforme o ambiente geológico e a cobertura vegetal por onde passam (FIORE *et al.*, 2005; GHAI *et al.*, 2011):

- Águas brancas: ricas em nutrientes e material em suspensão e pH próximo de neutro. Rios que são classificados dessa forma são o próprio Amazonas e seus formadores;

- Águas pretas: pobres em nutrientes e em material em suspensão e ácidas. São classificados dessa forma o Negro, o Uatumã;

- Águas claras: pobres em nutrientes e em material em suspensão e pH próximo de neutro. São classificados dessa forma o Tapajós e o Xingu.

Os lagos da Amazônia não são verdadeiramente lagos. Resultam da alteração do curso e das enchentes dos rios, como o Amazonas (MEIRELLES, 2006).

A floresta tropical em torno do rio é um ecossistema extraordinariamente diverso, tendo milhares de espécies animais e vegetais, muitas endêmicas. No entanto, os micro-organismos deste habitat têm sido pouco estudados.

1.2 Micro-organismos

Os micro-organismos são encontrados em todos os ambientes da Terra, como no ar, água, solo, além de ambientes inóspitos, como regiões vulcânicas, fontes termais, minas de carvão, ambientes frios.

Os organismos procarióticos formam uma parte ainda pouco explorada da biota terrestre. Eles constituem dois ramos da árvore filogenética: os domínios *Archaea* (inicialmente chamado de Archaeobacteria) e *Bacteria* (inicialmente

chamado de Eubacteria), que consistem de milhões de diferentes espécies (WOESE, 1987).

A diversidade procariótica é produto de cerca de 3,8 bilhões de anos de evolução. Os micro-organismos são, provavelmente, a razão da enorme diversidade e variedade de habitat, além de constituírem um componente crucial da biosfera por catalisarem os processos que sustentam toda a vida na Terra (TORSVIK *et al.*, 2002; RIESENFELD *et al.*, 2004).

Sabe-se que a maior diversidade genética do planeta está representada pelos micro-organismos procarióticos, que tornam o planeta habitável por gerir a sua biogeoquímica, ciclagem de nutrientes e quebra de resíduos (naturais ou antropogênicos). Além disso, eles possuem o maior potencial para fabricação de produtos bioativos, enzimas e polímeros, bem como a maioria das ferramentas utilizadas em biotecnologia (RODRÍGUES-VALERA, 2004).

Embora as comunidades microbianas associadas a ambientes de água doce constituam a base das cadeias alimentares e sejam os principais agentes envolvidos nos ciclos biogeoquímicos e na ciclagem de nutrientes, elas ainda são pouco estudadas (PERCENT *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que a diversidade microbiana em nosso planeta é bem maior do que se pensava. Os fatores que contribuíram para isso foram, por exemplo, o desenvolvimento de abordagens moleculares, que permitiram grandes avanços sobre o conhecimento do mundo microbiano, e também a identificação de arqueias em diversos ambientes não extremos, contrariando o pensamento anterior de que estariam presentes apenas em habitat hostis (CHABAN *et al.*, 2006; XU, 2006).

1.2.1 Diversidade dos organismos vivos

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a classificação dos seres vivos deixou de ser efetuada em cinco reinos, *Animalia*, *Plantae*, *Fungi*, *Protista* e *Monera*, fundamentada em dados morfológicos, e passou a ser baseada também em dados moleculares, que são mais informativos acerca das relações evolutivas.

Com base em análises do gene que codifica o rRNA 16S/18S, Woese e Fox (1977) propuseram uma nova divisão filogenética dos seres vivos em três domínios. Isto porque foi descoberto um novo organismo metanogênico, que, apesar de morfológicamente semelhante às bactérias, são filogeneticamente distintos. As

arqueias diferem das bactérias em características tais como a ausência de peptídeoglicano e a presença de lipídeos na membrana celular com ligações éter ao invés de ligações éster, frequentemente, encontrada nos demais procariotos. As arqueias também compartilham características com organismos eucariontes, como, por exemplo, os mecanismos de replicação, transcrição e tradução, que se assemelham mais aos eucariotos do que com as bactérias (SCHLEPER *et al.*, 2005).

A partir de então, análises moleculares tornaram-se fundamentais no estudo taxonômico dos seres vivos. Em 1990, Woese e colaboradores reclassificaram os seres vivos em três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. O Domínio *Eukarya* é formado por todos os organismos eucariotos, enquanto *Bacteria* e *Archaea* são formados por organismos procariotos.

Dentro do domínio *Bacteria*, há uma enorme variedade de micro-organismos que estão envolvidos em praticamente todos os processos que ocorrem na Terra. Eles podem ser encontrados em diversos habitats e são de grande importância devido à elevada diversidade de vias metabólicas. As bactérias nos ciclos biogeoquímicos convertem elementos essenciais para a vida em formas biologicamente acessíveis e podem formar associações com plantas e animais de maneira benéfica. Elas também participam da detoxicação e degradação de poluentes e, apesar de muitas serem patogênicas, um grande número convive de forma benéfica com humanos.

Análises baseadas no 16S rRNA têm possibilitado a identificação de uma grande quantidade de bactérias ainda não cultiváveis, as quais podem vir a apresentar características de interesse biotecnológico.

As *Archaea* são divididas em dois grandes grupos: *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*. Todos os *Crenarchaeotas* cultiváveis são representados por organismos hipertermófilos, incluindo aqueles capazes de crescer nas temperaturas mais elevadas dentre todos os organismos conhecidos (CHABAN *et al.*, 2006). Em 2005, Könneke e colaboradores isolaram o primeiro *Crenarchaeota* mesófilo oxidante de amônia.

No entanto, muitas sequências de 16S rRNA associadas com *Crenarchaeota* têm sido relatadas em ambientes com temperatura moderada. Este é um fato interessante, já que todos os organismos cultiváveis são termófilos extremos, isolados de fontes termais terrestres e submarinas (OCHSENREITER *et al.*, 2003).

Pouco se sabe sobre a fisiologia dos *Crenarchaeotas* não termófilos e suas contribuições ao ambiente em que estão inseridos. No entanto, a descoberta do gene da amônia-monooxygenase e o posterior isolamento do *Crenarchaeota* marinho oxidante de amônia, "*Nitrosopumilus maritimus*", obtido a partir do substrato rochoso de um reservatório tropical marinho no Aquário de Seattle, sugerem que esses organismos tenham um papel importante no ciclo do nitrogênio global (VENTER *et al.*, 2004; KÖNNEKE *et al.*, 2005; NICOL *et al.*, 2006 e TAKETANI & TSAI, 2010).

Já *Euryarchaeota* compreende um grupo mais diverso com organismos metanogênicos, termófilos, halófilos e acidófilos extremos. Muitos estudos têm como foco de suas pesquisas os organismos metanogênicos, devido à preocupação com o aquecimento global, já que o gás metano é um fator agravante na mudança climática do nosso planeta (PAZINATO *et al.*, 2010).

Por terem sido primeiramente isolados de ambientes extremos, como aqueles com altas concentrações salinas (~5M NaCl), baixo pH (perto de zero), altas temperaturas (~113 °C) e condições anóxicas (DELONG, 1998), os estudos e buscas por arqueias se concentraram nesses ambientes. Com os avanços das técnicas moleculares, tem-se verificado a presença de arqueias nos mais diversos ambientes, como em solos (BINTRIM *et al.*, 1997; NICOL *et al.*, 2003; OCHSENREITER *et al.*, 2003; PAZINATO *et al.*, 2010), plâncton marinho (DeLONG, 1992), coluna d'água de lagos (KEOUGH *et al.*, 2003), sedimentos de lagos (CONRAD *et al.*, 2010) e trato digestivo de animais (VAN DER MAAREL *et al.*, 1998; FRIEDRICH *et al.*, 2001). Dessa forma, nosso conhecimento sobre as arqueias tem aumentado, embora, apesar dessa ampla distribuição, sua importância ecológica seja ainda pouco compreendida. Isto se deve principalmente à falta de representantes isolados, causada pela dificuldade em simular o ambiente em que estão inseridos, dificultando assim, uma melhor compreensão sobre as propriedades fisiológicas desses organismos e sua contribuição para o funcionamento do ecossistema (CHABAN *et al.*, 2006; PLASENCIA *et al.*, 2010).

Por meio das análises das sequências de 16S rRNA, verificou-se que o Domínio *Archaea* representa um número considerável de procariotos nos ecossistemas terrestres e marinhos, indicando que possam ter uma importante participação nos ciclos biogeoquímicos (SCHLEPER *et al.*, 2005). Algumas informações sobre o metabolismo e fisiologia desses organismos vêm sendo obtidas

a partir de associação de dados genômicos com características físico-químicas dos ambientes.

Avanços nas técnicas moleculares, principalmente aquelas relacionadas a sequenciamento de última geração e na área de bioinformática, têm contribuído enormemente para o conhecimento da real diversidade genética em diversos ambientes, permitindo também inferir sobre a dinâmica desses organismos em tais ambientes.

1.3 Análises Moleculares

A aplicação de técnicas de biologia molecular é fundamental no auxílio às investigações de biodiversidade microbiana. O avanço das técnicas moleculares, principalmente o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e outras técnicas de DNA recombinante, foram de grande importância para análises de micro-organismos não-cultiváveis. A maioria absoluta dos micro-organismos (~99%) é de difícil isolamento e cultivo tradicional, devido à incapacidade de simulação do ambiente em que vivem (AMANN *et al.* 1995; BORNEMAN *et al.*, 1996; KUSKE *et al.*, 1997).

Estudos mostraram que, em apenas 1 g de solo, podem ser encontradas cerca de 10^7 células. Porém, devido às dificuldades em enriquecer e isolar esses micro-organismos, mais de 99% da diversidade genética presente nesta população acaba sendo perdida. Assim, tem-se que apenas 0,1-1% da população total dessa amostra de solo pode ser estudada por técnicas de cultivo puro (DANIEL, 2004). As técnicas de cultivo puro proporcionam caracterização individual dos micro-organismos, principalmente relacionadas com sua nutrição e bioquímica. Porém, o cultivo limita avaliações taxonômicas e filogenéticas, quando queremos estimar a diversidade bacteriana, devido às falhas encontradas nos métodos tradicionais (PACE, 1997).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas, voltadas à análise de regiões conservadas entre micro-organismos encontrados no meio ambiente, principalmente para estudos filogenéticos. Isso é feito a partir da utilização de sequências gênicas conservadas. Um exemplo disso é a análise do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (16S rDNA), um componente da subunidade menor do ribossomo, que é

bastante utilizado para estudos taxonômicos e identificação de espécies bacterianas (CHOI *et al.*, 1996; SCHMALENBERGER *et al.*, 2001; CLARRIDGE, 2004; MUNSON *et al.*, 2004; PETTI *et al.*, 2005).

Esta sequência se manteve bastante conservada durante os processos de evolução biológica, podendo indicar como os organismos estão intimamente relacionados, e, por estar presente em todas as bactérias, possibilita a identificação das mesmas. Em bactérias, o RNA ribossomal 16S (16S rRNA) tem sido amplamente utilizado na classificação dos micro-organismos não-cultiváveis. Em procariontes, os genes do 16S rRNA são essenciais e ocorrem em pelo menos uma cópia em um genoma. Eles também estão presentes em todos os genomas mitocondriais, os quais perderam a maioria de seu conteúdo genético ancestral na longa história evolutiva da simbiose. Essa universalidade dos genes é o que os tornam um alvo ideal para estudos filogenéticos e classificação taxonômica (WANG & QIAN, 2009).

A região codificante do 16S rRNA é muito conservada, de forma tanto inter-espécies quanto intra-espécies. Nessa sequência, existem regiões que são chamadas de hipervariáveis – as quais são em número de nove (V1 a V9) – e que são diversificadas entre as várias espécies bacterianas (figura 1) (DAMS *et al.*, 1988; VAN DE PEER *et al.*, 1996). Através da amplificação do 16S rRNA a partir do DNA genômico bacteriano pela técnica da PCR, utilizando *primers* universais, é possível identificar qual é o gênero e/ou a espécie de micro-organismo que está sendo estudado, baseado na diferença encontrada entre as regiões hipervariáveis das sequências amplificadas (McCABE *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2000; BAKER *et al.*, 2003; MUNSON *et al.*, 2004). Desde a invenção da técnica da PCR, essas regiões variantes, V1-V9, dos genes 16S rRNA têm sido usadas para identificação de espécies (WANG e QIAN, 2009). As regiões V2 e V3 são as mais apropriadas para distinguir todas as espécies bacterianas em nível de gênero (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Muitos estudos já identificaram micro-organismos pela investigação de regiões hipervariáveis do 16S rRNA (CHOI *et al.*, 1996; KATAOKA *et al.*, 1997; MARCHESI *et al.*, 1998; LU *et al.*, 2000; BERTILSSON *et al.*, 2002; CLARRIDGE, 2004; ROTHMAN *et al.*, 2002; BECKER, K. *et al.*, 2004; MAYNARD *et al.*, 2005).

A aplicação direta de técnicas moleculares sobre a amostra de interesse ocasionou a diminuição da dificuldade de cultivo e uma melhor interpretação dos organismos estudados. As técnicas compreendem extração de DNA, amplificação

do fragmento de interesse, clonagem, sequenciamento e interpretação dos dados, com a comparação das sequências de 16S rRNA possibilitando a identificação de micro-organismos não conhecidos e não cultiváveis (BORNEMAN *et al.*, 1996; MACRAE *et al.*, 2000; KENT & TRIPLETT, 2002). O grande número de sequências de 16S rRNA disponíveis atualmente (mais de 1.921.000 sequências, segundo o *Ribosomal Database Project* rdp.cme.msu.edu) favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético.

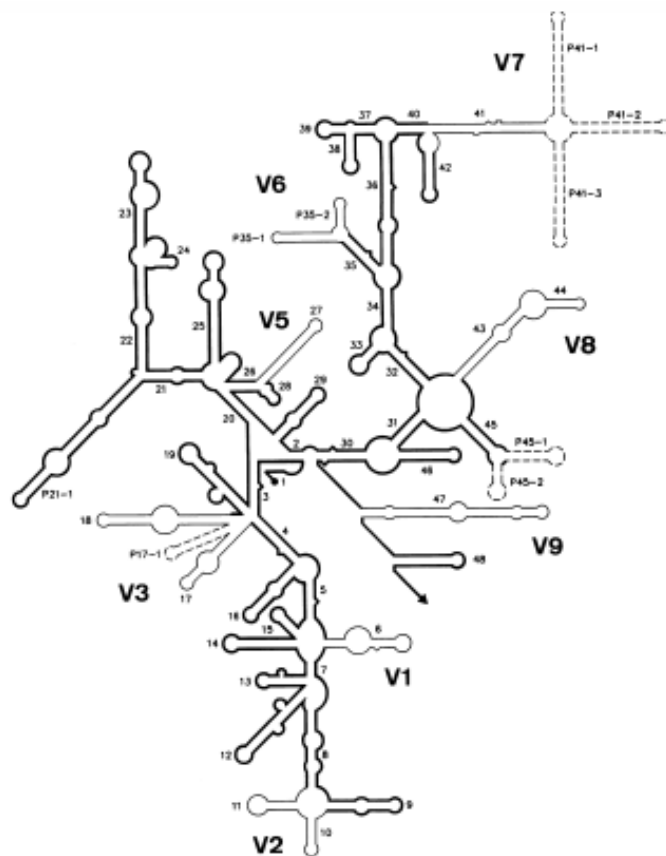


Figura 1- Modelo da estrutura secundária para srRNA procariótica. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 a V9). Procariotos não possuem V4. A sequência do 16S rRNA domínio *Archaea* segue os mesmos padrões gerais de *Bacteria*, com exceção da hélice 35 que não é ramificada, sendo esta uma característica do domínio *Eukarya* (Modelo reproduzido a partir de DAMS *et al.*, 1988)

1.4 Abordagem Metagenômica

O estudo de um conjunto de genomas encontrado na microbiota total de uma determinada amostra ambiental recebe o nome de Metagenoma (BORNEMAN, 1996; LUDWIG *et al.*, 1997; HANDELSMAN *et al.*, 1998; RONDON *et al.*, 2000). Um Projeto Metagenoma se diferencia de um Projeto Genoma, por este último ser realizado a partir do DNA de um único organismo. A Metagenômica é um campo bastante novo e possui duas abordagens: a análise baseada em sequência e a análise baseada na função, realizadas em genomas microbianos coletivos contidos em uma determinada amostra ambiental (HANDELSMAN *et al.*, 1998; SCHLOSS & HANDELSMAN, 2003; HUGENHOLTZ & TYSON, 2008). Tal abordagem permite a investigação de uma grande diversidade de genes e seus produtos.

A análise baseada na sequência visa à busca por sequências conhecidas de DNA, por exemplo, à identificação de âncoras filogenéticas por meio da utilização de sequências altamente conservadas, permitindo redefinir a diversidade procariótica (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; RIESENFELD *et al.*, 2004).

Já a análise baseada em função busca a descoberta de novas moléculas de interesse biotecnológico. Essa busca através de técnicas dependentes de cultivo está diminuindo significativamente, pelo fato já mencionado da maioria dos micro-organismos ainda não poderem ser cultivados em laboratório (STEELE & STREIT, 2005).

Porém, com a Metagenômica, tornou-se viável a possibilidade de se obter milhares de genomas de micro-organismos que estão presentes no solo, água ou sedimentos, que podem ser amplamente explorados pela biotecnologia. Essa exploração pode resultar em descobertas de novos genes e proteínas, agentes terapêuticos e novos biocatalisadores como, por exemplo, enzimas lipolíticas, proteases, celulasas e agarases, que apresentam interesse industrial, além de outras biomoléculas que a diversidade natural - especialmente os micro-organismos - pode fornecer, podendo nos dar um retrato da dinâmica real do funcionamento do genoma em um habitat microbiano (DANIEL, 2004; RODRIGUES -VALERA, 2004; STREIT & SCHMITZ, 2004; SCHMEISSER *et al.*, 2007).

A Metagenômica permitiu não só a análise da diversidade microbiana, incluindo os micro-organismos não cultiváveis, como também a análise da

diversidade bioquímica, já que é possível se ter acesso a toda informação contida no genoma dos milhares de organismos presentes em uma determinada amostra ambiental, sendo eles cultiváveis ou não.

Muitos estudos usando a técnica da Metagenômica têm sido realizados, como, por exemplo, o Metagenoma do Mar do Sargasso. Tal estudo deu origem à descoberta de 148 filotipos anteriormente desconhecidos e cerca de 1,2 milhões de novos genes, incluindo mais de 782 novos fotorreceptores similares à rodopsina (VENTER *et al.* 2004). Finalmente, como o maior estudo metagenômico já realizado, a expedição de amostragem global do oceano *Sorcerer II* (GOS), envolveu 41 ambientes aquáticos, principalmente marinhos, com aproximadamente 7,7 milhões de leituras. Como resultado, mais de 6,1 milhões de proteínas, incluindo milhares de famílias de novas proteínas, foram anotadas a partir deste conjunto de dados (RUSCH *et al.*, 2007).

No entanto, existem ainda poucos estudos metagenômicos em ambientes de água doce, os quais abrigam micro-organismos diferentes daqueles comumente encontrados em ecossistemas marinhos e terrestres (GHAI *et al.*, 2011). Um limitado número de estudos metagenômicos em comunidades microbianas de água doce foi realizado até o momento, como, por exemplo, o do Lago Gatun (Panamá) (RUSCH *et al.*, 2007), Lago Samsonvale (Australia) (POPE & PATEL, 2008) e Lago Lanier (Estados Unidos) (OH *et al.*, 2011). No Brasil, o primeiro estudo metagenômico de água doce foi realizado no Rio Solimões, compreendendo a análise da diversidade microbiana na maior bacia hidrográfica do mundo (GHAI *et al.*, 2011).

A Metagenômica vem contribuindo para estudos de diversidade e aqueles com intuito de relacionar os micro-organismos com o ambiente em que estão inseridos, além de contribuir para a descoberta de novos genes de interesse biotecnológico. Sequenciadores de nova geração e avanços nas ferramentas de bioinformática têm contribuído enormemente para a Metagenômica, aumentando o nosso conhecimento sobre o mundo microbiano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a biodiversidade microbiana em rios e lagos da Região Amazônica, utilizando uma abordagem metagenômica.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterização da biodiversidade bacteriana por meio da amplificação da região 16S rRNA, utilizando a técnica de PCR, sequenciamento e análise das sequências por meio de bancos de dados específicos para 16S rRNA.
- Caracterização da biodiversidade de arqueias por meio da amplificação da região 16S rRNA, utilizando a técnica de PCR, sequenciamento e análise das sequências por meio de bancos de dados específicos para 16S rRNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta

As coletas foram realizadas entre os dias 10 e 18 de setembro de 2008, no Rio Solimões, Rio Urucu, Rio Purus e em lagos adjacentes, entre os municípios de Manaus e Coari, no Estado do Amazonas (figura 2). Os pontos escolhidos eram próximos às comunidades atendidas pelo PIATAM (Inteligência Sócio-Ambiental Estratégica da Indústria do Petróleo na Amazônia - www.piatam.ufam.edu.br), apresentando-se de grande importância para a população residente, devido à prática de atividade econômica ou de subsistência.

Essas comunidades estão localizadas no trecho do Rio Solimões onde navegam navios petroleiros e butaneiros. Desta forma, este trabalho também pode ser utilizado para estudos de monitoramento ambiental. Caso haja algum vazamento de petróleo ou gás teremos estudos prévios a serem comparados, o que possibilita analisar o grau de impacto ambiental causado.

As coletas foram realizadas em, aproximadamente, metade da profundidade; os pontos escolhidos foram os mesmos utilizados pelo grupo de Limnologia do PIATAM, coordenado pela pesquisadora Dra. Tereza Cristina Souza de Oliveira, da Universidade Federal do Amazonas. Tal procedimento foi realizado para que pudéssemos associar os dados das análises de água com os dados que obtivemos, visando um melhor entendimento da relação micro-organismo/ambiente naqueles pontos.

Os pontos selecionados estão representados na tabela 1. A coleta de água foi realizada utilizando garrafas Niskin de 10 litros (Alfakit, Brasil) (Anexo A) coletando um volume de aproximadamente 10 L de água em cada ponto. O equipamento de filtragem (Filter Holder Millipore® 142 mm cat # YY3014236) (Anexo B) foi montado com a membrana AP 20 de microfibras de vidro 142 mm de diâmetro (Millipore® cat # AP2014250) e com a membrana isopore 5 µm de policarbonato 142 mm de diâmetro (Millipore® cat # TMTP14250). Esses dois filtros foram utilizados para reter organismos de tamanhos maiores como algas e alguns sedimentos. Após estes filtros foi acoplado um filtro de PVDF de 0,22 µm (Sterivex GV Millipore® cat # SVGV010RS) - na qual ficaram retidas as bactérias e arqueias presentes na água

coletada. Com o auxílio de uma bomba peristáltica de pressão positiva, o volume de água foi filtrado.

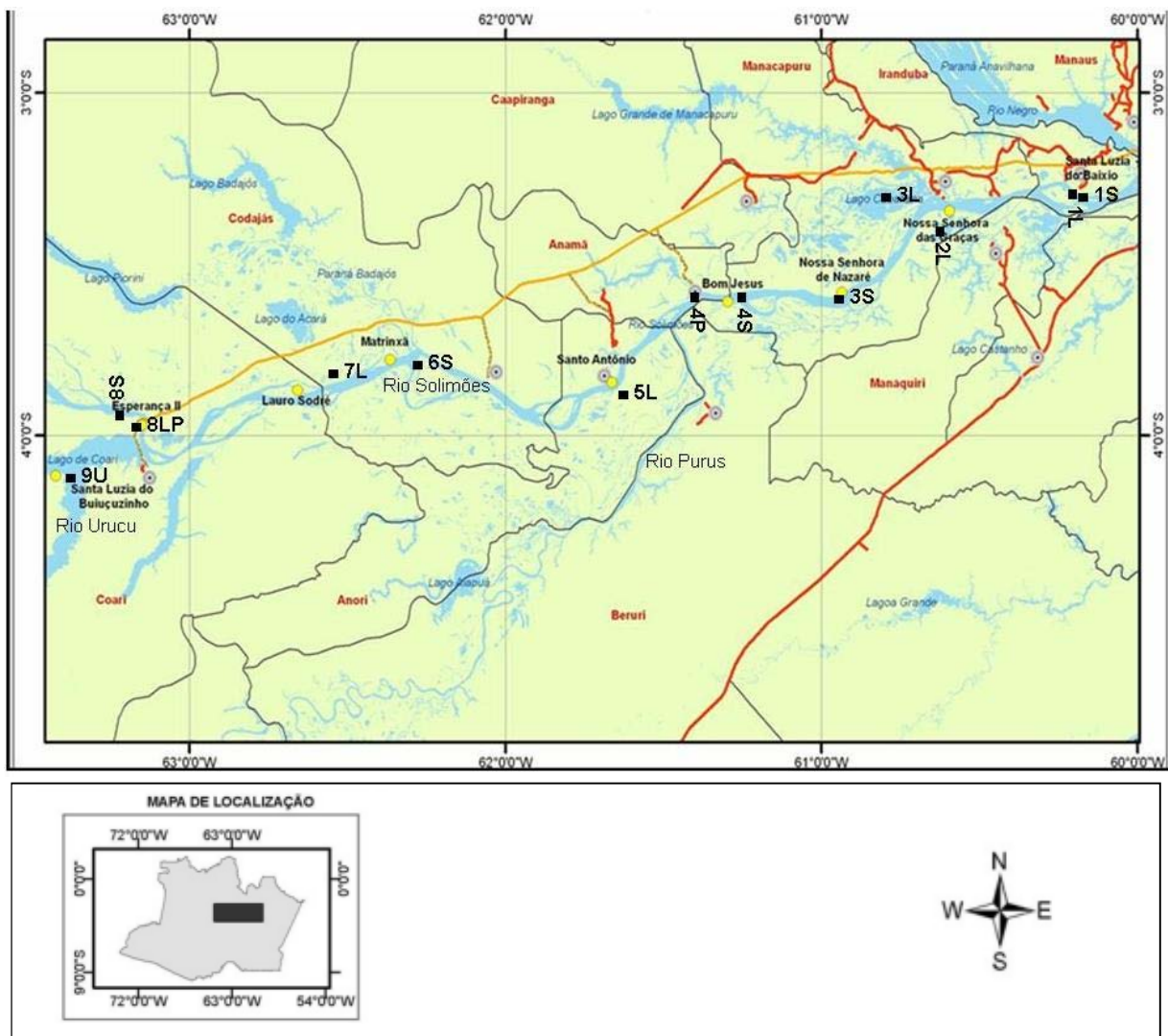


Figura 2 - Pontos de coleta das amostras de água para realização dos estudos de biodiversidade microbiana. Números seguidos da letra “S” são pontos coletados no Rio Solimões; números seguidos da letra “L” são pontos coletados em lagos; o número seguido da letra “U” é o ponto coletado no Rio Uruçu; o número seguido da letra “P” é o ponto coletado no Rio Purus

Tabela 1 - Descrição detalhada dos pontos de coleta

Comunidade	Locais de Coleta	Coordenadas (GPS)	Sigla no mapa	Características do local coletado	Informações adicionais
Comunidade de Santa Luzia da Ilha do Baixo - Município de Iranduba	Rio Solimões	03 ° 17'03,86"S; 60°01'23,04"W	1S	Profundidade do rio: 21m Profundidade de coleta: 11m	Data da coleta: 10 de setembro de 2008 Horário da coleta: 08h00 Temperatura da água: 29,7 °C Oxigênio: 3,76 mg L ⁻¹ Condutividade: 74,4 µS cm ⁻¹ pH: 6,59 Transparência: 30 cm M susp (mg L ⁻¹): 41,33 DBO (mg L ⁻¹): 0,55
	Lago do Baixo	03°14'55,78"S; 60°05'01,43"W	1L	Profundidade do lago: 2,5 m Profundidade de coleta: 2m Recebe influência do Rio Solimões	Data da coleta: 10 de setembro de 2008 Horário da coleta: 09h58 Temperatura da água: 30,7 °C Oxigênio: 2,74 mg L ⁻¹ Condutividade: 109,8 µS cm ⁻¹ pH: 6,81 Transparência: 70 cm
Comunidade Nossa Senhora das Graças da Costa do Pesqueiro II – Município de Manacapuru	Lago Preto	03°21'12,46"S; 60°37'31,30"W	2L	Profundidade do lago: 2 m Profundidade de coleta: 1,5m Não recebe influência do Rio Solimões Água preta	Data da coleta: 11 de setembro de 2008 Horário da coleta: 08h30 Temperatura da água: 29,4 °C Oxigênio: 3,41 mg L ⁻¹ Condutividade: 63,7 µS cm ⁻¹ pH: 6,43 Transparência: 80 cm M susp (mg L ⁻¹): 58
	Lago Grande de Manacapuru	03°15'50,96"S; 60°41'19,76"W	3L	Profundidade do lago: 11 m Profundidade de coleta: 5,5m Recebe água do Rio Manacapuru (água preta)	Data da coleta: 11 de setembro de 2008 Horário da coleta: 15h05 Não foram realizadas outras análises pelo grupo de Limnologia.
Comunidade Nossa Senhora de Nazaré da Costa do Paratari I – Município de Manacapuru	Rio Solimões	03°35'43,81"S; 60°54'41,68"W	3S	Profundidade do rio: 20 m Profundidade de coleta: 10m	Data da coleta: 12 de setembro de 2008 Horário da coleta: 08h25 Temperatura da água: 29,8°C Oxigênio: 4,1 mg L ⁻¹ Condutividade: 72,9 µS cm ⁻¹ pH: 6,34 Transparência: 20 cm

Comunidade Bom Jesus do Paraná do Iauara – Município de Manacapuru	Foz do Rio Purus	03°41'07,45"S; 61°28'13,91"W	4P	Profundidade do rio: 24 m Profundidade de coleta: 15m Rio de água branca	Data da coleta: 13 de setembro de 2008 Horário da coleta: 08h00 Não foram realizadas outras análises pelo grupo de Limnologia.
	Rio Solimões depois da mistura das águas do Rio Purus	03°37'19,86"S; 61°24'27,23"W	4S	Profundidade do rio: 21 m Profundidade de coleta: 10m	Data da coleta: 13 de setembro de 2008 Horário da coleta: 09h05 Temperatura da água: 29,7 °C Oxigênio: 4,06 mg L ⁻¹ Condutividade: 63,9 µS cm ⁻¹ pH: 6,85 Transparência: 0,55 cm Turbidez (NTU): 0,78 M susp (mg L ⁻¹): 71,3
Comunidade de Santo Antônio da Costa da Terra Nova – Município de Anori	Lago Ananá	03°53'11,83"S; 61°40'36,75"W	5L	Profundidade do lago: 2 m Profundidade de coleta: 1m	Data da coleta: 14 de setembro de 2008 Horário da coleta: 09h03 Temperatura da água: 29,3 °C Oxigênio: 4,14 mg L ⁻¹ Condutividade: 88 µS cm ⁻¹ pH: 6,78 Transparência: 20 cm Turbidez (NTU): 25,74 M susp (mg L ⁻¹): 47,0 DBO (mg L ⁻¹): 3,79
Comunidade de Matrinxã da Ilha de Matrinxã – Município de Codajás	Rio Solimões	03°49'52,26"S; 62°26'58,46"W	6S	Profundidade do rio: 22 m Profundidade de coleta: 17m	Data da coleta: 15 de setembro de 2008 Horário da coleta: 11h42 Não foram realizadas outras análises pelo grupo de Limnologia.
Comunidade de Lauro Sodré do Paraná do Nazária – Município de Coari	Lago Sodré ou Lago do Jacaré	03°49'56,80" S; 62°34'46,45"W	7L	Profundidade do lago: 3 m Profundidade de coleta: 2m	Data da coleta: 16 de setembro de 2008 Horário da coleta: 09h28 Não foram realizadas outras análises pelo grupo de Limnologia.
Comunidade Esperança II da Costa de Santa Rosa – Município de Coari	Lago Poraquê	03°57'36,36" S; 63°09'48,17"W	8LP	Profundidade do lago: 1,8 m Profundidade de coleta: 1m Água preta	Data da coleta: 17 de setembro de 2008 Horário da coleta: 10h10 Temperatura da água: 26,6 °C Oxigênio: 2,20 mg L ⁻¹ Condutividade: 17,3 µS cm ⁻¹ pH: 5,0 Transparência: 50 cm M susp (mg L ⁻¹): 17 DBO (mg L ⁻¹): 2,58

	Rio Solimões, a montante do Terminal do Solimões (TSOL)	03°56'11,08" S; 63°10'14,45" W	8S	Profundidade do rio: 15 m Profundidade de coleta: 8m	Data da coleta: 17 de setembro de 2008 Horário da coleta: 13h54 Temperatura da água: 29,8 °C Oxigênio: 5,05 mg L ⁻¹ Condutividade: 109,7 µS cm ⁻¹ pH: 7,09 Transparência: 20 cm Turbidez (NTU): 18,20 M susp (mg L ⁻¹): 45,67 DBO (mg L ⁻¹): -2,90
Comunidade Santa Luzia da Costa do Buiçuzinho – Município de Coari	Foz do Rio Urucu	04°08'08,03" S; 63°29'54,69" W	9U	Profundidade do rio: 2,8m Profundidade de coleta: 1,5m Água preta	Data da coleta: 18 de setembro de 2008 Horário da coleta: 09h54 Temperatura: 28,6°C Oxigênio: 5,75 mg L ⁻¹ Condutividade: 25,8 µS cm ⁻¹ pH: 6,46 Transparência: 60 cm Turbidez (NTU): 10,92 M susp (mg L ⁻¹): 42,50 DBO (mg L ⁻¹): 3,41

3.2 Extração de DNA

Os filtros (Sterivex) foram preenchidos com tampão de extração (40 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.3, 0,75 M Sucrose) e armazenados em -20 °C até a extração do DNA.

A solução foi coletada a partir dos filtros e a extração do DNA foi realizada com a utilização do kit *Metagenomic DNA from Environmental Water Samples* (Epicentre, WI, USA). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada no equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, DE, USA).

3.3 Amplificação do Material Genético

Para análise das bactérias e arqueias aquáticas, foi realizada amplificação da região 16S rRNA, com *primers* específicos, com o intuito de identificar taxonomicamente as espécies.

Bactérias: Os oligonucleotídeos utilizados foram: 27F - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (GIOVANNONI, 1991) e 1492R - 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (LANE, 1991), amplificando uma região de aproximadamente 1500 pb.

A PCR foi realizada com aproximadamente 25 ng de DNA molde; 200 μ M de cada dNTP (Promega); 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 1,5 mM de $MgCl_2$ (Fermentas); tampão para PCR 1x (Fermentas); 10 pmol de cada oligonucleotídeo; água estéril para completar um volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc), seguindo o seguinte programa: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos (desnaturação); 35 ciclos (94 °C por 1 minuto; 50 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos) e uma extensão final de 72 °C por 20 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo. As bandas do produto amplificado com o tamanho esperado (~1500 pb) foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante, e, posteriormente analisadas em gel de agarose 1% e em Nanodrop.

Archaeas: Os oligonucleotídeos utilizados foram: 21F -5' TTCCGGTTGATCCYGCCGGA 3' (DeLONG, 1992) e 958R - 5' YCCGGCGTTGAMTCCAATT 3' (DeLONG, 1992), amplificando uma região de aproximadamente 900 pb.

A reação de amplificação foi realizada com 25 ng de DNA molde; 200 μ M de cada dNTP (Promega); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Fermentas); 2,5 mM de $MgCl_2$ (Fermentas); tampão para PCR 1x (Fermentas); 20 pmol de cada oligonucleotídeo; água estéril para completar um volume final de 20 μ L.

A reação ocorreu em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc), seguindo o seguinte programa: 1 ciclo a 94 °C por 5 minutos (desnaturação); 35 ciclos (94 °C por 20 segundos; 55 °C por 30 segundos; 72 °C por 2 minutos) e uma extensão final

de 72 °C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. As bandas do produto amplificado com o tamanho esperado (~900 pb) foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante, e, posteriormente analisadas em gel de agarose 1 % e Nanodrop.

3.4 Clonagem

Os produtos de amplificação do gene 16S rRNA foram então clonados em vetor pTZ57 R/T (Fermentas) (figura 3), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi feita em uma proporção de extremidades livres de 3:1 (inserto: vetor) e mantida a 16 °C por 12 horas.

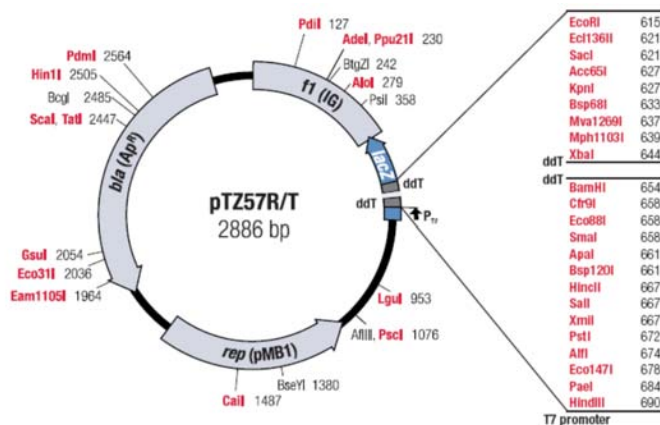


Figura 3: Mapa do Vetor pTZ57 R/T

3.5 Transformação

A reação de ligação foi dialisada utilizando membranas de nitrocellulose 0,025 µm com 25 mm de diâmetro (Millipore® cat # VSWP02500). Em seguida, dois microlitros da reação de ligação foram utilizados para transformar células de *Escherichia coli* DH10B eletrocompetentes, com o uso de cubetas de 0,1 cm (Bio-Rad). Essas células foram submetidas à eletroporação no equipamento GenePulser II (Bio-Rad), nas seguintes condições: 1,8 KV, 25 µF e 200 Ω. Após a transformação, foram adicionados 800 µL de LB Broth (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L NaCl) e o tubo foi incubado por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, 10 µL, 50 µL e 100 µL do conteúdo incubado, contendo as células transformadas, foram plaqueadas com auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri (150X15 mm), contendo LB Agar (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L NaCl, 15 g/L de agar), suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 0,66 mM de IPTG (Isopropil β-D-thiogalactopiranosídeo) e 0,005% de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C.

3.6 Seleção dos Clones Recombinantes

As colônias brancas, representando possíveis recombinantes, foram transferidas para placas de 96 poços com meio LB Broth, com 10 % de glicerol e 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 22 horas e, posteriormente, estocadas a - 80 °C. Os DNA plasmidiais foram extraídos a partir das culturas estoque, em placas de 96 poços (*Deep wells*). As células foram incubadas em 1 mL de meio LB Broth, com 100 µg/mL de ampicilina, em *shaker* a 37 °C, a 250 rpm por 22 horas. Após o cultivo, os plasmídeos foram isolados utilizando o método de lise alcalina, de acordo com Vettore *et al.* (2001). Os DNA plasmidiais foram posteriormente visualizados em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo.

Uma média de 200 clones por amostra foram sequenciados em sequenciador MegaBACE 1000 Flexyble, usando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare). Os *primers* de sequenciamento usados foram: para bactérias, 338F 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (LANE, 1991), que se estende da região hipervariável V3 do 16S rRNA, e para arqueias o M13F 5' GTAAAACGACGGCCAG 3'.

3.7 Análises de sequenciamento

As sequências foram recuperadas a partir dos cromatogramas usando o *software Sequence Analyzer, Base Caller Cimarron 3.12*. As sequências de baixa qualidade e o vetor foram removidos usando o programa dCAS (com qualidade Phred ≤ 15) (GUO *et al.*, 2009). Apenas alinhamentos maiores que 100 pb foram considerados.

3.7.1 Análises bioinformáticas para as sequências de 16S rRNA de bactérias

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de rRNA existentes no banco de dados RDP Release 10 (COLE *et al.*, 2009) usando a ferramenta *Classifier* e com 95% de *confidence threshold* (Análise realizada em junho de 2011).

As sequências foram identificadas até o nível de gênero, se apresentassem uma porcentagem de identidade maior que 95% com uma sequência bem classificada existente no banco de dados. Caso contrário, somente níveis taxonômicos superiores (filos e classes) foram utilizados, com porcentagem de identidade maior que 85%. Espécies foram identificadas quando as sequências apresentavam porcentagem de identidade maior que 97%, com espécies presentes no programa Ez Taxon (CHUN *et al.*, 2007), usado para identificação de procaríotos com base nas sequências dos gene 16S rRNA.

3.7.2 Análises bioinformáticas para as sequências de 16S rRNA de arqueias

As sequências obtidas foram comparadas com sequências de rRNA existentes no banco de dados RDP Release 10 (COLE *et al.*, 2009) usando a ferramenta *Classifier* e com 95% de *confidence threshold* (Análise realizada em junho de 2011).

As sequências foram identificadas até o nível de gênero, se apresentassem uma porcentagem de identidade maior que 95% com uma sequência bem classificada existente no banco de dados. Caso contrário, somente níveis taxonômicos superiores (filos e classes) foram utilizados, com porcentagem de identidade maior que 85%.

3.7.3 Construção das árvores filogenéticas

Foram construídas treze árvores filogenéticas, uma para cada ponto amostrado para os estudos de diversidade bacteriana.

Sequências que apresentaram similaridade como mencionado no item 3.7.1 e com mais de 500 bases, foram utilizadas para a construção das árvores filogenéticas. Foi selecionado um clone representativo de um determinado grupo para a geração das árvores, o alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1994). Em seguida, o alinhamento foi inspecionado e editado manualmente utilizando BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007), em que o modelo de Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) foi empregado para as reconstruções filogenéticas, com valores de *bootstrap* a partir de 5000 re-amostragens, esses valores estão indicados nos nós internos que representam a ocorrência deste nó nas 5000 réplicas geradas.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE A:
BIODIVERSIDADE BACTERIANA**

4.1 Amplificação do 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA de *Bacteria* foi realizada com os *primers* 27F e 1492R, para amplificar especificamente uma região de aproximadamente 1465 pb do gene 16S rRNA, como exemplificado na figura 4. A PCR foi bem sucedida para os treze pontos de coleta.

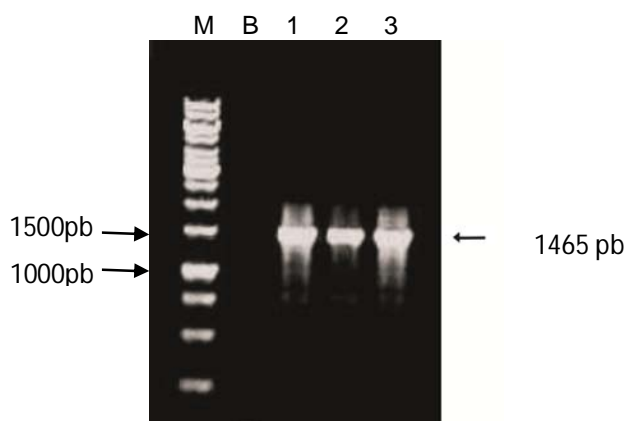


Figura 4 – Exemplos de amplificação do 16S rRNA bacteriano de DNA extraído de filtrados de diferentes pontos de coleta. A banda amplificada possui 1465 pb. M: Marcador molecular 1kb “Gene Ruler”; B: Reação sem DNA; 1-3: Amostras do Rio Solimões

4.2 Análises das sequências de 16S rRNA

Para cada ponto de coleta, foram sequenciadas 288 sequências, exceto para a amostra do Rio Solimões – 6S, onde foram sequenciadas 192.

Após o tratamento das sequências, um total de 2.934 sequências de boa qualidade foram obtidas a partir dos treze pontos amostrados, sendo utilizadas para análise da diversidade bacteriana. A quantidade de sequências utilizadas para a análise em cada ponto de coleta é indicada na tabela 2.

Tabela 2 – Número de sequências utilizadas para análise da diversidade bacteriana em cada local amostrado

Local de coleta	ID	# sequências
Foz do Rio Urucu	9U	209
Rio Solimões TSOL	8S	206
Rio Solimões	6S	167
Foz do Rio Purus	4P	233
Rio Solimões depois da mistura das águas do Rio Purus	4S	254
Rio Solimões	3S	184
Rio Solimões	1S	241
Lago Poraquê	8LP	234
Lago Sodré	7L	244
Lago Ananá	5L	264
Lago Grande de Manacapuru	3L	241
Lago Preto	2L	253
Lago Baixio	1L	204

Nas amostras coletadas, foi observada uma grande quantidade de sequências com mais de 95% de identidade com organismos não cultivados, chegando a 40% do total de sequências na amostra 1S (figura 5). Algumas sequências também apresentaram uma porcentagem de identidade inferior a 95% e, dessa forma, não utilizadas para identificação em nível de gênero e espécie, chegando a quase 40% em algumas amostras como 6S e 1L (figura 5). Além disso, em algumas amostras, como a 8S, mais de 70% das sequências foram identificadas com mais de 95% de identidade (figura 5).

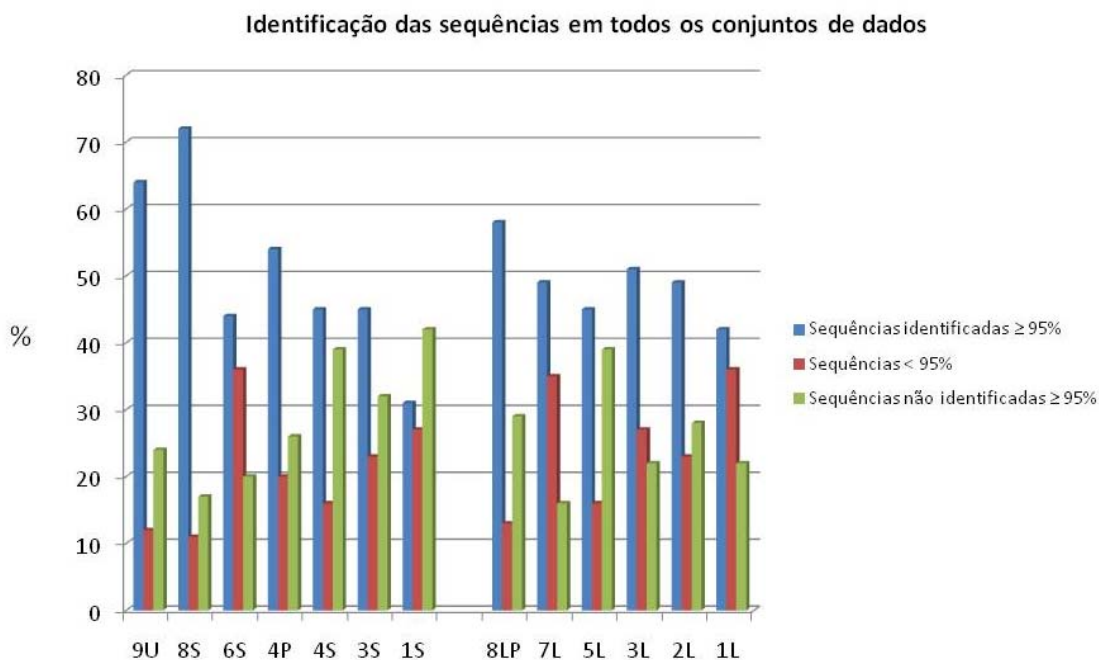


Figura 5- Porcentagem de sequências identificadas com $\geq 95\%$ (azul), sequências $< 95\%$ (vermelho) e sequências não identificadas $\geq 95\%$ (verde) em todas as amostras de rios e lagos da Amazônia

4.3 Diversidade bacteriana

A partir das sequências 16S rRNA, foram gerados treze gráficos para o Domínio *Bacteria*, sendo sete para as amostras de rios e seis para as amostras de lagos. O filo *Proteobacteria* foi representado pelas suas classes (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*), devido à sua abundância nos ambientes.

Em todas as amostras, o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante (figuras 6 e 7). A classe *Betaproteobacteria* foi a mais encontrada em quase todas as amostras de rios, com exceção do Rio Solimões próximo ao Município de Codajás (6S), onde a classe *Alphaproteobacteria* foi mais abundante (figura 6). Em alguns casos, foram encontradas porcentagens equivalentes entre as classes *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, como no caso do Rio Purus (4P) com 32% de cada (figura 6). Já nas amostras de lago, houve uma maior variabilidade nas sequências de táxons superiores, em alguns casos com quase as mesmas porcentagens para *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, como por

exemplo, no Lago Baixo (1L) e no Lago Grande de Manacapuru (3L) (figura 7). O Lago Poraquê apresentou 77% das suas sequências representadas por *Betaproteobacteria* (figura 7).

Estudos realizados em ambientes de água doce têm sugerido que esses ambientes diferem de ambientes marinhos, pela predominância de organismos da classe *Betaproteobacteria* e por representantes da classe *Actinobacteria* (ZWART *et al.*, 2002; PERCENT *et al.*, 2008). Micro-organismos presentes no filo *Actinobacteria* foram observados em todas as amostras de rios e lagos da Amazônia, chegando a 18% na amostra 6S (figura 6).

A dominância das classes *Gammaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* é comum em sistemas marinhos, no entanto, a amostra 7L mostrou uma prevalência da classe *Gammaproteobacteria* com 39% (figura 7). Esse padrão também foi observada em lagos no Parque Adirondack nos Estados Unidos, onde a classe *Gammaproteobacteria* também foi dominante (PERCENT *et al.*, 2008). A classe *Alphaproteobacteria* representou o grupo mais abundante na amostra 6S com 31% (figura 6), diferindo de uma noção geral de que eles são mais abundantes em ambientes marinhos. No entanto, esse resultado também foi observado no lago Biwa (Japão) (NISHIMURA & NAGATA, 2007).

Os filios *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia* também representam uma fração significativa das comunidades de água doce (NISHIMURA & NAGATA, 2007). O filo *Bacteroidetes* foi observado nas amostras de rios (9U, 8S, 6S, 4S e 1S) (figura 6) e lagos (5L e 2L) (figura 7) com uma quantidade significativa, chegando a 12% na amostra 1S. Por outro lado, o filo *Verrucomicrobia* foi observado nas amostras de rios (4P, 4S e 1S) (figura 6) e nas de lagos (5L, 3L e 2L) (figura 7), porém com uma porcentagem menos representativa, máximo de 5% na amostra 5L.

Os filios *Planctomycetes* e *Acidobacteria* foram anotados para poucas sequências em algumas amostras de rios. O filo *Planctomycetes*, foi observado nas amostras do Rio Solimões 6S, 3S e 1S, com 2%. Já o filo *Acidobacteria*, foi encontrado no Rio Purus (4P), nas amostras do Rio Solimões 4S e 1S, chegando a 8% na amostra 1S (figura 6). Nas amostras de lagos, foram encontradas sequências para *Planctomycetes* em apenas duas amostras, no Lago do Baixo (1L), com 4%, e no Lago Sodré (7L), com 3%, e nenhuma para *Acidobacteria* (figura 7). *Acidobacteria* é abundante em amostras de solo, e parece ser pouco representada em ambientes de água doce (ZWART *et al.*, 2002), o que explicaria a baixa representatividade nas

amostras da Amazônia. No entanto, *Planctomycetes* são conhecidos por serem membros típicos e generalizados de água doce e ecossistemas marinhos (GLOCKNER *et al.*, 1999).

Sequências identificadas como sendo do filo *Cyanobacteria* nas amostras de rios, com porcentagem significativa, foram observadas apenas na amostra do Rio Urucu (9U), com 5% (figura 6). Isso indica uma presença muito reduzida de microorganismos fotossintéticos, fato que pode ser explicado pela natureza relativamente dinâmica desses ambientes. No entanto, quatro das seis amostras de lagos apresentaram cerca de 8% das sequências para cianobactérias, no Lago Baixio (1L), chegando até 24% no Lago Sodré (7L) (figura 7). A grande presença de representantes do filo *Cyanobacteria* em amostras de lagos indica a natureza estagnada destas águas, que têm melhor disponibilidade de luz para a produtividade fotossintética. Os 5% observados na amostra do Rio Urucu (9U) pode ser devido ao fato de que a coleta foi realizada na foz desse rio, próximo à desembocadura no Lago de Coari, onde há menor correnteza.

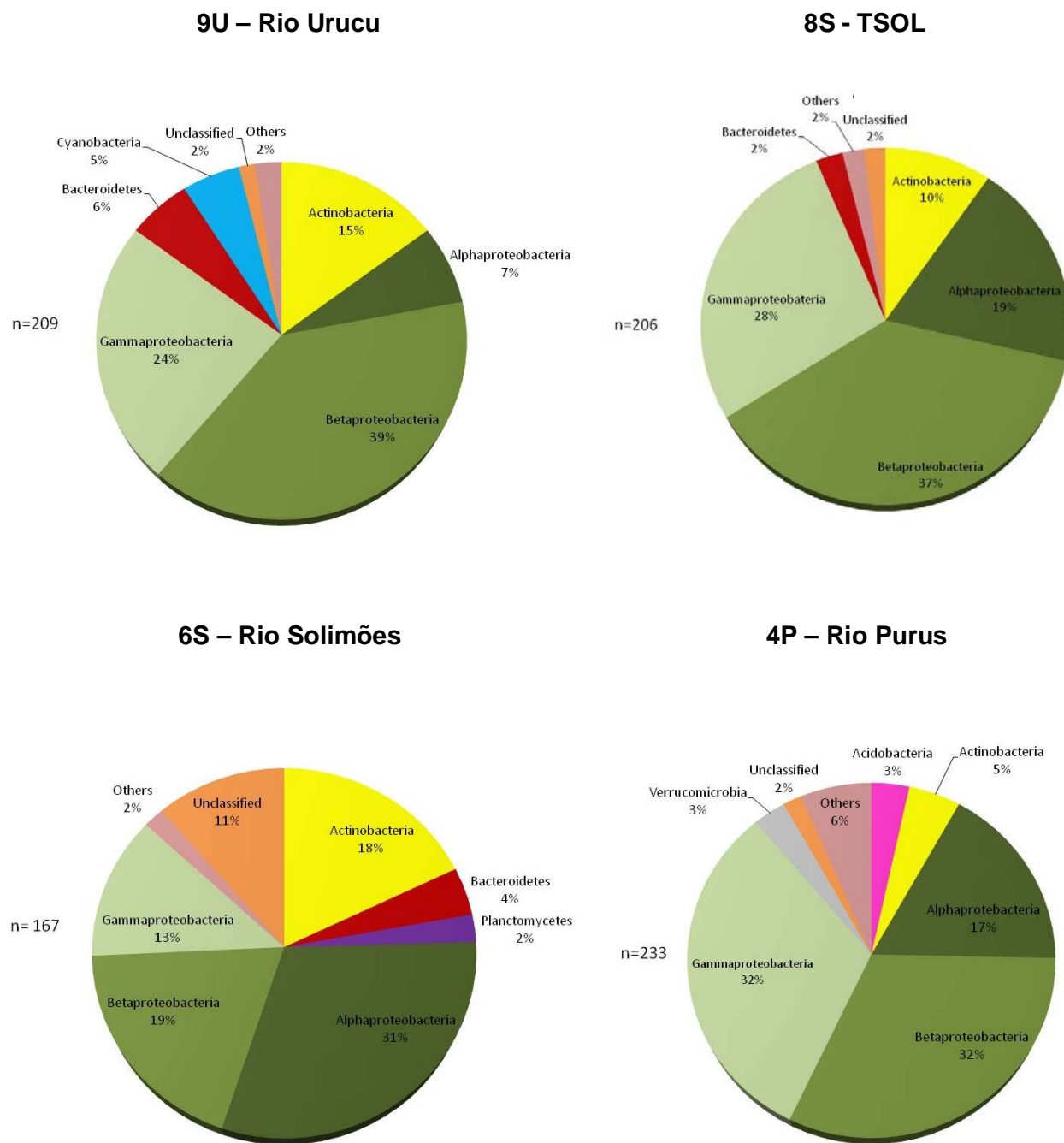
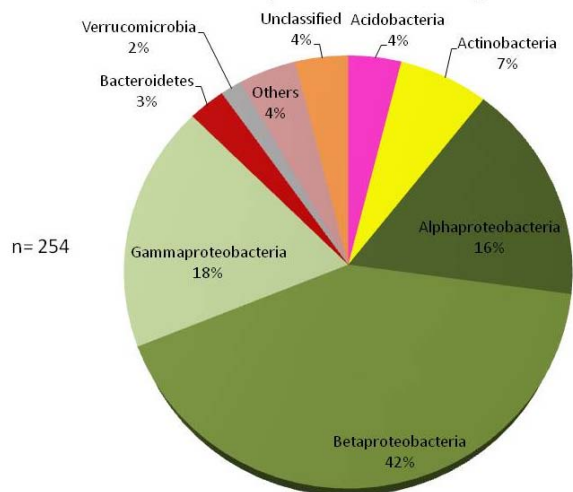
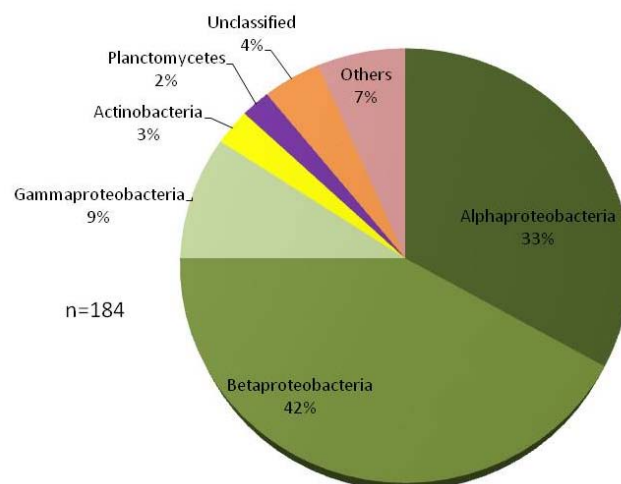


Figura 6 - Classificação em nível taxonômico superior de todas as amostras de rios

4S – Rio Solimões depois da mistura das águas do Rio Purus



3S – Rio Solimões



1S – Rio Solimões

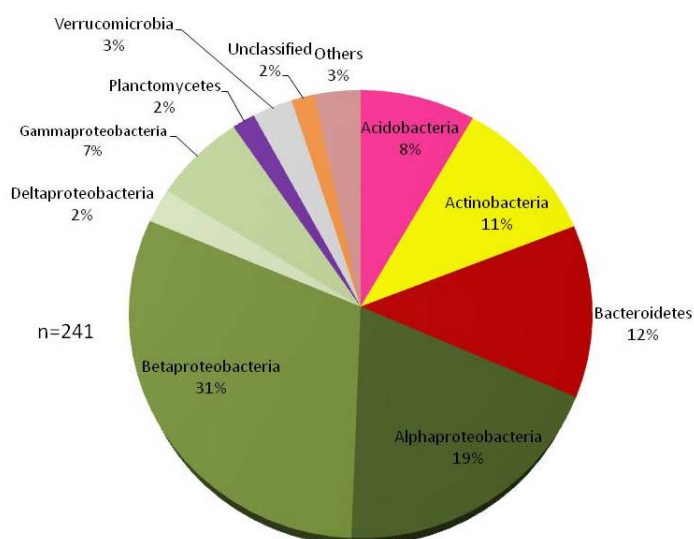
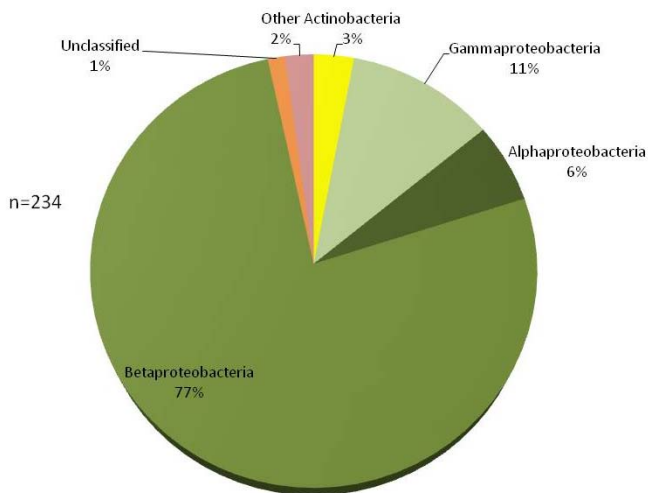
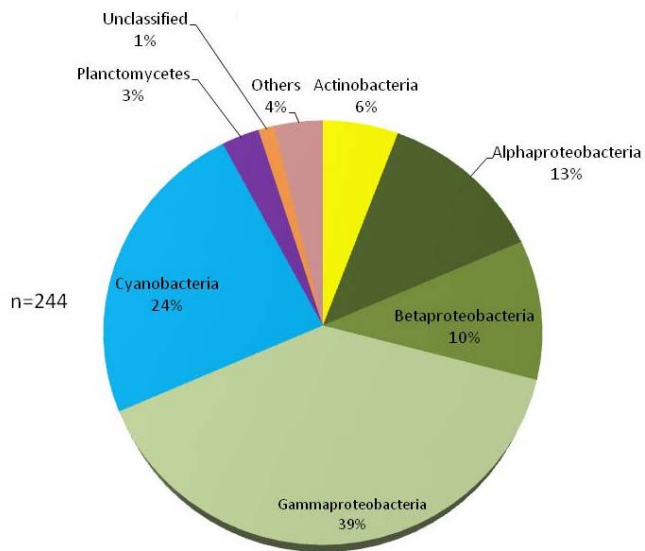


Figura 6 - Classificação em nível taxonômico superior de todas as amostras de rios

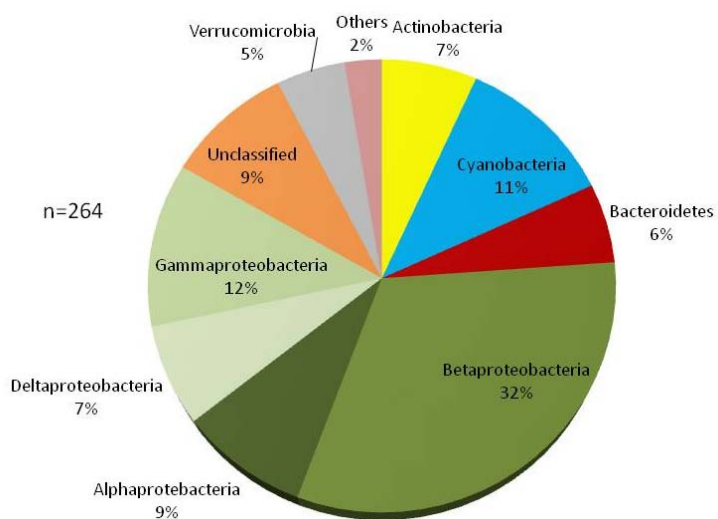
8LP – Lago Poraquê



7L – Lago Sodré



5L – Lago Anan 



3L – Lago Grande de Manacapuru

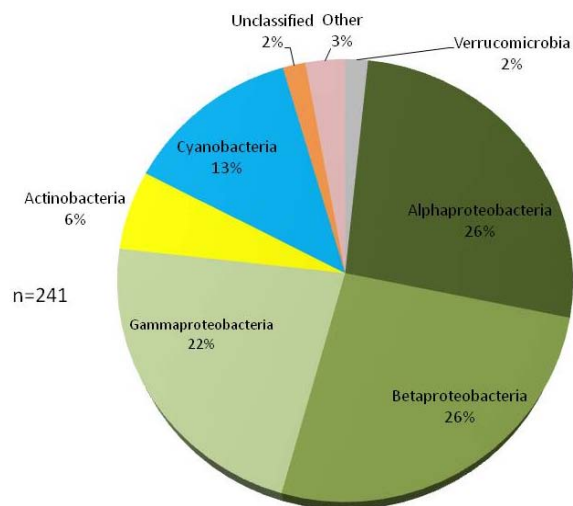


Figura 7– Classifica o em nível taxonômico superior de todas as amostras de lagos

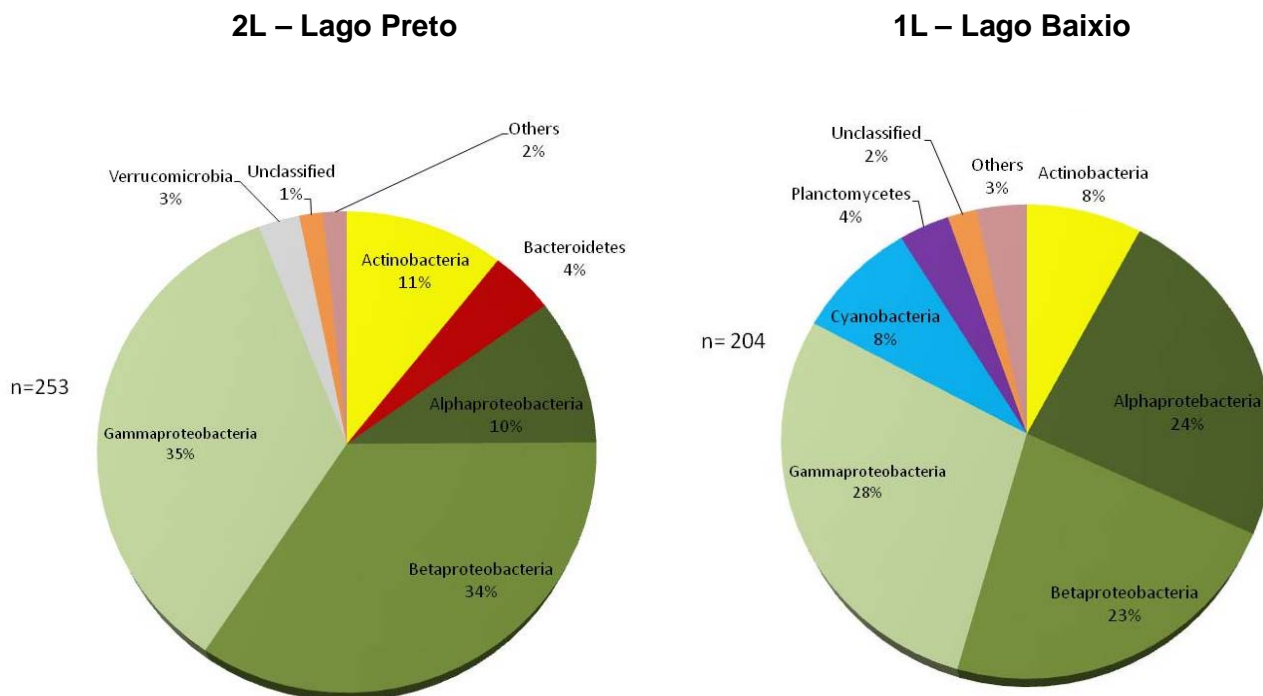


Figura 7– Classificação em nível taxonômico superior de todas as amostras de lagos

É possível notar uma grande diversidade em todas as amostras analisadas. Na figura 8, mostrada a seguir, é dada uma visão geral de todas as amostras coletadas nos rios. Nota-se um padrão variável de distribuição dos filos nas diferentes amostras. Embora tais diferenças existam, eles estão presentes em praticamente todas elas, com raras exceções. Uma das exceções é o filo *Acidobacteria*, que aparece em algumas amostras. Interessantemente, nota-se a presença deste filo no rio Purus (4P) e no Solimões após a foz do Purus (4S). Isso demonstra que há contribuições diferentes dos afluentes do Solimões. No caso de *Acidobacteria*, ele foi encontrado em pequena quantidade na amostra TSOL pirosequenciada, indicando que poderíamos encontrá-la em outros pontos se aumentássemos o número de sequências 16S realizadas. Surpreendentemente, este filo foi encontrado também na amostra 1S do rio Solimões, aquela mais próxima de Manaus. Como discutido anteriormente, este filo é comum em solo, e provavelmente estas amostras foram coletadas com maior influência de material de solo.

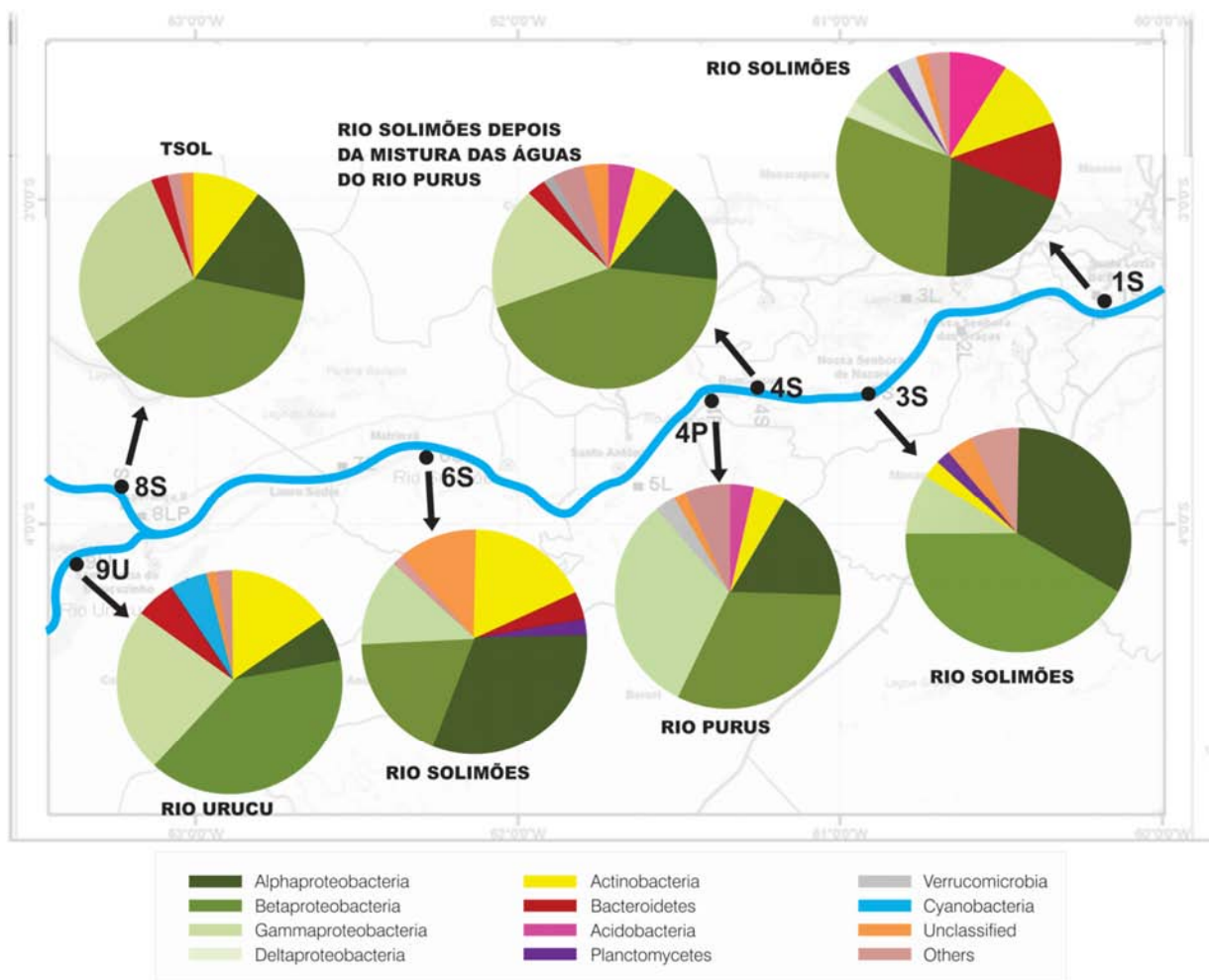


Figura 8 – Diversidade microbiana ao longo do Rio Solimões, Rio Uruçu e Rio Purus

Na figura 9, é dada uma visão geral de todas as amostras de lagos da região amazônica, notando uma grande diversidade nesses ambientes.

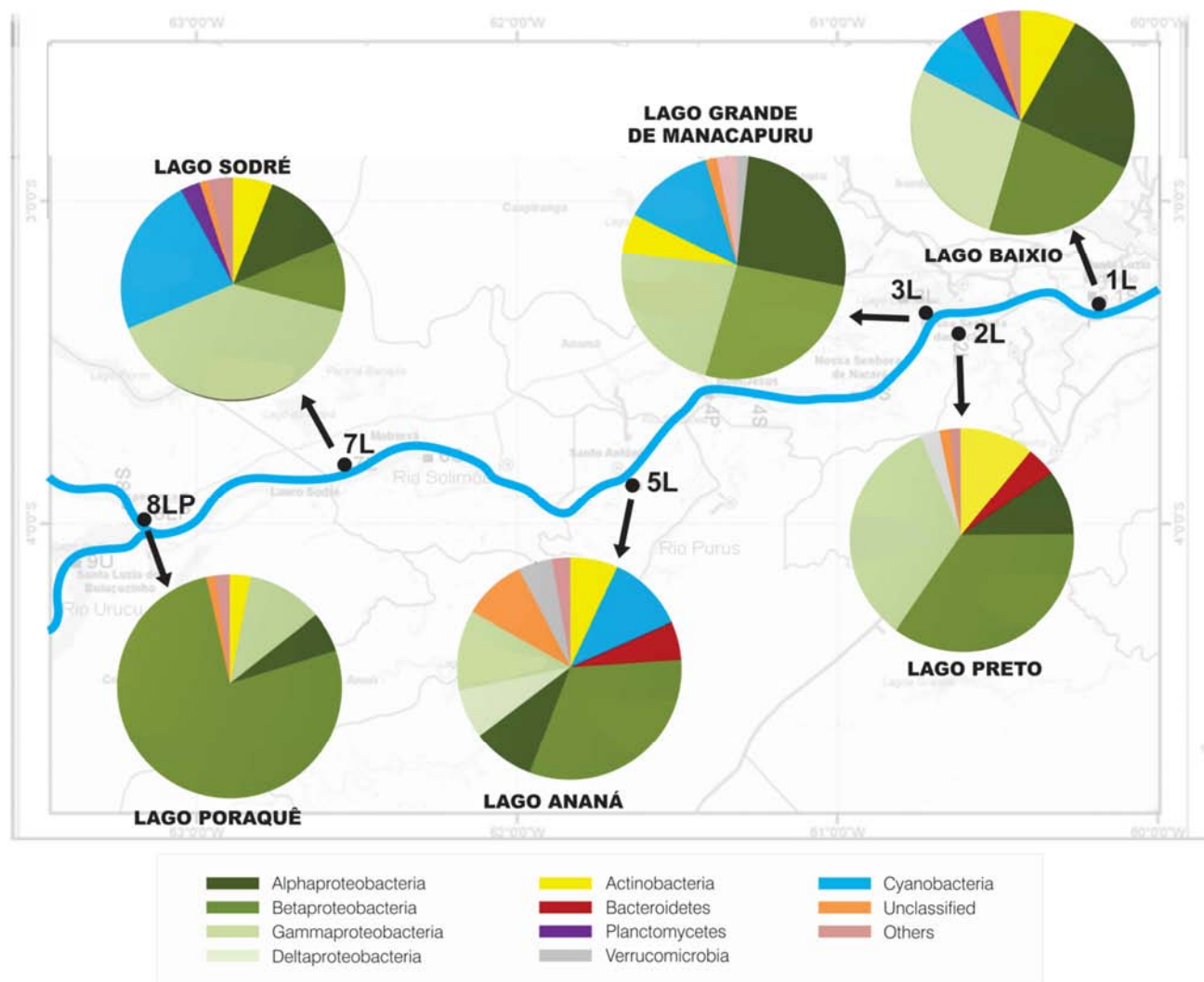


Figura 9 – Diversidade microbiana nos lagos adjacente ao Rio Solimões

4.3.1 Diversidade bacteriana nas amostras de rios e lagos da Amazônia

Como pode ser observado na figura 10, as amostras 8S e 4S se mostraram mais diversas em relação ao número de diferentes gêneros encontrados (nove gêneros). No entanto, a amostra 8S apresentou um maior número de sequências associadas com o gênero *Acinetobacter* e *Aquabacterium* e a presença do gênero *Ilumatobacter* não foi observada na amostra 4S. Enquanto que, na amostra 4S, foram observadas sequências associadas com o gênero *Methylomonas*, dado não observado na amostra 8S. Com relação à amostra 6S, se mostrou menos diversa (sete gêneros).

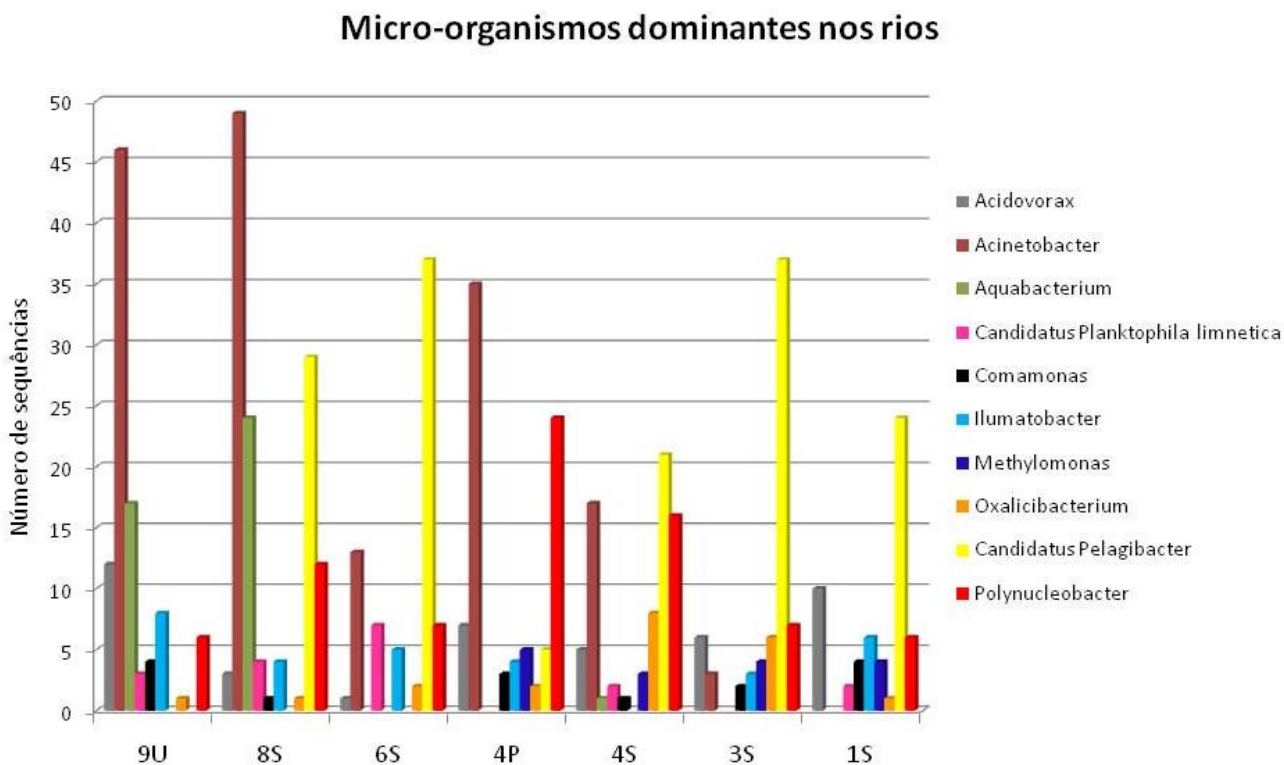


Figura 10 - Diversidade microbiana nas amostras de rios com mais de 95% de similaridade com sequências do banco de dados Ez Taxon

Análise realizada com base no número de espécies encontradas em cada amostra de rio mostrou que a amostra 9U e 4P apresentaram o maior número de sequências associadas com espécies descritas (doze espécies) (tabela 3). Além disso, a amostra 6S e 1S se mostraram menos diversas em relação ao número de espécies (cinco espécies) (tabela 3). Apesar de ter sido observado um número maior de espécies na amostra 3S em relação às amostras 6S e 1S, poucas sequências foram associadas com as espécies observadas, um máximo de quatro sequências para *Polynucleobacter acidiphobus* MWH-PoolGreen A3 (tabela 3).

Tabela 3– Espécies encontradas nas amostras de rios da Amazônia com mais de 97% de similaridade com sequências do banco de dados Ez Taxon

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3 (T)	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3 (T)	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1 (T)	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81 (T)	5						

Já nas amostras de lagos, o lago Baixio (1L) se mostrou mais diverso (dez gêneros), enquanto que o Lago Poraquê (8LP) apresentou o menor número de gêneros (seis), mais foi a amostra com o maior número de sequências associadas com o gênero *Polynucleobacter* (figura 11).

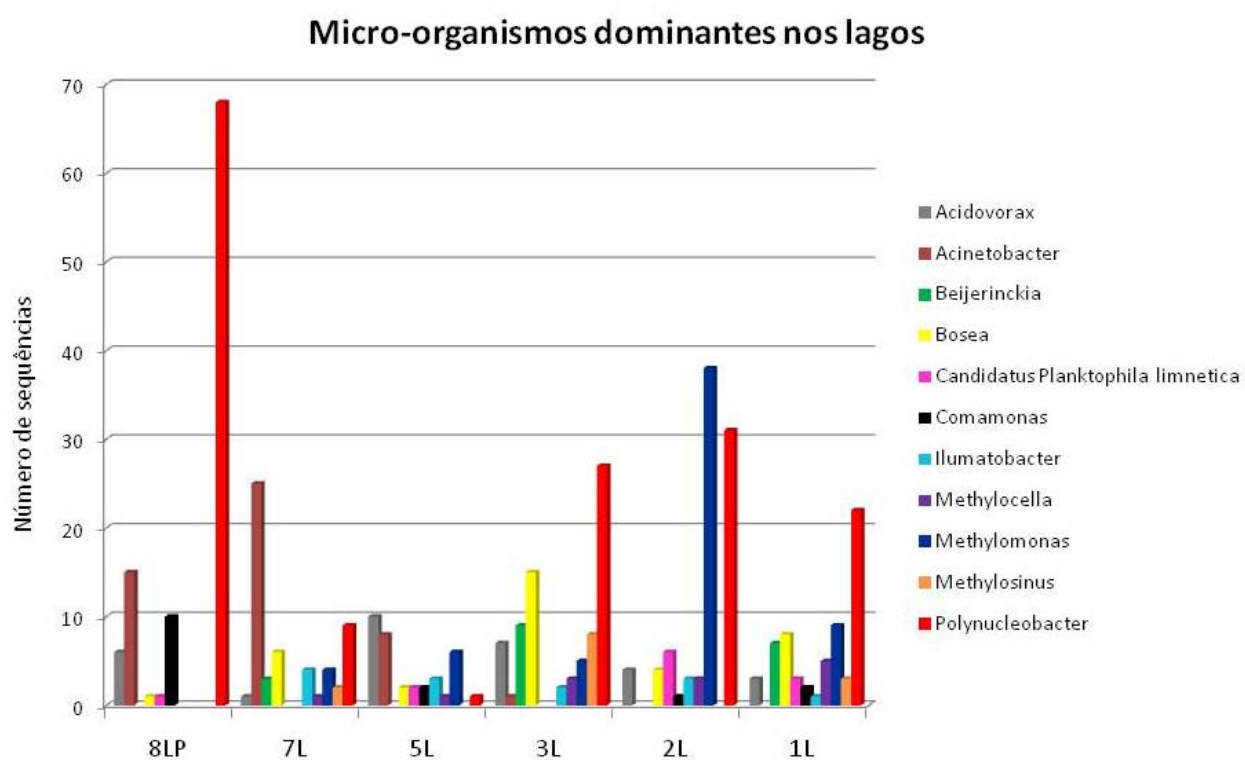


Figura 11 - Diversidade microbiana nas amostras de lagos com mais de 95% de similaridade com sequências do banco de dados Ez Taxon

Apesar da amostra 8LP ter apresentado o menor número de gêneros, foi aquela onde mais espécies diferentes foram encontradas, inclusive com espécies que só foram observadas nessa amostra (tabela 4). Enquanto que a amostra 1L, que foi a mais diversa em relação ao número de gêneros, foi uma das amostras que apresentou um menor número de espécies diferentes (seis), assim como as amostras 2L e 3L (seis) (tabela 4).

Tabela 4 – Espécies encontradas nas amostras de lagos da Amazônia com mais de 97% de similaridade com sequências do banco de dados Ez Taxon

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Como mostra a figura 12 os gêneros *Aquabacterium*, *Pelagibacter* e *Acinetobacter* foram mais observados nas amostras de rios, enquanto que o gênero *Comamonas* foi representado igualmente nas amostras de rios e lagos e os gêneros *Synechococcus*, *Methylocaldum* e *Cyanobium* foram abundantes nas amostras de lagos.

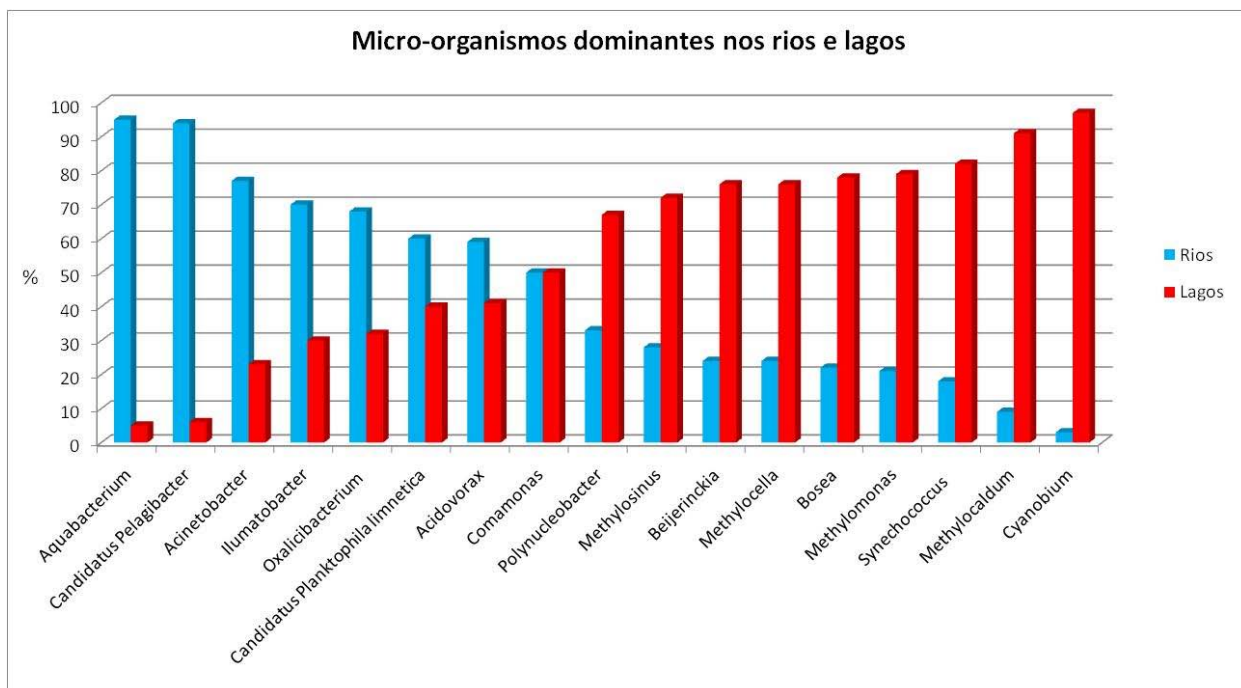


Figura 12 – Abundância dos organismos nas amostras de rios e lagos

4.3.2 Bactérias típicas de água doce

A classe *Betaproteobacteria* foi encontrada como predominante nas amostras analisadas e, dentro desta classe, encontra-se o gênero *Polynucleobacter*, que foi observado em todas as amostras de rios (figura 13) e lagos (figura 14) estudados. Sua abundância maior foi observada nas amostras de lagos (figura 15). A presença de espécies do gênero *Polynucleobacter* era esperado, já que é o taxa de água doce mais bem conhecido e amplamente distribuído, sendo isolado tanto

em habitats lânticos quanto lóticos em todo o mundo (HAHN, 2003; JEZBEROVÁ *et al.*, 2010).

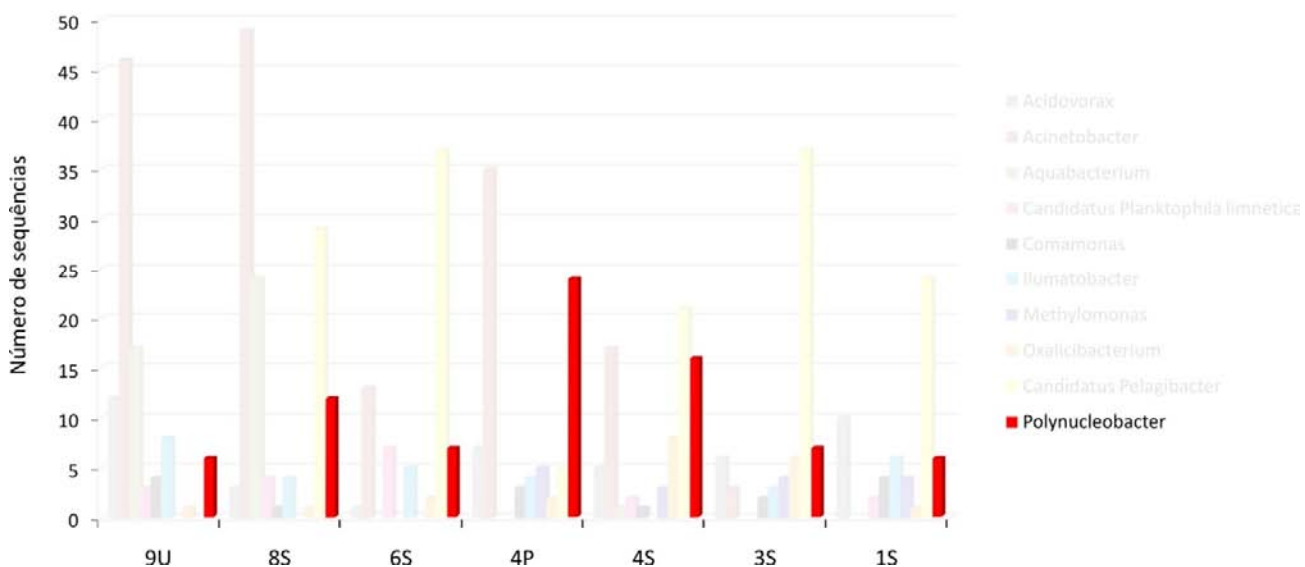


Figura 13- Abundância do gênero *Polynucleobacter* (vermelho) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

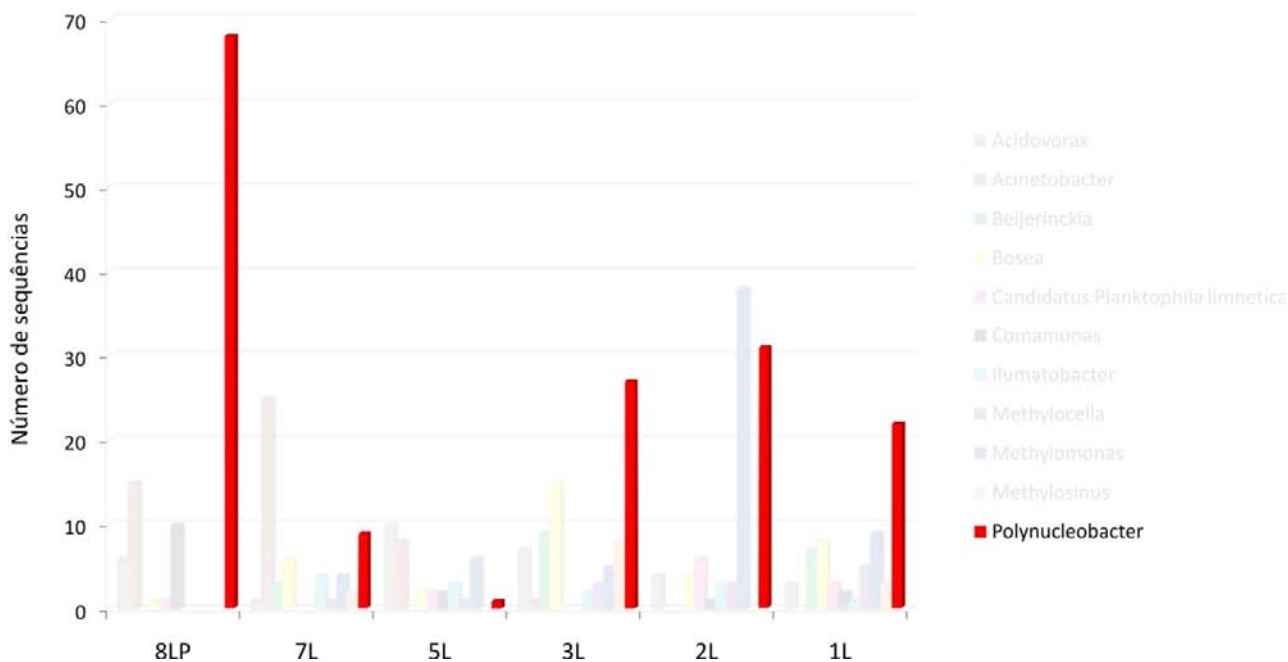


Figura 14- Abundância do gênero *Polynucleobacter* (vermelho) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

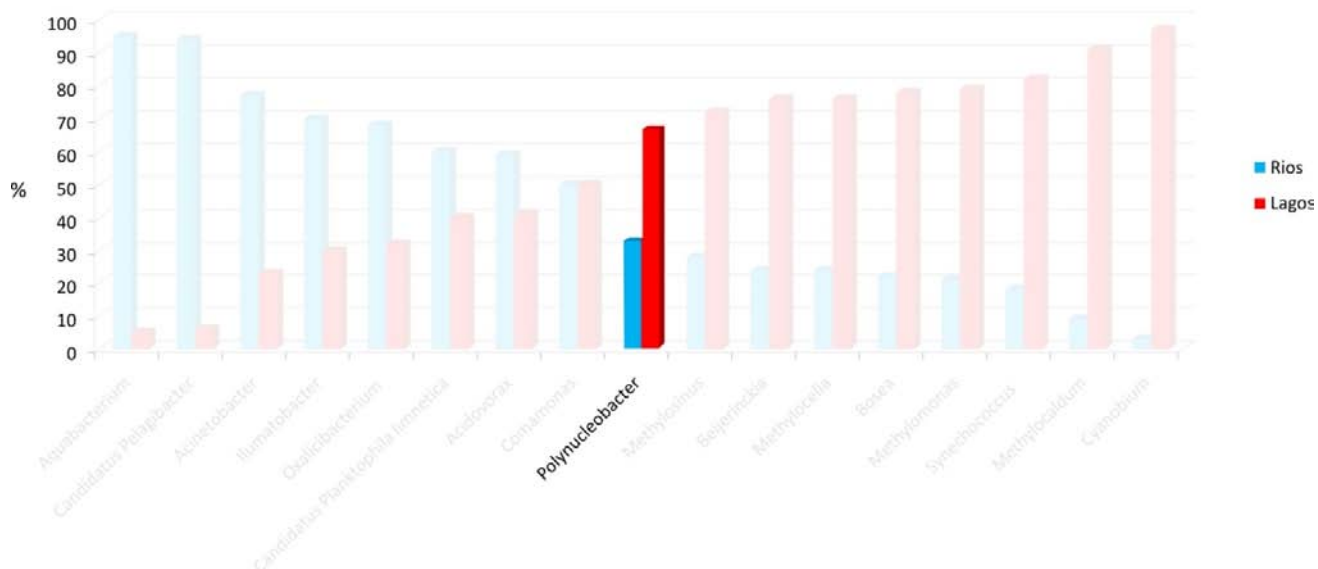


Figura 15 – Representatividade do gênero *Polynucleobacter* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Muitos estudos utilizando métodos independentes de cultivo para a exploração da diversidade bacteriana em habitats de água doce, marinhos e terrestres têm sido realizados. Eles têm revelado uma distribuição cosmopolita de bactérias do gênero *Polynucleobacter* em ambientes de água doce (HIORNS *et al.*, 1997; ZWART *et al.*, 2002; BURKERT *et al.*, 2003; HAHN *et al.*, 2005; JEZBEROVÁ *et al.*, 2010). O gênero *Polynucleobacter* e a espécie *Polynucleobacter necessarius* foram descritos por Heckmann e Schmidt (1987) como sendo endosimbionte de ciliados de água doce do gênero *Euplotes*. No entanto, em 2003, Hahn isolou organismos relacionados ao endosimbionte *Polynucleobacter necessarius* em vários habitats de água doce. Posteriormente, foi adicionada à descrição do gênero *Polynucleobacter* e à espécie *Polynucleobacter necessarius* a descrição de organismos de vida livre e, conseqüentemente, a separação da espécie *Polynucleobacter necessarius* em duas subespécies, diferindo no estilo de vida: *Polynucleobacter necessarius subsp. necessarius* (endosimbionte de *Euplotes aediculatus* e *Euplotes harpa*) e *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* (organismos exclusivamente de vida livre) (HAHN *et al.*, 2009).

A subespécie *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* possui crescimento quimiorganotrófico, aeróbio, com pelo menos algumas cepas sendo anaeróbias facultativas. Ela habita como células planctônicas não-móveis de vida livre a coluna de água de sistemas de água doce (HAHN *et al.*, 2009; JEZBEROVÁ *et al.*, 2010), apresentando uma distribuição cosmopolita e uma ocorrência ubíqua em habitats lênticos de água doce (JEZBERA *et al.*, 2011).

Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus habita uma grande variedade de habitats de água doce, incluindo alcalinos (HAHN, 2003; WU & HAHN, 2006) lagos e lagoas ácidas (BURKERT *et al.*, 2003; HAHN *et al.*, 2005; PERCENT *et al.*, 2008), rios (SEKIGUCHI *et al.*, 2002; CRUMP & HOBBIIE, 2005), lagos oligotróficos, lagoas em sistemas de turfeiras e poças rasas temporárias em estradas florestais (JEZBEROVÁ *et al.*, 2010), não sendo observado em solos e ambientes marinhos. A detecção desta subespécie em todos os continentes demonstra a sua distribuição cosmopolita (HAHN, 2003), sendo considerado uma fração importante do bacterioplâncton de água doce. O táxon pode variar de <1% (WU & HAHN, 2006) a até 60% do número total de bactérias na coluna de água (HAHN *et al.*, 2005). Nas amostras de rios e lagos da Amazônia, sequências relacionadas com a subespécie *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* QLW-P1DMWA-1 foram encontradas em todas as amostras de rios variando de uma sequência na amostra 1S a até dezenove na amostra 4P (tabela 5). Já nas amostras de lagos, com exceção da amostra 5L, onde não observamos sequências relacionadas com essa subespécie, encontramos um mínimo de oito sequências na amostra 7L a até quarenta e duas no lago Poraquê (8LP) (tabela 6). Em trabalho realizado por Hahn *et al.* (2005), cerca de 60% do número total de bactérias na lagoa Kleine Lacke, nos Alpes austríacos (lagoa de água doce húmica, com pH ácido (4,3 - 6,0) e com baixa condutividade (7-52 $\mu\text{S cm}^{-1}$)), foram observados para a subespécie em questão. Os valores encontrados para pH e condutividade no lago Poraquê (8LP) (pH = 5 e condutividade = 17,3 $\mu\text{S cm}^{-1}$) se assemelham aos valores observados por Hahn *et al.*, (2005), sendo a amostra que apresentou o maior número de sequências relacionadas com a subespécie *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* QLW-P1DMWA-1 em relação a todos os pontos amostrados.

Tabela 5- Espécies do gênero *Polynucleobacter* encontradas nas amostras de rios. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Tabela 6 – Espécies do gênero *Polynucleobacter* encontradas nas amostras de lagos. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Baixa condutividade é típico de lagoas ácidas ricas em substâncias húmicas, e a abundância de *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* é parcialmente controlada pela baixa condutividade, pH e fatores ligados às concentrações de substâncias húmicas, que poderiam apoiar a hipótese de que essas bactérias utilizam substratos produzidos pela fotodegradação de substâncias húmicas (JEZBEROVÁ *et al.*, 2010). A baixa condutividade do lago Poraquê (8LP) nos leva a inferir que seja rico em substâncias húmicas. Desta forma, justifica-se uma maior abundância da subespécie na amostra em relação a todos os outros pontos, explicando os nossos resultados, em que cerca de 18% do número total de bactérias encontradas na coluna de água do lago Poraquê (8LP) foram da subespécie *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* QLW-P1DMWA-1, assim como 25% do número total de bactérias observados para o gênero *Polynucleobacter*.

No trabalho realizado por Jezbera *et al.* (2011), em habitats lênticos de água doce, foram observados baixos níveis de *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* em habitats com pH na faixa de neutro (6,5 – 7,5), dado semelhante às demais amostras da Amazônia (pH = 6,3 – 7,09).

Na amostra 2L, encontramos para umas das sequências relacionadas com a subespécie *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* QLW-P1DMWA-1 100% de identidade, enquanto que, nas demais amostras, encontramos máximos variando de 98% (8S, 6S) até 99,6% (8LP, 1L, 4P, 1S). A subespécie *Polynucleobacter* QLW-P1DMWA-1 já foi anteriormente observada no metagenoma da Amazônia (GHAI *et al.*, 2011), mais uma evidência da distribuição cosmopolita dessa bactéria em ambientes de água doce.

Outra espécie observada foi *Polynucleobacter cosmopolitanus*, que é a segunda espécie descrita do gênero *Polynucleobacter*, isolada de vários habitats de água doce, localizados em zonas climáticas temperada, subtropical e tropical. Métodos independentes de cultivo têm demonstrando uma ampla distribuição geográfica, indicando distribuição cosmopolita desta espécie (fato que deu origem a seu nome), isolada e detectada nas colunas de água corrente e habitats de água doce estagnada, como lagoas, lagos e córregos, assim como em um estudo metagenômico realizado em dois estuários (HAHN *et al.*, 2010a). *Polynucleobacter cosmopolitanus* habita a coluna de água de ambientes de água doce, podendo ocorrer em ambientes oligosalinos, porém estão ausentes em oceanos, ambientes

hipersalinos e ambientes terrestres. Esta espécie apresenta crescimento quimiorganotrófico, principalmente aeróbio, de vida livre (HAHN *et al.*, 2010a).

Sequências afiliadas com a espécie *Polynucleobacter cosmopolitanus* MWH-Molso2 foram observadas em quatro bibliotecas de 16S rRNA de lagos (8LP, 5L, 3L e 1L) (tabela 6) e em três bibliotecas de rios (8S, 4P e 4S) (tabela 5), com porcentagem de identidade máxima observada de 99,6% em uma sequência da amostra 4S.

Já a espécie *Polynucleobacter acidiphobus* foi isolada em 2011(a) por Hanh *et al.*, em uma piscina de rocha localizada no leito de um riacho de montanha na Córsega, França. Essa espécie possui um estilo de vida de vida livre e representa um grupo de bactérias planctônicas de água doce que ocorrem em abundância nesses habitats, não sendo detectadas, até o presente momento, em águas doces ácidas, águas com alta salinidade (ambientes marinhos) ou solo. São consideradas bactérias típicas de água doce (ZWART *et al.*, 2002; HAHN *et al.*, 2011a). Elas possuem crescimento quimiorganotrófico, aeróbio e anaeróbio facultativo, são mesófilas e os habitats onde a espécie foi detectada estão localizados em zonas climáticas temperada, subtropical e tropical (HAHN *et al.*, 2011a). Desta forma, não é surpresa encontrar micro-organismos relacionados com esta espécie nas bibliotecas de 16S rRNA da Amazônia.

Sequências com porcentagem de identidade maior que 97% com a espécie *Polynucleobacter acidiphobus* MWH-PoolGreen A3, também foram observadas em todas as amostras de rios analisadas, encontrando de uma (9U) a oito (4S) sequências para esta espécie (tabela 5). Uma amostra de lago (3L) apresentou uma sequência relacionada com a espécie em questão (dado não mostrado).

Interessantemente, nas treze bibliotecas de 16S rRNA construídas, observamos a presença de oito sequências com similaridade entre 97 e 98% para a espécie *Polynucleobacter rarus* MT-CBb6A5 em apenas uma das bibliotecas, a do lago Poraquê (8LP) (tabela 6). A espécie *Polynucleobacter rarus* foi isolada de um lago ácido em Wisconsin (USA) (NEWTON *et al.*, 2006) e caracterizada por Hahn *et al.* (2011b). A espécie possui crescimento quimiorganotrófico, aeróbio, com crescimento anaeróbico na presença de nitrato, habitando ambientes mesófilos.

Este táxon representa um contraste com as espécies *Polynucleobacter necessarius* *subsp. asymbioticus* e *Polynucleobacter cosmopolitanus*, sendo considerada uma espécie rara. Uma busca BLAST com a sequência quase

completa do gene 16S rRNA referente à espécie *Polynucleobacter rarus* resultou em apenas nove *hits* com similaridade maior que 97% em lagos na Espanha, Nova York, Japão, Estados Unidos, em dois estuários (Baía Chesapeake e Baía Delaware) e, em um lago ártico, parecendo ser relativamente raro no ambiente (HAHN *et al.*, 2011b). Dado interessante, e que também pôde ser observado no presente trabalho.

É provável que a espécie *Polynucleobacter rarus* prefira habitar ambientes ácidos. No entanto, existem até o momento poucos dados disponíveis para esse táxon, permitindo apenas conclusões preliminares (HAHN *et al.*, 2011b). A presença de sequências relacionadas com a espécie *Polynucleobacter rarus* MT-CBb6A5 em apenas uma biblioteca das treze construídas, o lago Poraquê (8LP), explica-se pela presença singular de um pH mais ácido (pH=5) enquanto que as demais amostras apresentam um pH mais próximo de neutro (~pH=6,5) (tabela 1). Isso reforça a preferência da espécie por ambientes mais ácidos e contribui para futuros estudos em relação à espécie *Polynucleobacter rarus*.

Na árvore filogenética construída para a amostra 8LP (figura 16), é possível observar que as sequências associadas com as espécies *Polynucleobacter cosmopolitanus* MWH-Molso2, *Polynucleobacter necessarius subsp. asymbioticus* QLW-P1DMWA-1 e *Polynucleobacter rarus* MT-CBb6A5 realmente se encontram próximas a elas. A relação das sequências da Amazônia com a espécie *Polynucleobacter acidiphobus* MWH-PoolGreen A3 pode ser confirmada na árvore filogenética construída para a amostra 1S (figura 17).

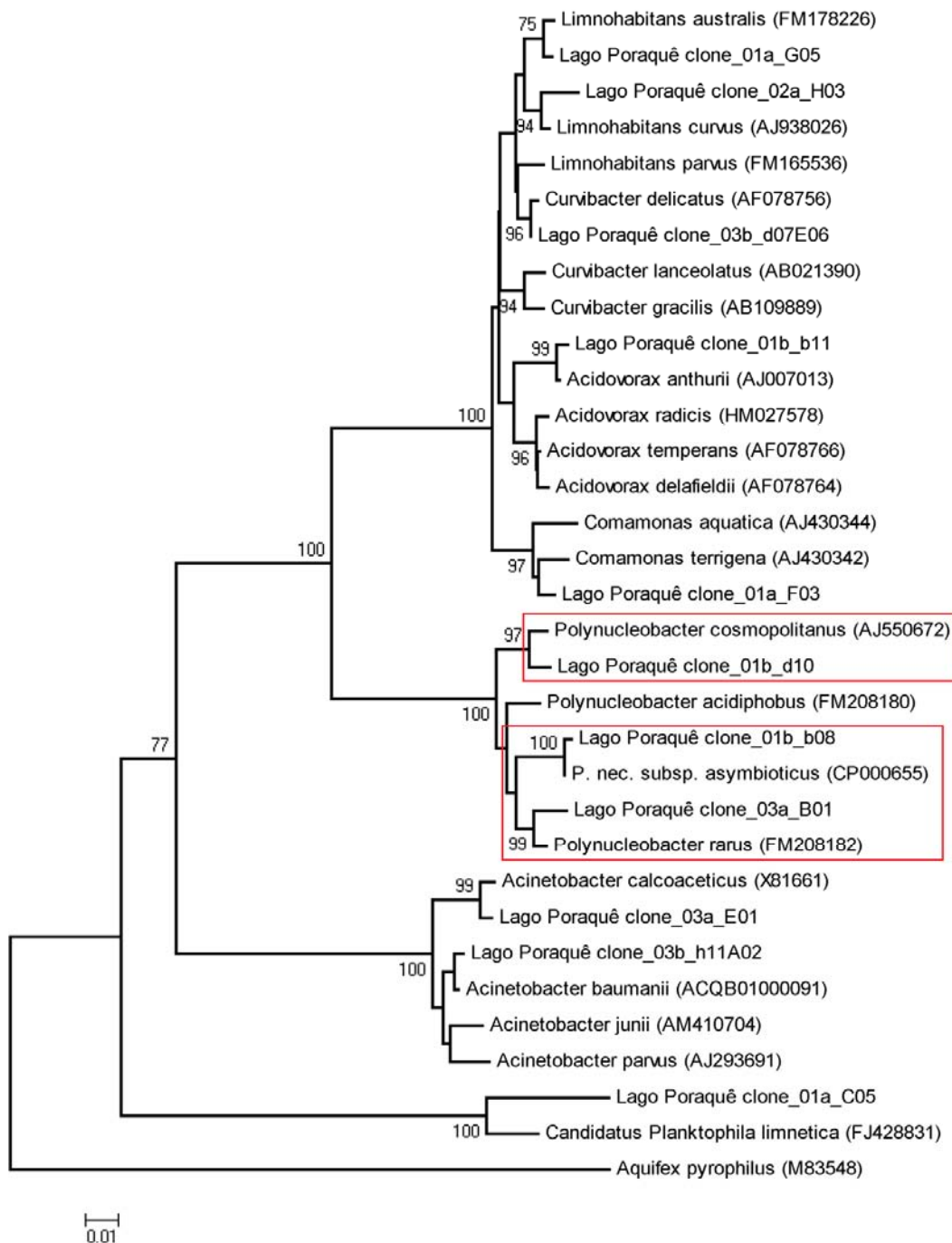


Figura 16 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Polynucleobacter* da amostra do Lago Poraquê (8LP). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

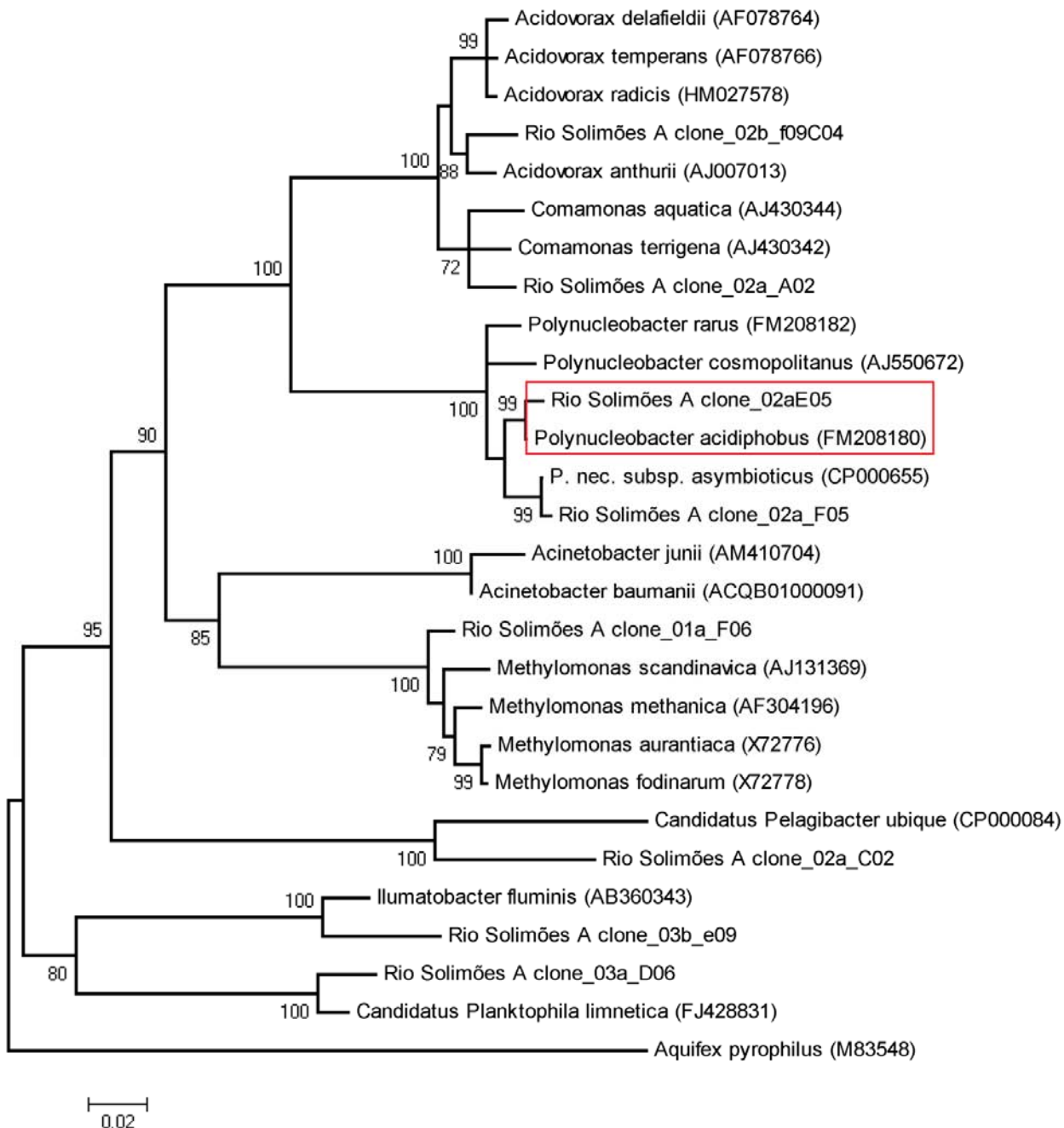


Figura 17 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Polynucleobacter* da amostra do Rio Solimões (1S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Hahn *et al.*, (2010b) propuseram um novo gênero dentro da família *Comamonadaceae* (*Betaproteobacteria*), o gênero *Limnohabitans* sp. Este gênero está relacionado com um grande número de sequências ambientais, resultantes de métodos independentes de cultivo em vários sistemas de água doce (ZWART *et al.*, 2002; PERCENT *et al.*, 2008; HAHN *et al.*, 2010c).

A espécie descrita por Hahn *et al.* (2010b), juntamente com o novo gênero proposto, é a espécie *Limnohabitans curvus* MWH-C5^T. Esta espécie foi isolada da coluna de água de um lago de água doce, Lago Mondsee, na Áustria, e está relacionada a um grande número de bactérias não cultivadas, observadas em ambientes de água doce por meio de métodos independentes de cultivo, com crescimento quimiorganotrófico, aeróbico, anaeróbico facultativo, não-móveis, não crescendo em concentrações de NaCl > 0,5 %.

Três sequências afiliadas com a espécie *Limnohabitans curvus* MWH-C5^T foram observadas no Lago Poraquê (tabela 7), com porcentagem de identidade de 97,9 %. No mesmo lago, foram observadas cinco sequências afiliadas com outra espécie do gênero *Limnohabitans*, a espécie *Limnohabitans australis* MWH-BRAZ-DAM2D^T (tabela 7), com cerca de 98 % de identidade. Esta espécie, isolada de uma lagoa de água doce no Brasil (São Carlos, SP), apresenta crescimento quimiorganotrófico, aeróbico, anaeróbico facultativo, não-móveis, não crescendo em concentrações de NaCl > 0,2 % (HAHN *et al.*, 2010c).

A relação das sequências da Amazônia com as espécies descritas acima também podem ser observadas na (figura 18).

Tabela 7 – Espécies do gênero *Limnohabitans* encontradas nas amostras de lagos. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

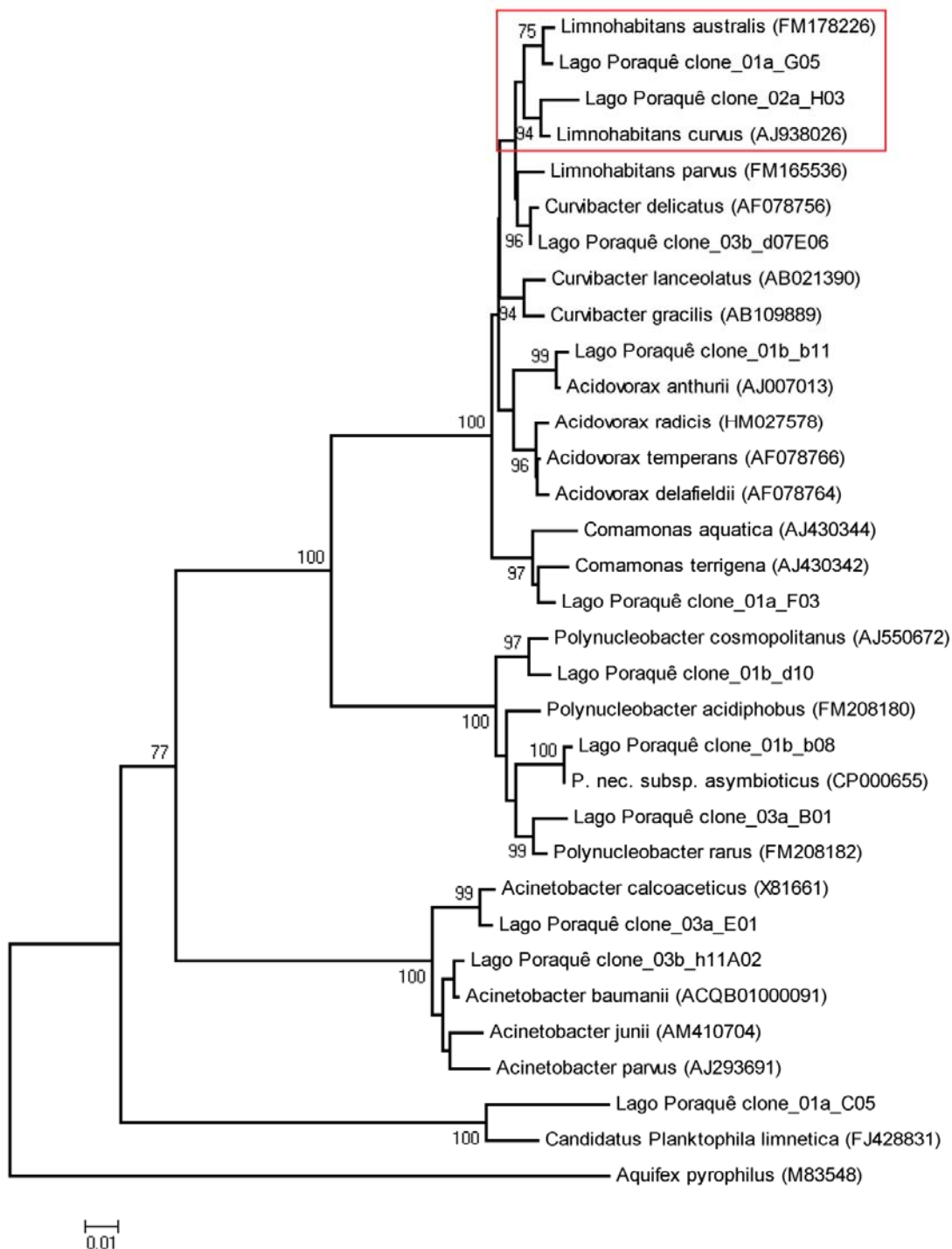


Figura 18 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Limnohabitans* da amostra do Lago Poraquê (8LP). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Como já mencionado, o filo *Actinobacteria* muitas vezes está presente em uma grande fração do bacterioplâncton nos ambientes de água doce (JEZBERA *et al.*, 2009). Entre esses grupos de *Actinobacteria* de água doce, estão presentes organismos da chamada linhagem acl, caracterizados por métodos independentes de cultivo, que muitas vezes representam uma das linhagens mais abundantes (NEWTON *et al.*, 2007; WARNECKE *et al.*, 2005; ZWART *et al.*, 2002). Bactérias associadas com esta linhagem foram observadas na coluna de água de uma ampla variedade de habitats de água doce (WARNECKE *et al.*, 2004; WARNECKE *et al.*, 2005; LINDSTROM *et al.*, 2005; NEWTON *et al.*, 2007), sendo encontradas em vários continentes e zonas climáticas, mas nunca em ambientes terrestres e marinhos (oceano aberto) (JEZBERA *et al.*, 2009).

Até o momento, esta linhagem não é representada por um táxon validamente descrito. Entretanto, em 2009, Jezbera *et al.*, propuseram a espécie candidata *Candidatus Planktophilia limnetica*, como um representante associado com a linhagem acl. Vale ressaltar que não foi possível isolar e cultivar esta cepa, o que dificultou a determinação de características fisiológicas.

Newton *et al.* (2007) demonstraram que os membros do clado acl – All, ao qual *Candidatus Planktophilia limnetica* pertence, exibem uma preferência por lagos mais alcalinos (pH de 8,6; 8,8; 8,9, onde foram mais abundantes). Todavia, foram observados em lagos com valores de pH variando de neutro a alcalino (6,5 a 8,9).

Sequências afiliadas com a espécie candidata *Candidatus Planktophilia limnetica* MWH-EgelM2-3 foram observadas tanto nas amostras de rios (figura 19) quanto nas de lagos (figura 20) em praticamente todos os pontos visitados, porém, um pouco mais representativa nos rios (figura 21). Um mínimo de uma sequência (8LP) (tabela 8) a um máximo de sete sequências (6S) (tabela 9) foram observados para a espécie candidata em questão. Os valores de pH dos locais coletados variaram de 5 a 7,09, o que pode explicar a baixa representatividade, já que, de acordo com Newton *et al.* (2007), a espécie candidata exibe preferência por habitats mais alcalinos. No entanto, uma sequência para a espécie candidata em questão foi observada em um lago com pH mais ácido (pH=5), o lago Poraquê (8LP), sendo possível, portanto, que ela seja encontrada em lagos levemente ácidos, porém em menor abundância.

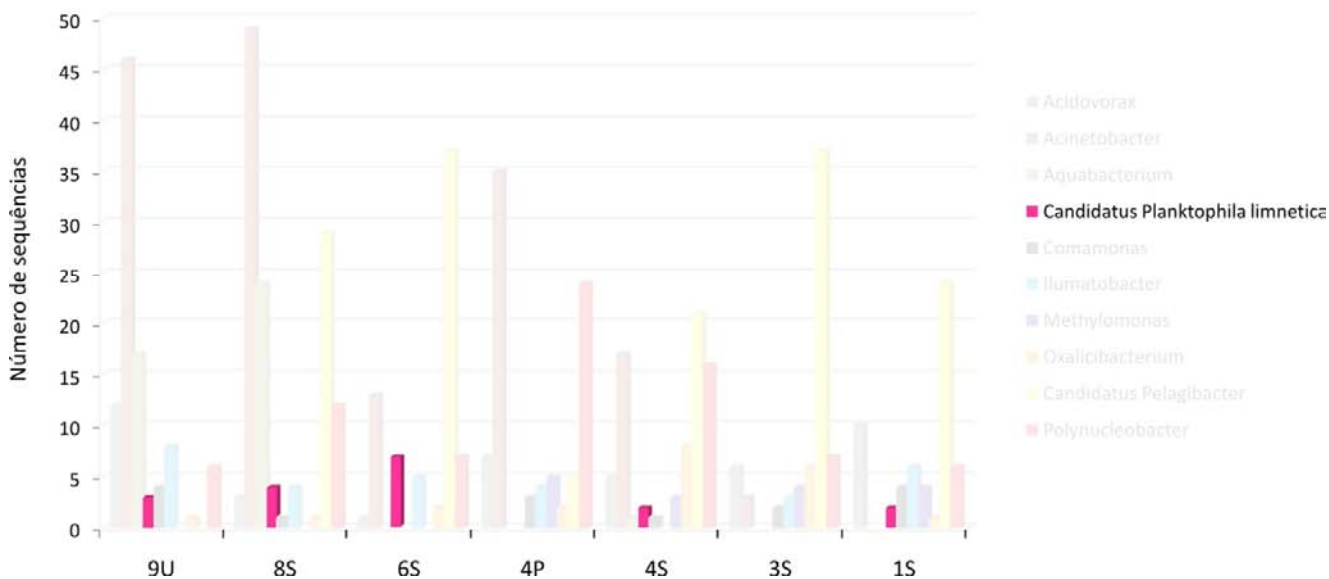


Figura 19- Abundância de *Candidatus Planktophilia limnetica* (rosa) nas amostras de rios. Na figura, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

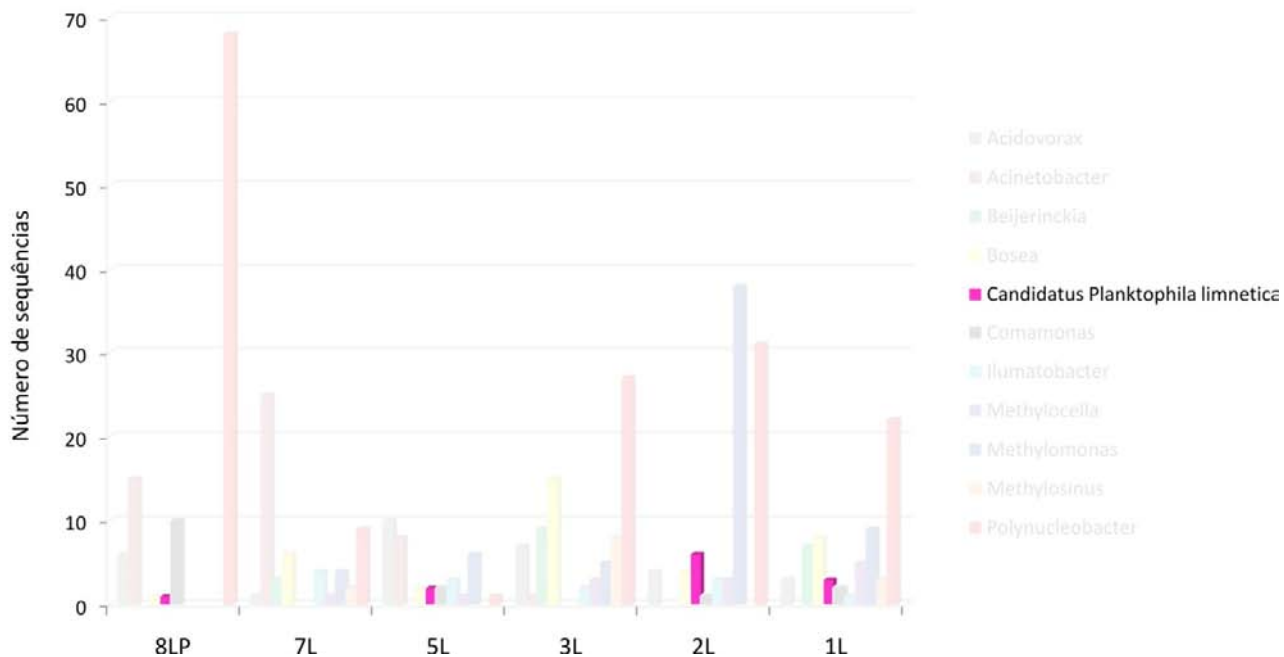


Figura 20- Abundância de *Candidatus Planktophilia limnetica* (rosa) nas amostras de lagos. Na figura, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

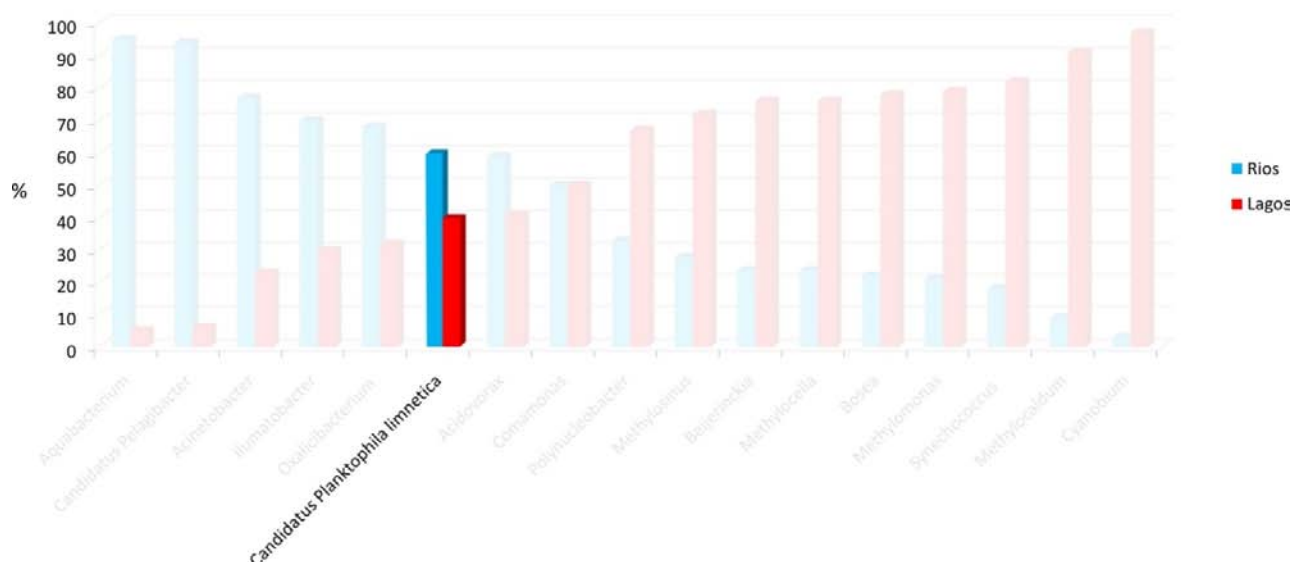


Figura 21 – Representatividade de *Candidatus Planktophila limnetica* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Tabela 8 – *Candidatus Planktophila limnetica* encontrada nas amostras de lagos. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> IJH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Tabela 9– *Candidatus Planktophila limnetica* encontrada nas amostras de rios. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EqelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Malso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Com a construção das árvores filogenéticas, foi possível confirmar a proximidade das nossas seqüências com a espécie *Candidatus Planktophila limnetica* (figura 22).

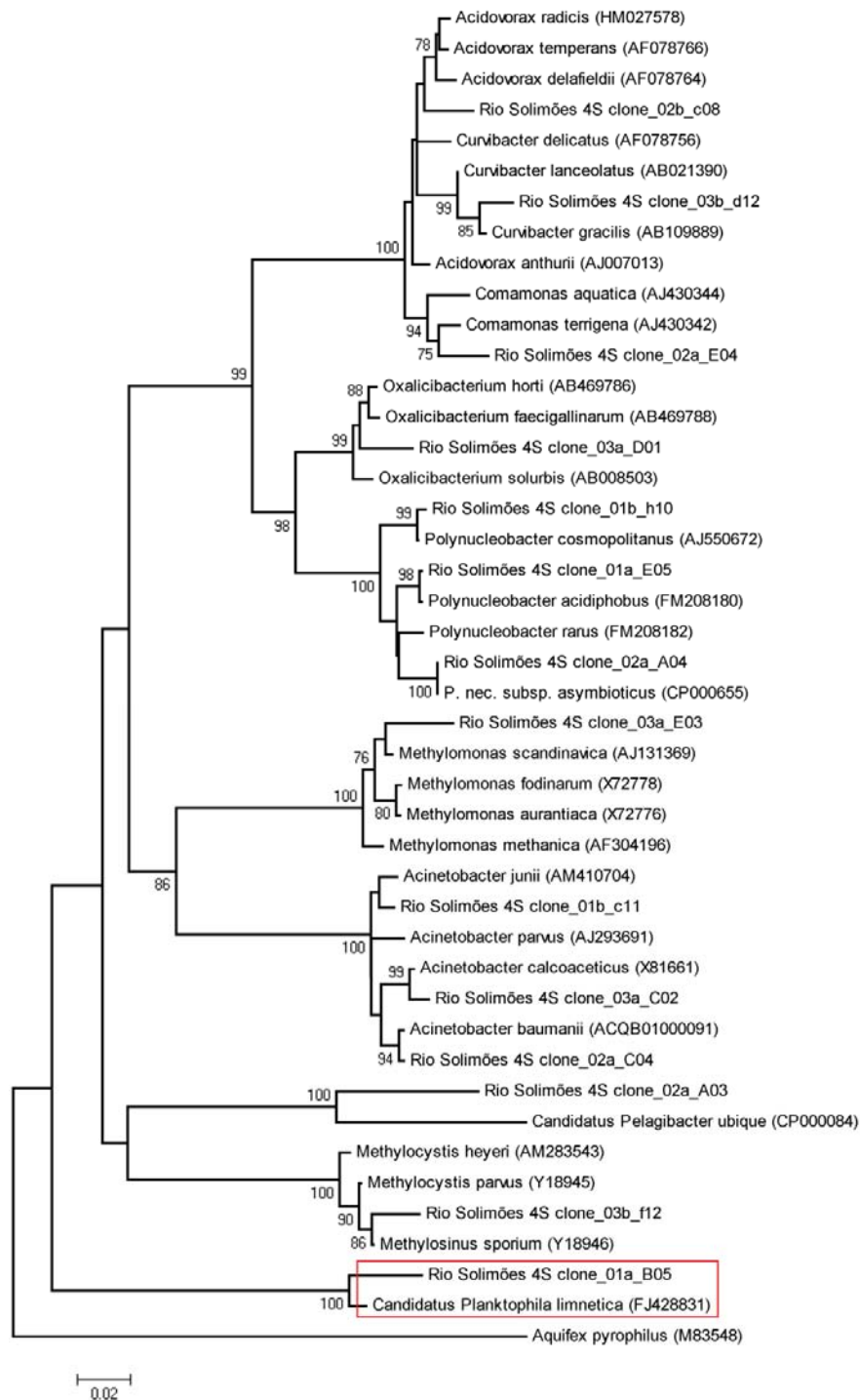


Figura 22 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com a espécie *Candidatus Planktophilia limnetica* da amostra do Rio Solimões (4S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

4.3.3 Bactérias metanotróficas encontradas neste estudo

Bactérias metanotróficas são um grupo de bactérias capazes de oxidar metano e possuem a capacidade de utilizá-lo como única fonte de carbono e energia (HANSON & HANSON 1996; COSTELLO & LIDSTROM, 1999; DEDYSH *et al.*, 2000; AUMAN *et al.*, 2001; HEYER *et al.*, 2002). Essas bactérias têm sido isoladas de diversos ambientes: solo, sedimentos, terras úmidas e habitats de água doce e marinha (DEDYSH *et al.*, 2000).

O metano é um importante gás de efeito estufa, contribuindo para o aquecimento global. Desta forma, as bactérias que consomem o metano desempenham papel importante no consumo global deste gás, tendo uma participação importante no ciclo do carbono, tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres (COSTELLO & LIDSTROM, 1999; AUMAN *et al.*, 2000; MCDONALD *et al.*, 1995).

Bactérias oxidantes de metano são divididas em dois grupos, com base no arranjo de membranas intracelulares, filogenia e via de assimilação de carbono: metanotróficas do tipo I, que são filogeneticamente da classe *Gammaproteobacteria* e metanotróficas do tipo II, que são filogeneticamente da classe *Alphaproteobacteria* (COSTELLO & LIDSTROM, 1999; HEYER *et al.*, 2002; SUNDH *et al.*, 2005). Nas amostras estudadas neste trabalho, encontramos sequências afiliadas com metanotróficas tanto do tipo I quanto do tipo II. As metanotróficas do tipo I observadas foram associadas com o gênero *Methylomonas* e *Methylocaldum*, enquanto que os gêneros pertencentes ao grupo metanotróficas do tipo II foram *Methylosinus* e *Methylocella* (DEDYSH *et al.*, 2000; HEYER *et al.*, 2002; DEDYSH, *et al.*, 2005a; ALI *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2010). Os gêneros em questão foram mais observados nas amostras de lagos (figura 23).

O gênero *Methylocaldum* compreende micro-organismos metanotróficos termofílicos, crescendo em temperatura superior a 40 °C, sendo encontrados em solo e nascentes de água quente (BODROSSY *et al.*, 1997). Esses organismos tiveram maior representatividade nas amostras de lago (figura 23). No entanto, as sequências encontradas no conjunto total de dados não estiveram relacionadas com nenhuma espécie descrita do gênero *Methylocaldum* com porcentagens maior que 97 %, podendo representar sequências associadas com bactérias ainda não cultivadas deste gênero. Análises mais específicas seriam necessárias para avaliar

a presença desses metanotróficos termofílicos na coluna de água dos lagos estudados, assim como para verificar sua origem. Devido ao fato de poucas sequências terem sido observadas para este gênero no conjunto de dados – somando um total de dez sequências – a necessidade de investigação de sua origem seria no sentido de analisar se são de fato provenientes da amostra da coluna de água ou dos solos da floresta que está ao redor, uma vez que esses organismos já foram isolados de amostras de solo.

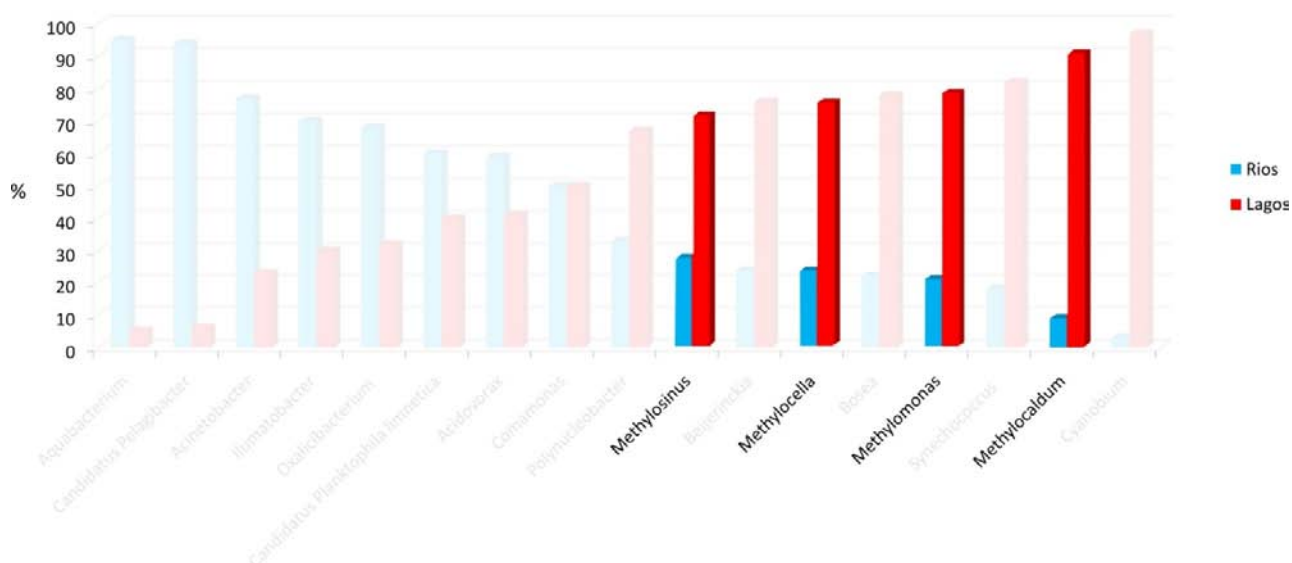


Figura 23 – Representatividade das bactérias metanotróficas nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, os gêneros em questão, estão realçados para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Apesar do gênero *Methylocella* pertencer à classe *Alphaproteobacteria* (metanotróficas do tipo II), elas não são monofiléticas com os metanotróficos do tipo II conhecidos. Espécies do gênero *Methylocella* são amplamente distribuídas em ambientes de solos ácidos e zonas úmidas, ajudando a atenuar as emissões de metano a partir desses habitats (DEDYSH *et al.*, 2000; DEDYSH, *et al.*, 2005a; CHEN *et al.*, 2010). Sequências associadas com o gênero *Methylocella* também foram observadas nas amostras da Amazônia, porém foram pouco representadas, com no máximo cinco sequências (1L) para o gênero em questão (figura 24). A

presença desses organismos nessas amostras de lago pode ser resultante das áreas de várzea da bacia Amazônica, que são as maiores fontes naturais de metano dessa região (PAZINATO *et al.*, 2010), provavelmente contando com uma grande quantidade de micro-organismos metanotróficos, inclusive do gênero *Methylocella*, já que espécies pertencentes a este gênero são observados em zonas úmidas. Ao contrário dos demais metanotróficos, *Methylocella* tem a capacidade de metabolizar diversos compostos de multicarbono, além do metano, podendo ter uma vantagem competitiva em ambientes naturais, onde a produção de metano é heterogênea (DEDYSH *et al.*, 2005a; CHEN *et al.*, 2010).

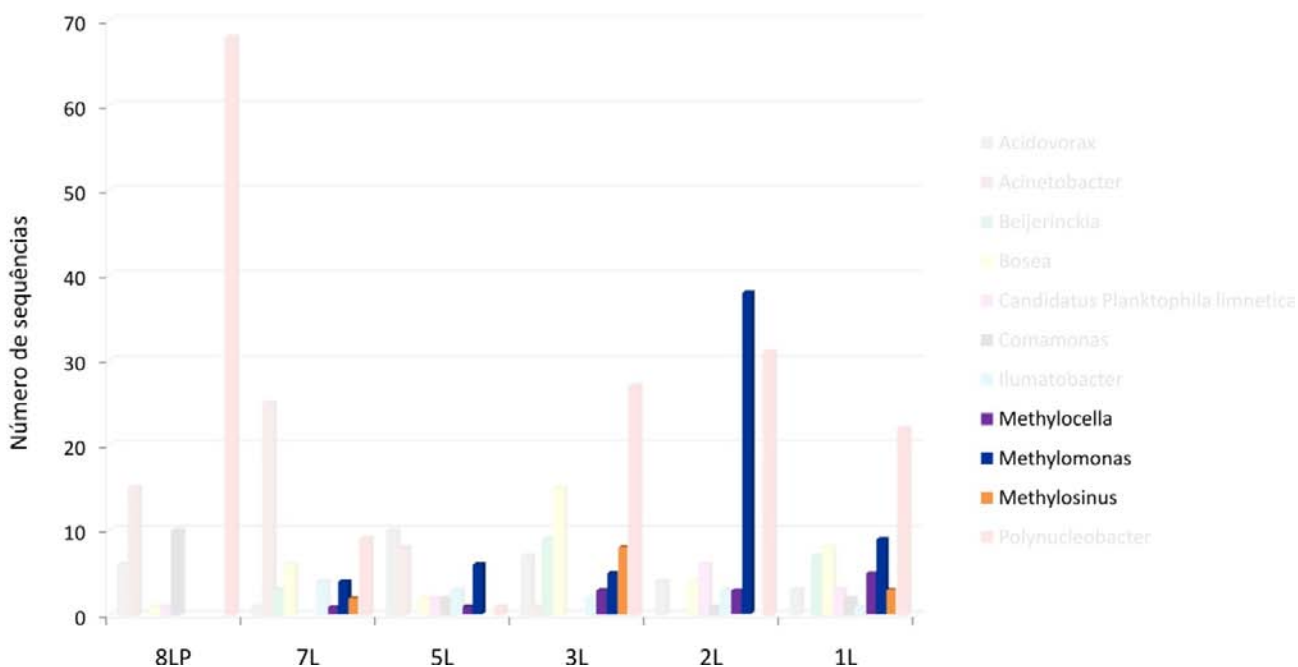


Figura 24- Abundância dos gêneros *Methylocella* (roxo), *Methylomonas* (azul) e *Methylosinus* (alaranjado) nas amostras de lagos. Na figura, os gêneros em questão, estão realçados para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Sequências associadas com outros metanotróficos (*Methylosinus* e *Methylomonas*) foram pouco observadas nas amostras 7L, 5L, 3L e 1L (figura 24). Praticamente todas as sequências associadas com o gênero *Methylosinus* também

foram afiliadas com a espécie *Methylosinus sporium* NCIMB 11126(T), e com porcentagem de identidade máxima de 98,9 % na amostra 3L.

Em lagos de água doce, como em vários outros sistemas naturais, a oxidação do metano é mais ativa em uma estreita faixa, na zona onde ocorre o encontro do metano com o oxigênio (HANSON & HANSON, 1996). Bactérias oxidantes de metano nas colunas de água de lagos consomem uma parte significativa do metano produzido no sedimento ou nas camadas anaeróbias de água (SUNDH *et al.*, 2005).

Dessa forma, possíveis explicações para a baixa representatividade de organismos metanotróficos nos lagos amostrados é pelo fato de que a coleta tenha sido realizada mais acima da faixa do encontro do metano com o oxigênio, uma vez que uma maior quantidade de bactérias metanotróficas estaria nesta faixa. Além disso, pode-se mencionar o fato de os lagos serem oxigenados por toda a coluna de água, e, como a oxidação do metano ocorre principalmente na superfície dos sedimentos (HANSON & HANSON, 1996), estes organismos não foram coletados, pois durante a amostragem evitou-se coletar muito próximo à superfície ou muito próximo do sedimento.

Uma outra possibilidade para a baixa representatividade de bactérias metanotróficas seria pela ausência ou quase ausência de produção de metano nesses lagos amostrados. Porém, isto é pouco provável, já que acredita-se que sedimentos de água doce contribuam com 40 a 50% do fluxo anual de metano na atmosfera (COSTELLO & LIDSTROM, 1999; AUMAN *et al.*, 2000). No entanto, a maior parte deste metano não chega à atmosfera, sendo consumido pelos organismos metanotróficos (COSTELLO & LIDSTROM, 1999). Como a produção de metano e a quantidade de oxigênio dissolvido por toda a coluna de água não foram mensurados, torna-se difícil afirmar a provável origem desses micro-organismos.

Organismos metanotróficos do tipo I parecem ser mais adaptados para crescer em baixas concentrações de metano, enquanto que o crescimento de metanotróficos do tipo II é favorecido quando os níveis de metano são altos e os níveis de oxigênio são baixos (HANSON & HANSON, 1996; MAYUMI *et al.*, 2010). Uma possível explicação para o grande número de sequências associadas com o gênero *Methylomonas* (tipo I) no lago 2L – único ponto onde é observado um grande número de bactérias metanotróficas, com trinta e oito sequências para esse gênero (figura 24), sendo quatorze para a espécie *Methylomonas scandinavica* R5(T), com porcentagem de identidade máxima de 98 % (tabela 10) – é a de que

ocorra a produção de metano nesse local. Além disso, a coleta pode ter sido realizada em uma faixa mais próxima do encontro do metano com o oxigênio, para que grandes quantidades de metanotróficas tenham sido observadas.

Tabela 10 – Espécies de bactérias metanotróficas encontradas nas amostras de lagos. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Em águas correntes, números menores de metanotróficas foram detectados (HANSON & HANSON 1996). Este fato foi observado nas amostras 4P e 4S dos rios, onde ocorre água corrente e onde poucas sequências foram encontradas para bactérias metanotróficas afiliadas com a espécie *Methylosinus sporium* NCIMB 11126(T), sendo três sequências observadas na amostra 4P e duas na amostra 4S, com porcentagem máxima de identidade de 98,4 % na amostra 4P (tabela 11). Sequências afiliadas com a espécie *Methylomonas scandinavica* R5(T) também foram pouco observadas. Apenas uma sequência foi encontrada nas amostras 4P, 4S e 3S, com máximo de identidade de 97,8 % na amostra 4P (tabela 11). Outras sequências associadas com o gênero *Methylomonas* também foram observadas nas amostras 4P, 4S, 3S e 1S, sendo também pouco representada, com no máximo 5 sequências, na amostra 4P (figura 25). Talvez isto ocorra devido à melhor

oxigenação provocada pela movimentação constante das águas dos rios, havendo menor produção de metano, já que esta ocorre em zonas anóxicas, e, conseqüentemente, quantidades menores de organismos metanotróficos são necessárias.

Tabela 11 – Espécies de bactérias metanotróficas encontradas nas amostras de rios. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

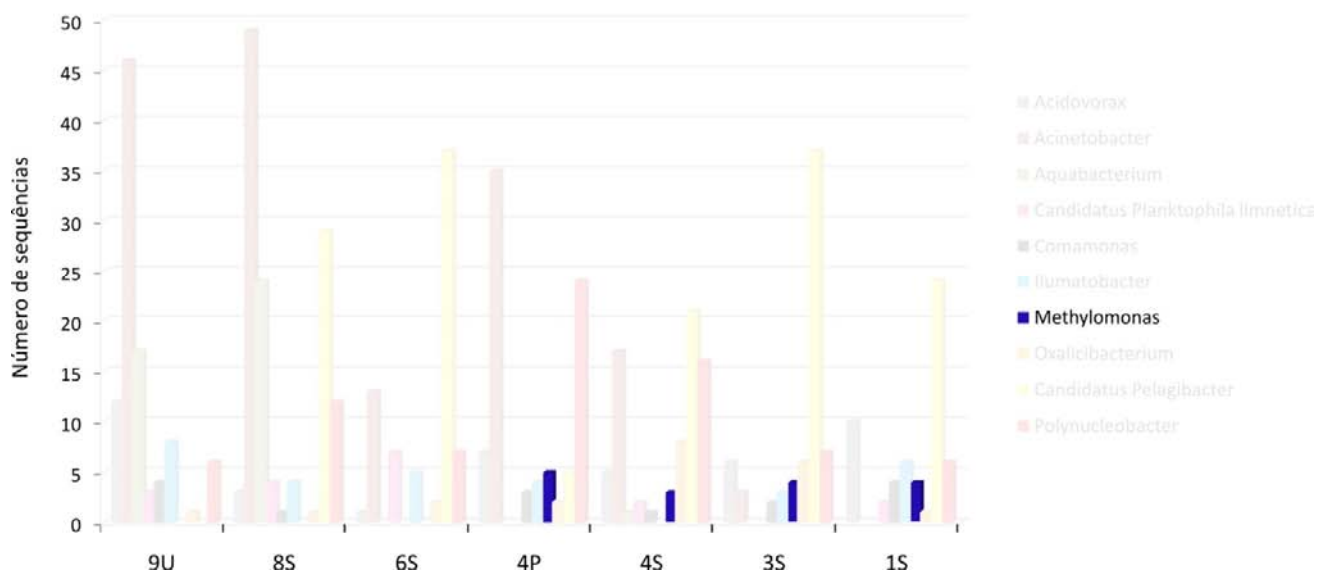


Figura 25- Abundância do gênero *Methylomonas* (azul) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Algumas sequências das bibliotecas de 16S rRNA construídas estão relacionadas com gêneros e espécies de bactérias metanotróficas. Esta proximidade com esses organismos também pode ser observada na figura 26, onde verificamos uma relação de algumas sequências estudadas com bactérias metanotróficas.

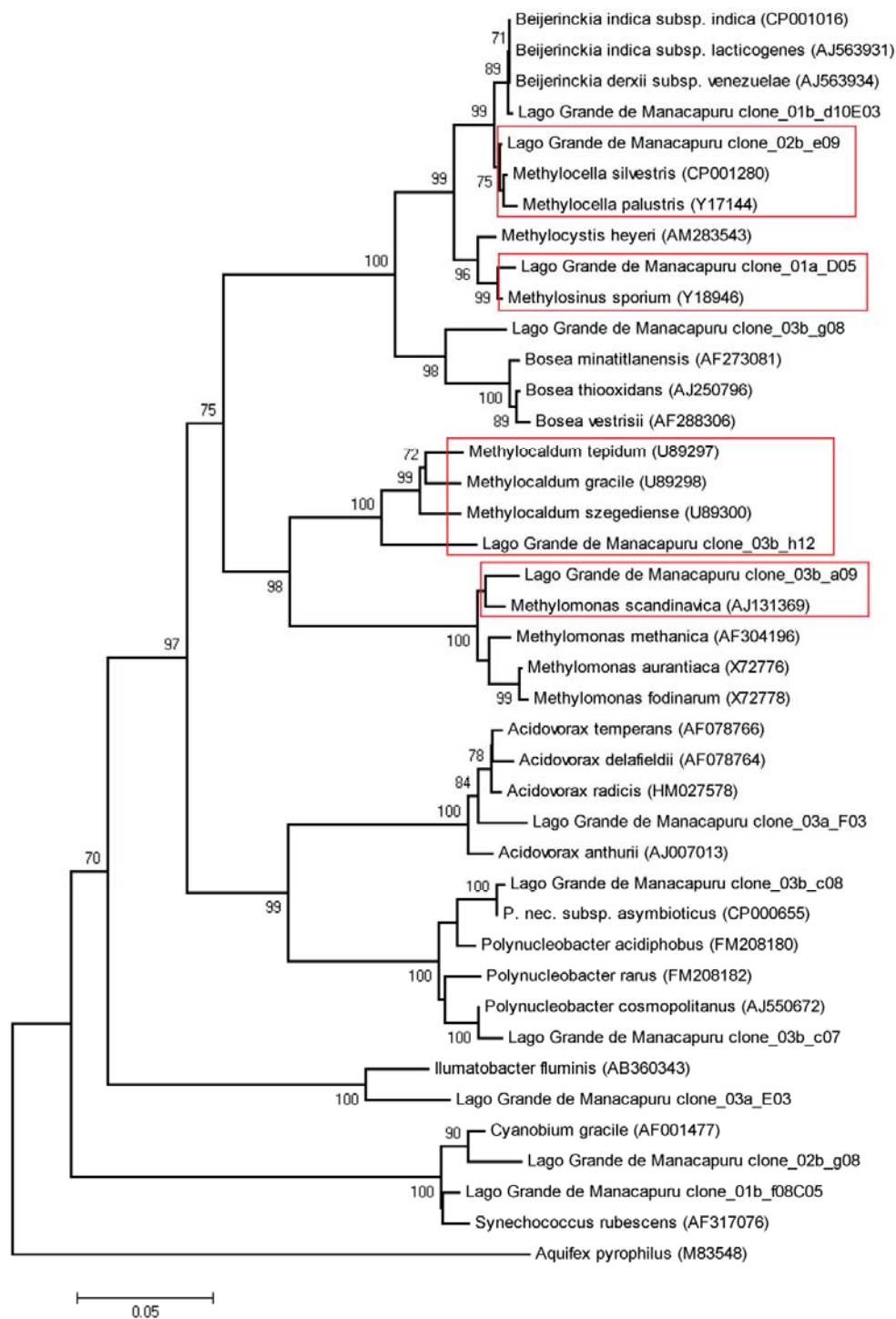


Figura 26 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com bactérias metanotróficas da amostra do Lago Grande de Manacapuru (3L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

4.3.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio observadas nas amostras de rios e lagos da Amazônia

O gênero *Beijerinckia* pertence à classe *Alphaproteobacteria*. Organismos que fazem parte deste gênero são aeróbicos, heterotróficos, acidófilos, bactérias de vida livre com a capacidade de fixar dinitrogênio atmosférico (DEDYSH *et al.*, 2004; DEDYSH *et al.*, 2005b; TAMAS *et al.*, 2010; OGGERIN *et al.*, 2011).

Os primeiros isolados deste gênero foram obtidos a partir de solos ácidos, em regiões tropicais. Apesar do gênero *Beijerinckia* ser frequentemente encontrado em solos com essas características, estudos demonstraram que estas bactérias são amplamente distribuídas tanto em solos ácidos quanto neutros, em regiões tropicais e não tropicais (JORDAN & McNICOL, 1978; THULER *et al.*, 2003; DEDYSH *et al.*, 2005b). Elas são também observadas na rizosfera e filosfera das plantas, onde atuam no processo de fixação biológica do nitrogênio e contribuem para a promoção do crescimento vegetal (TAMAS *et al.*, 2010; OGGERIN *et al.*, 2009).

Sequências associadas com o gênero *Beijerinckia* foram observadas nas amostras de rios e lagos estudadas; entretanto, foram mais representativas nas amostras de lagos (figura 27). Um mínimo de três sequências foi observado na amostra 7L até um máximo de nove na amostra 3L (figura 28). Enquanto que nos rios, um mínimo de uma sequência foi observado na amostra 9U, até um máximo de três na amostra 4P (dados não mostrados). É provável que estas sequências associadas com o gênero *Beijerinckia* sejam provenientes dos solos da floresta circundante, contribuindo para o enriquecimento desses solos em relação ao nitrogênio. A figura 29 ilustra a posição das sequências encontradas nas amostras da Amazônia dentro do gênero *Beijerinckia*.

Algumas bactérias metanotróficas também são capazes de fixar nitrogênio como, por exemplo, *Methylocella* e *Methylosinus* (DEDYSH *et al.*, 2004), que, igualmente, foram observadas nas amostras estudadas.

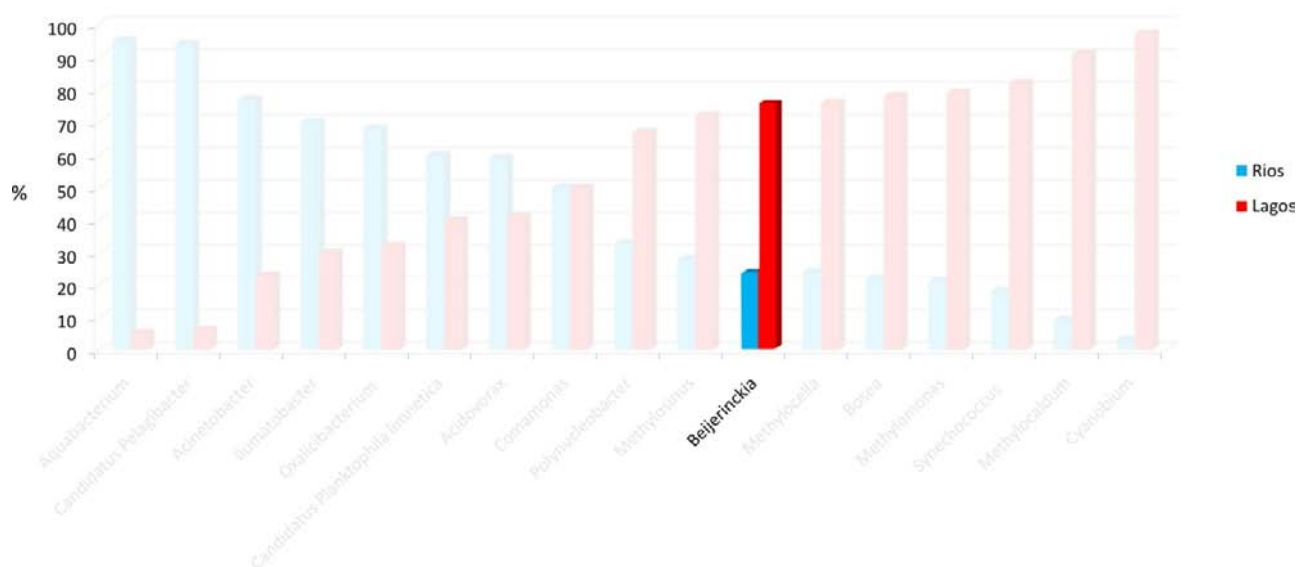


Figura 27 – Representatividade do gênero *Beijerinckia* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

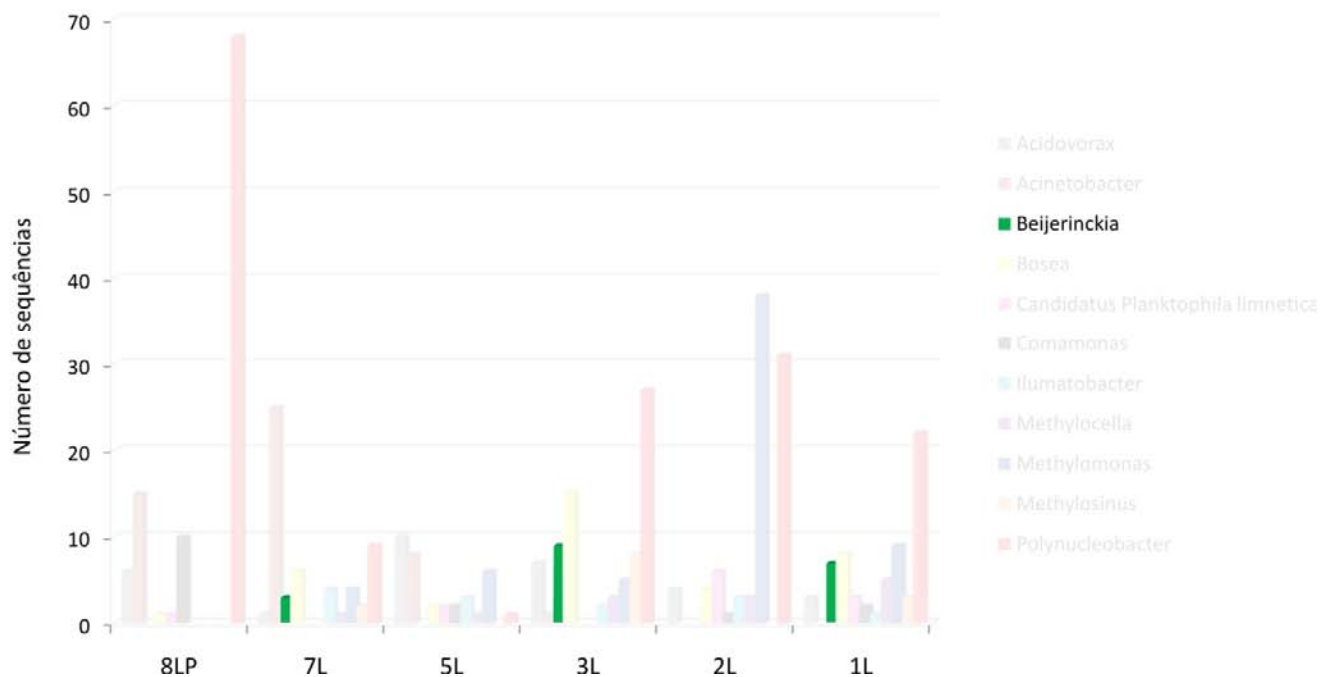


Figura 28- Abundância do gênero *Beijerinckia* (verde) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

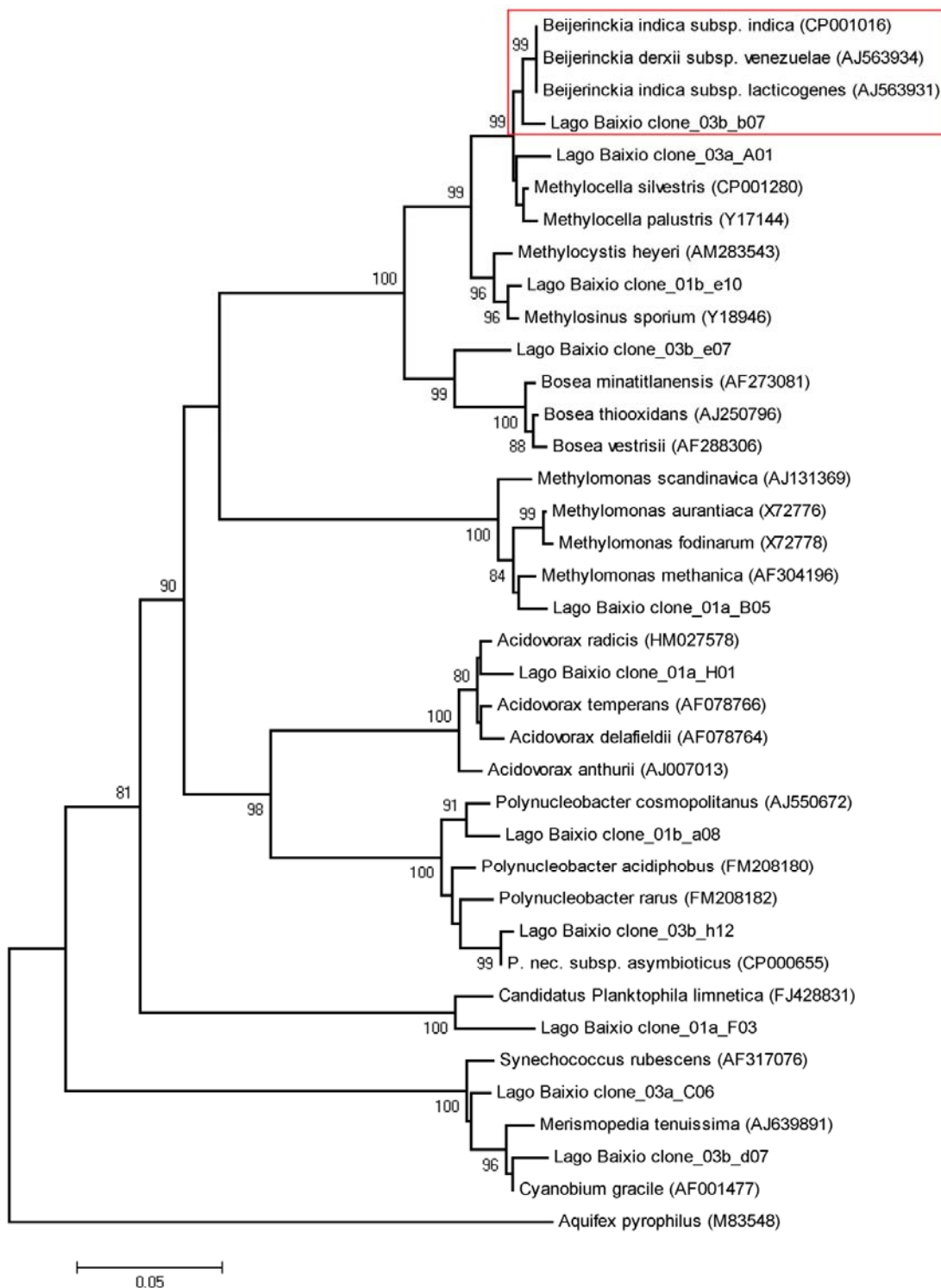


Figura 29 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com o gênero *Beijeirinckia* da amostra do Lago Baixio (1L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Outro gênero capaz de fixar nitrogênio é o *Pelomonas*, que se encontra dentro da classe *Betaproteobacteria* e foi criado em 2005 por Xie e Yokota para reclassificar a espécie *Pseudomonas saccharophila* como *Pelomonas saccharophila*. Os organismos presentes nesse gênero são móveis por meio de um flagelo polar, capazes de fixar nitrogênio e mostram crescimento autotrófico com hidrogênio, mas não são fotoautotróficos. A espécie *Pelomonas saccharophila* foi isolada a partir de lama de uma poça estagnada (XIE & YOKOTA, 2005). Sequências associadas com *Pelomonas saccharophila* DSM 654(T) foram observadas no lago 5L (quatro sequências; tabela 12), com porcentagem máxima de identidade de 99,5 %. A proximidade das sequências encontradas no Lago Ananá (5L) para a espécie em questão é ilustrada na figura 30.

A profundidade total do lago era de dois metros e a coleta foi realizada a um metro, o que torna possível que esses organismos tenham sido provenientes do sedimento, uma vez que se têm registros de que a espécie foi isolada de lama de uma poça estagnada. A capacidade de fixar nitrogênio faz com que esses organismos tenham um papel importante no ciclo do nitrogênio nesse ambiente.

Tabela 12 - Espécie do gênero *Pelomonas* encontrada na amostra 5L. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

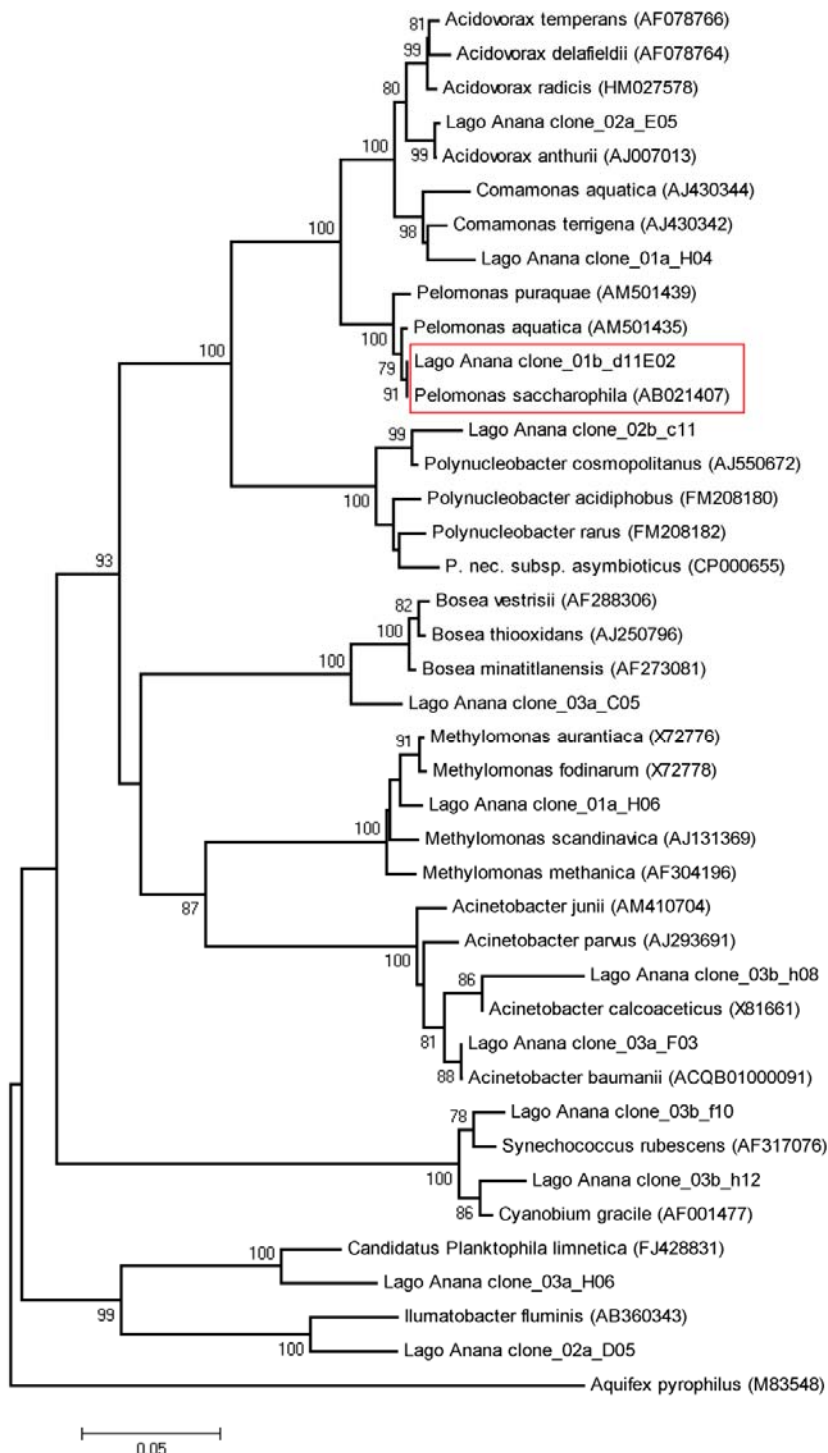


Figura 30- Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com a espécie *Pelomonas saccharophila* da amostra do Lago Ananá (5L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

4.3.5 Bactérias encontradas neste estudo e que são presentes nos mais diversos ambientes

O gênero *Acinetobacter* compreende bactérias não-móveis e estritamente aeróbicas, dentro da classe *Gammaproteobacteria*, pertencente ao filo *Proteobacteria*. Membros desse gênero são comumente encontrados no ambiente, podendo ser observados no solo, ambientes aquáticos e sedimentos, esgoto, pele humana e em uma grande variedade de alimentos para animais, incluindo também cepas patogênicas (WAGNER *et al.*, 1994; GUARDABASSI *et al.*, 1999; NEMEC *et al.*, 2003; JUNG *et al.*, 2010; SACHDEV *et al.*, 2010).

Nas amostras estudadas, foi observada uma grande quantidade de organismos relacionados com o gênero *Acinetobacter*, principalmente nas amostras de rios (figura 31). Foram observadas cerca de quarenta e nove sequências na amostra de rio 8S (figura 32) e vinte e cinco na amostra de lago 7L (figura 33).

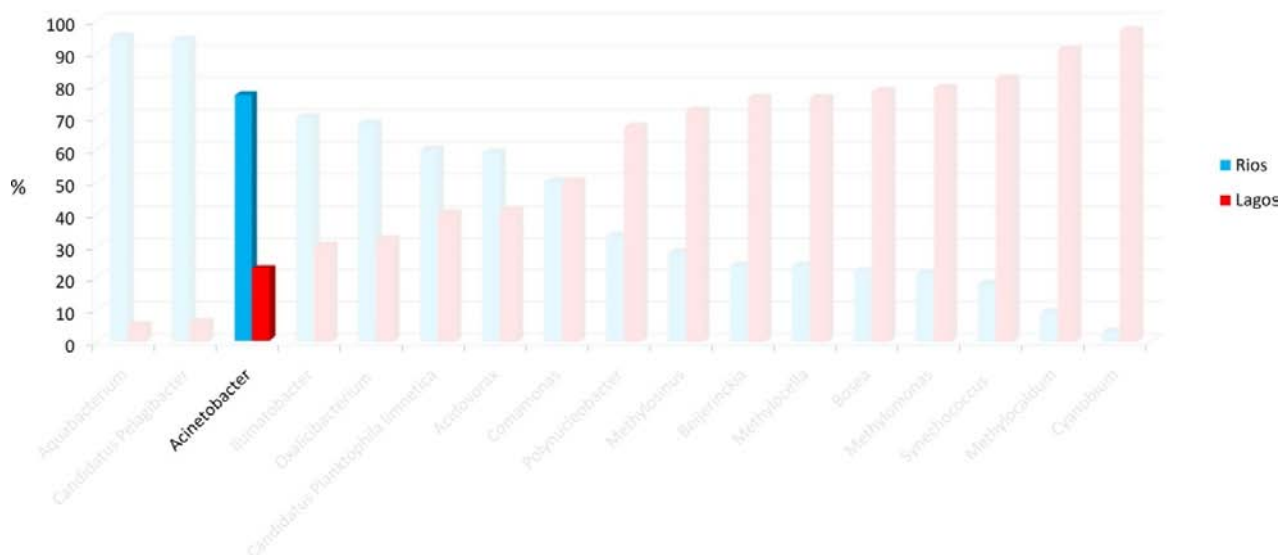


Figura 31– Representatividade do gênero *Acinetobacter* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

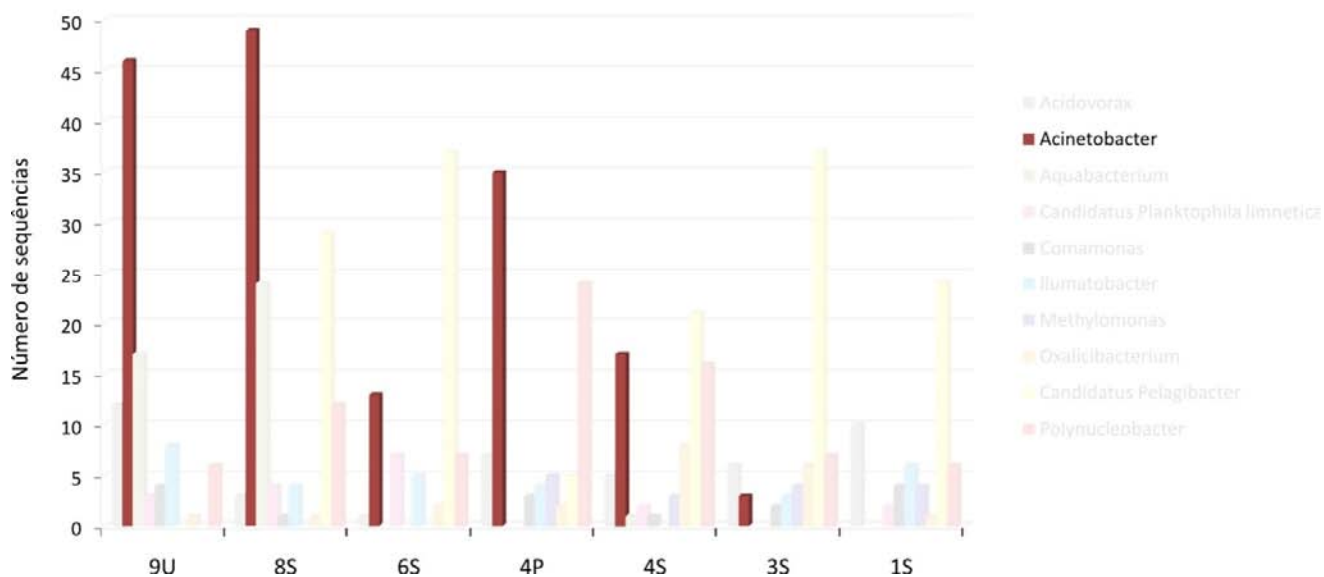


Figura 32- Abundância do gênero *Acinetobacter* (marrom) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

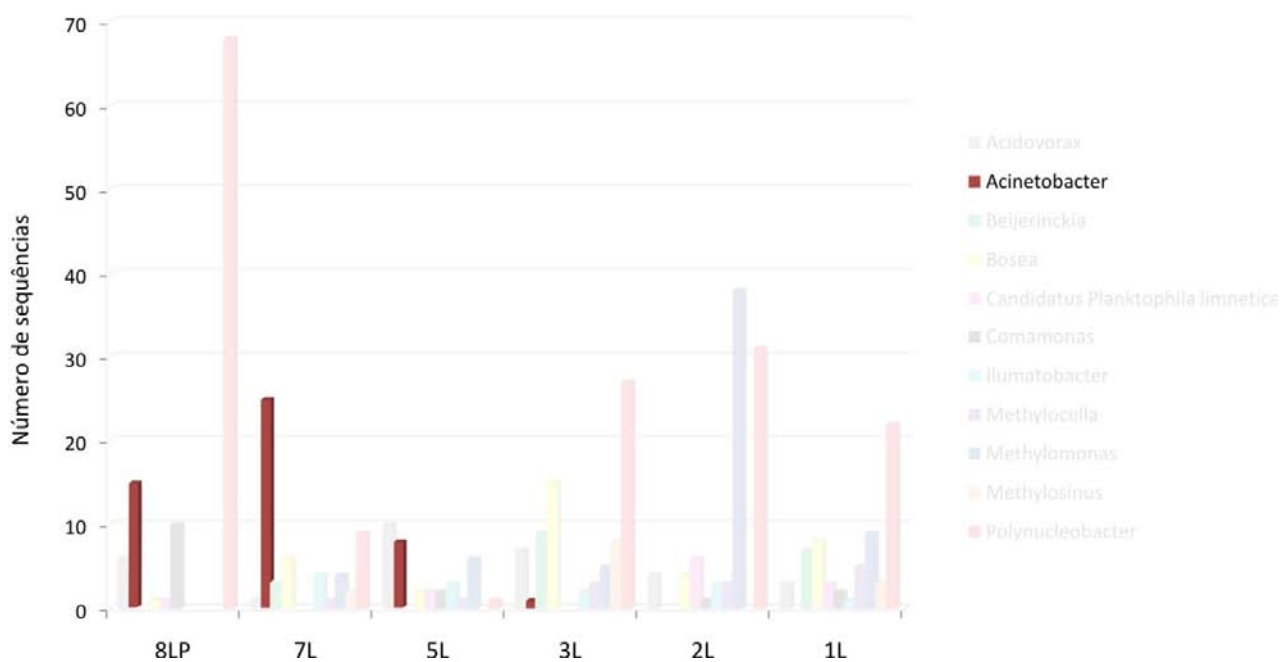


Figura 33- Abundância do gênero *Acinetobacter* (marrom) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Sequências relacionadas com as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter parvus* foram observadas em praticamente todas as amostras de rios (tabela 13), enquanto que nas amostras de lagos foram observadas sequências relacionadas com as espécies *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Acinetobacter parvus* em apenas três amostras (tabela 14).

Tabela 13 – Espécies do gênero *Acinetobacter* encontradas nas amostras de rios. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Tabela 14 – Espécies do gênero *Acinetobacter* encontradas nas amostras de lagos. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb5A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

A espécie *Acinetobacter parvus* foi isolada da orelha de um paciente em um ambulatório (NEMEC *et al.*, 2003); *Acinetobacter junii* a partir de amostras clínicas e ambientais e *Acinetobacter baumannii* de amostras clínicas, sendo predominante nessas amostras (BOUVET & GRIMONT, 1986; BOUVET *et al.*, 1990; GUARDABASSI *et al.*, 1999). Embora *Acinetobacter baumannii* tenha sido encontrada em amostras de solo, não parece ser um organismo típico ambiental (PELEG *et al.*, 2008). No entanto, *Acinetobacter calcoaceticus* é considerado uma espécie ambiental, sendo um habitante normal do solo e da água e raramente é associado a infecções humanas (BOUVET & GRIMONT, 1986; GUARDABASSI *et al.*, 1999; PELEG *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Acinetobacter* foram encontradas em densidades superiores a 10^4 organismos por 100 mL em ecossistemas de água doce e 10^6 organismos por 100mL em esgoto (GUARDABASSI *et al.*, 1999).

O gênero *Acinetobacter* parece ser metabolicamente versátil, uma vez que é capaz de degradar hidrocarbonetos alifáticos, o que pode apresentar um possível potencial para estudos de biorremediação. Isso mostra que o estudo desses organismos não está apenas voltado para situações relacionadas a infecções hospitalares (JUNG *et al.*, 2010). O gênero é um dos mais frequentemente encontrados em habitats contaminados com petróleo. A espécie *Acinetobacter calcoaceticus* é capaz de crescer em substratos de hidrocarbonetos. Marín *et al.* (1995) observaram a capacidade de uma cepa da espécie *Acinetobacter calcoaceticus* em degradar derivados de petróleo, o que pode apresentar interesse potencial para a biorremediação de locais contaminados por hidrocarbonetos. Chaîneau *et al.* (1999), isolaram micro-organismos com capacidade para degradar hidrocarbonetos em um solo agrícola na França, em que o gênero *Acinetobacter* estava presente.

Gallego *et al.* (2001), observaram que membros do gênero *Acinetobacter* foram predominantes em solos contaminados com óleo diesel, sugerindo sua importância em degradar hidrocarbonetos. Membros deste gênero são ubíquos na natureza, tendo capacidade de usar uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo petróleo bruto e combustíveis, além de hidrocarbonetos aromáticos (GALLEGO *et al.*, 2001).

Organismos pertencentes ao gênero *Acinetobacter* têm sido isolados da rizosfera de diferentes plantas (SACHDEV *et al.*, 2010). Em estudo realizado por tais

autores sobre a rizosfera de trigo em três campos agrícolas na Índia, foi observada a presença das espécies *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter lwoffii* e *Acinetobacter baylyi*, sendo a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* dominante em todas as amostras. Estas espécies podem desempenhar um papel favorável na promoção do crescimento das plantas, enquanto residentes na rizosfera de trigo, ao exibirem características de fixação do nitrogênio, produção de sideróforos (compostos que atuam na captação de ferro) e solubilização mineral.

Nas amostras da Amazônia, a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* foi dominante em todas as amostras, tanto de rios quanto de lagos, apresentando um máximo de dez sequências associadas com esta espécie na amostra 8LP (tabela 14) e um máximo de trinta sequências na amostra 8S (tabela 13). Como mencionado, a espécie é observada em amostras de solo e água, e, desta forma, a sua abundância em relação às demais amostras se deve ao fato de ser uma espécie ambiental, sendo possível que parte das sequências associadas com essa espécie seja também proveniente do solo da floresta circundante.

Com relação às espécies consideradas patogênicas, como *Acinetobacter baumannii*, um máximo de duas sequências foram observadas na amostra 5L (tabela 14) e um máximo de seis na amostra 4S (Tabela 13). A presença desses organismos nas amostras da Amazônia provavelmente se deve a uma ocorrência natural e não indica que esses ambientes estejam contaminados com material hospitalar, já que os locais amostrados são ambientes com pouco impacto humano e não há hospitais próximos às áreas de coleta, o que descarta a possibilidade desse tipo de contaminação.

Apesar do fato de espécies do gênero *Acinetobacter* apresentarem capacidade de degradar hidrocarbonetos, não se tem relatos de derramamento de petróleo nesses locais, mesmo com navios petroleiros navegando nos trechos amostrados. Desta forma, é possível que estes organismos possam habitar estes ambientes naturalmente e não por seleção devido a contaminações. Além disso, a abundante presença desses organismos, principalmente nas amostras 9U e 8S, pode ser resultante de exsudação natural de petróleo, podendo servir como um indicador para a exploração petrolífera.

Sequências associadas com a espécie *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) foram observadas com porcentagem máxima de identidade de 99,5 % na

amostra 4S, *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 30006(T) foi identificado com 100 % de identidade na amostra 4P, *Acinetobacter junii* LMG 998(T) com 99,4 % na amostra 9U e *Acinetobacter parvus* LUH 4616(T) com 99 % na amostra 6S. A figura 34 confirma a proximidade das sequências observadas nas bibliotecas de 16S rRNA com as espécies em questão.

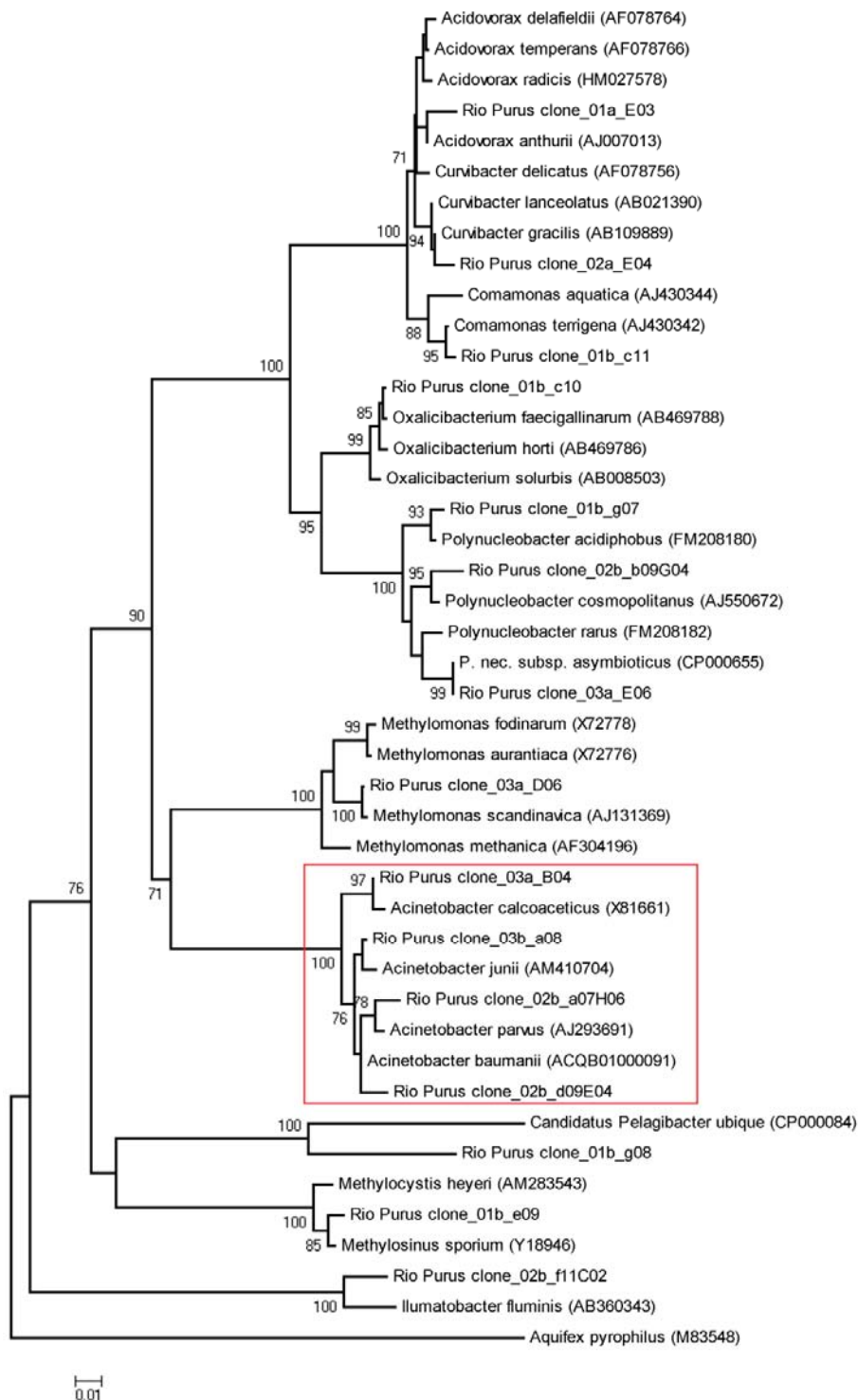


Figura 34 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Acinetobacter* da amostra do Rio Purus (4P). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Outro gênero observado nos mais diversos ambientes é o gênero *Comamonas* que pertence à classe *Betaproteobacteria* (WILLEMS *et al.*, 1991; YOUNG *et al.*, 2008). As células ocorrem isoladamente ou em pares e são móveis por meio de um tufo de flagelos polares. Elas são estritamente aeróbicas e quimiorganotróficas (DE VOS *et al.*, 1985).

Espécies do gênero *Comamonas* são isoladas do solo ou da água em ambientes naturais ou industriais. Elas também têm sido isoladas de várias amostras clínicas, mas não há relatos de efeito patogênico em humanos saudáveis (WILLEMS *et al.*, 1991).

O gênero *Comamonas* foi observado igualmente nas amostras de rios e lagos (figura 35), em praticamente todas as amostras de rios (figura 36) e de lagos (figura 37), com um mínimo de uma sequência nas amostras 2L, 8S e 4S a um máximo de dez na amostra 8LP.

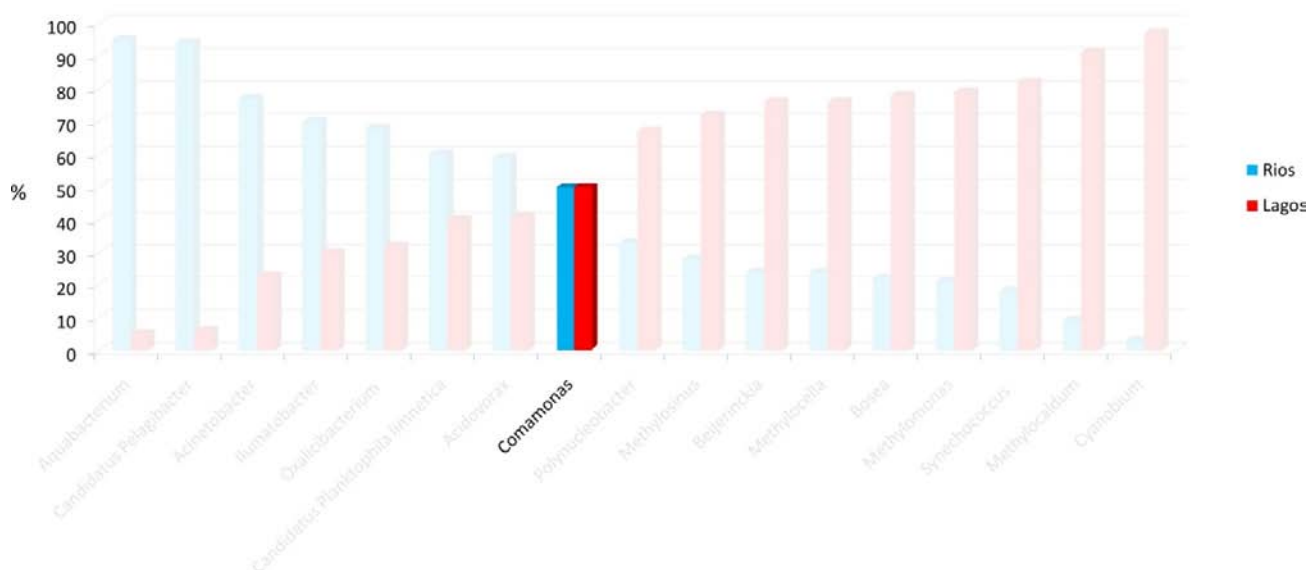


Figura 35– Representatividade do gênero *Comamonas* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

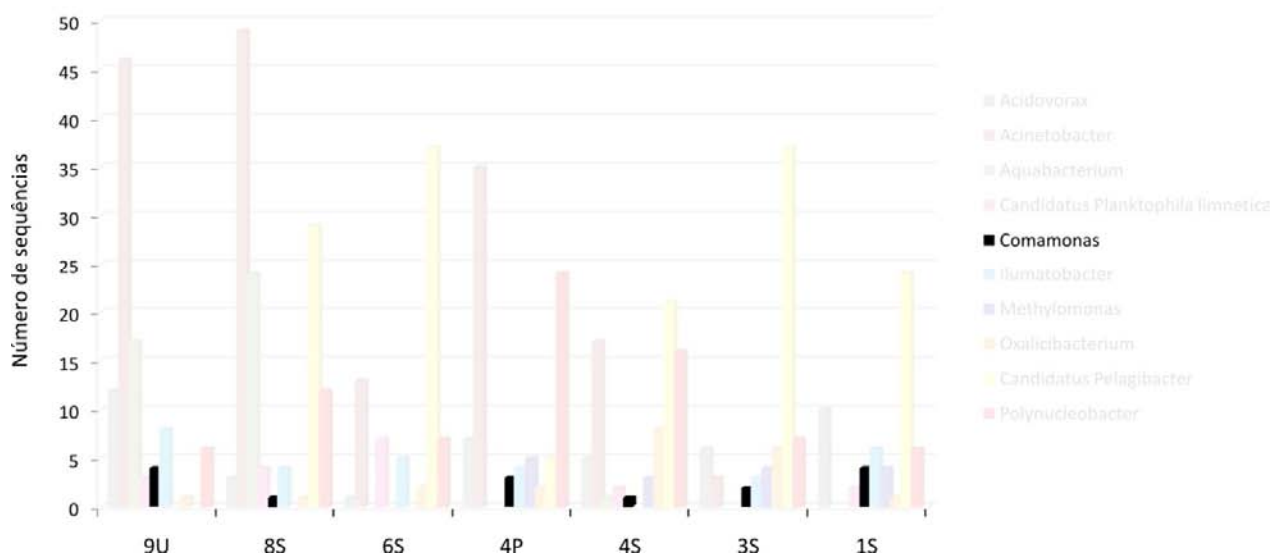


Figura 36- Abundância do gênero *Comamonas* (preto) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

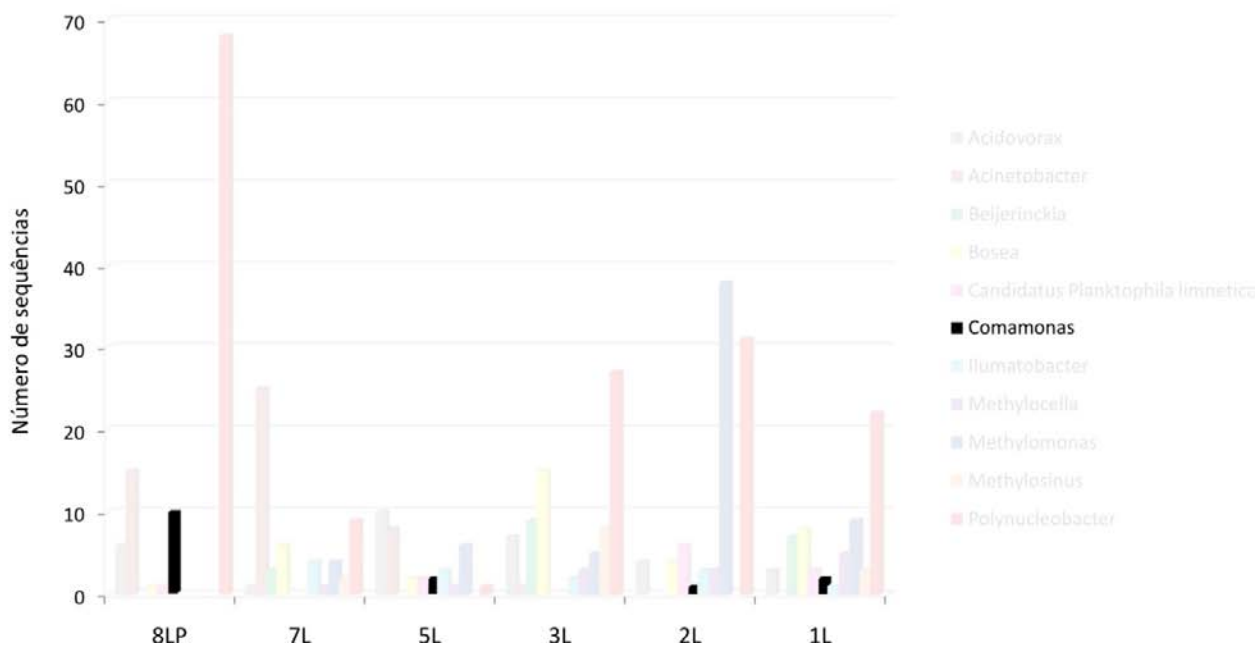


Figura 37- Abundância do gênero *Comamonas* (preto) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Sequências afiliadas com a espécie *Comamonas terrigena* LMG 1253(T) foram observadas nas amostras de rios (4P, 4S, 3S e 1S) (tabela 15) e nas amostras de lagos (8LP, 5L e 2L) (tabela 16), com um máximo de cinco sequências associadas com esta espécie na amostra 8LP e uma porcentagem de identidade máxima de 98 % na amostra 2L. Essa relação com a espécie *Comamonas terrigena* LMG 1253(T) também é mostrada na figura 38.

A espécie *Comamonas terrigena* tem sido isolada do solo, de água, de várias amostras clínicas, ambientes hospitalares, sangue de cavalo e sangue de coelho (WILLEMS *et al.*, 1991).

Tabela 15 – Espécie do gênero *Comamonas* encontrada nas amostras de rios. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktonhyla limnetica</i> MWH-FaeIM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylasinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Tabela 16– Espécie do gênero *Comamonas* encontrada nas amostras de lagos. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-FaelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

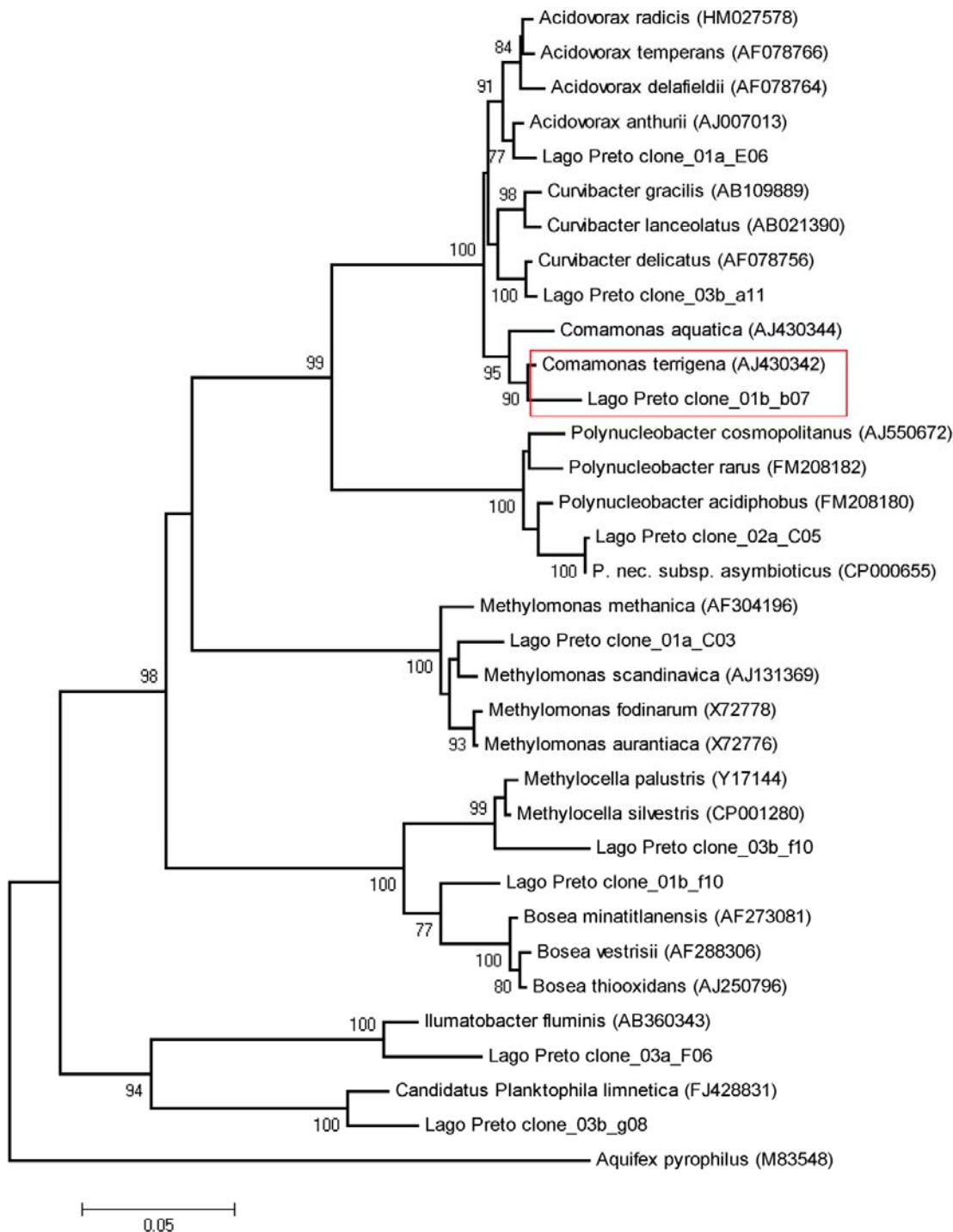


Figura 38 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Comamonas* da amostra do Lago Preto (2L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

O gênero *Curvibacter* pertence à classe *Betaproteobacteria* e foi criado em 2004 por Ding e Yokota para acomodar bactérias heterotróficas, aeróbicas ou microaeróbicas, mesófilas, com ou sem flagelos.

Sequências associadas com duas espécies do gênero *Curvibacter* foram observadas nas amostras estudadas. A espécie *Curvibacter gracilis* foi primeiramente isolada de água de poço, em Osaka, no Japão (DING & YOKOTA, 2004). Sequências associadas com *Curvibacter gracilis* 7-1(T) foram observadas nas amostras 4P (duas sequências) e 4S (três sequências) (tabela 17), com porcentagem máxima de identidade de 98,9 % na amostra 4P. Além disso, sequências afiliadas com a espécie *Curvibacter delicatus* LMG 4328(T) foram observadas nas amostras 8LP (três sequências) e 2L (uma sequência) (tabela 18), com porcentagem máxima de identidade de 98,5 % na amostra 8LP. *Curvibacter delicatus* foi isolado de uma amostra de água destilada e pode possuir de 1-6 flagelos em um pólo, sendo observados geralmente 1-2 flagelos (LEIFSON, 1962; HYLEMON *et al.*, 1973; DING & YOKOTA, 2004).

A proximidade com as espécies *Curvibacter gracilis* 7-1(T) e *Curvibacter delicatus* LMG 4328(T) podem ser observadas na figura 39 e figura 40, respectivamente.

Tabela 17 – Espécie do gênero *Curvibacter* encontrada nas amostras de rios. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terriena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Tabela 18 – Espécie do gênero *Curvibacter* encontrada nas amostras de lagos. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terriena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

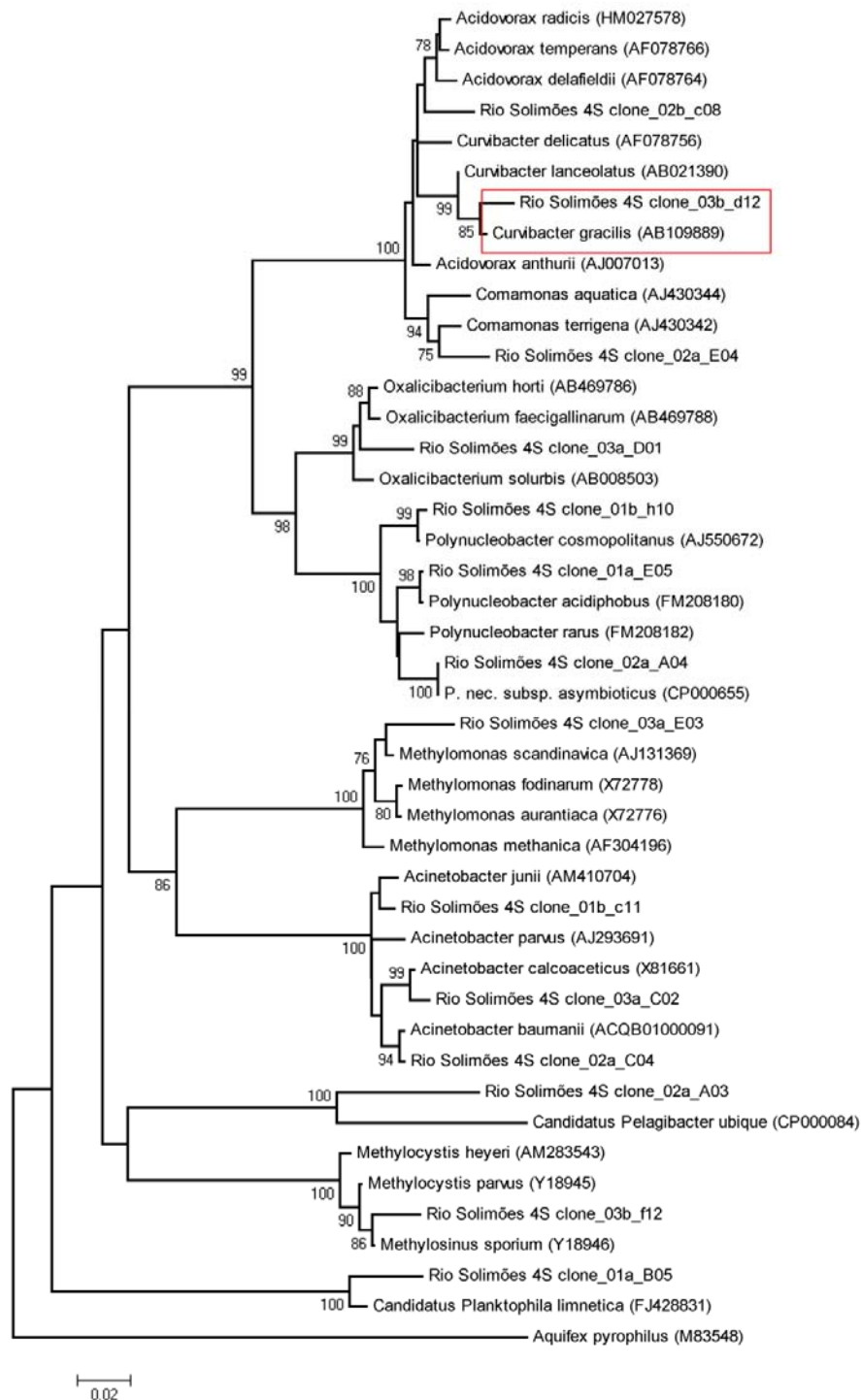


Figura 39 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com a espécie *Curvibacter gracilis* da amostra do Rio Solimões (4S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

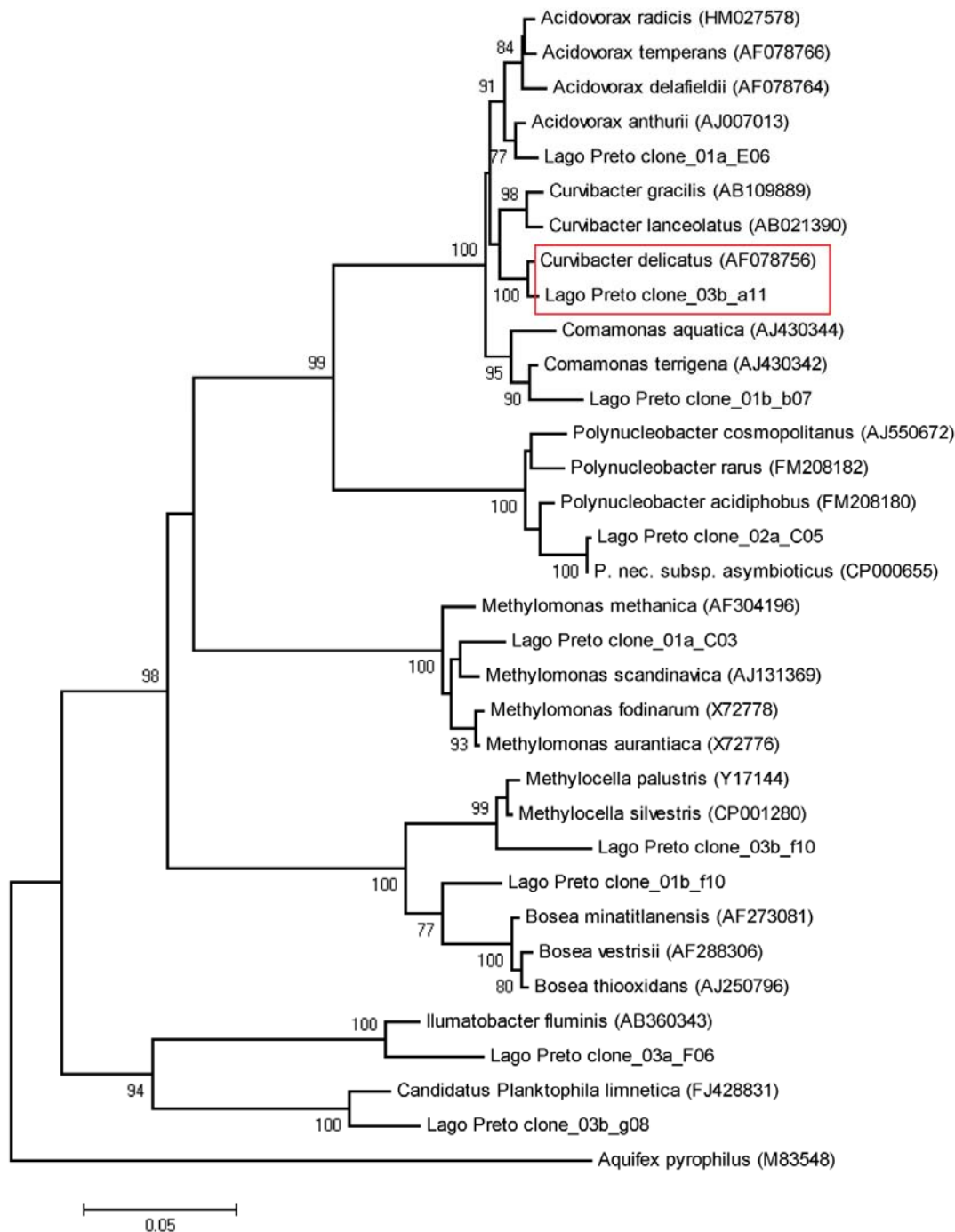


Figura 40 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com a espécie *Curvibacter delicatus* da amostra do Lago Preto (2L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

O gênero *Acidovorax* também se encontra na classe *Betaproteobacteria*, sendo os organismos presentes neste gênero móveis por meio de um flagelo polar ou, mais raramente, por meio de dois ou três flagelos polares. Espécies do gênero *Acidovorax* podem ser observadas no solo, na água, em amostras clínicas e em material vegetal infectado (WILLEMS *et al.*, 1992).

Nas amostras da Amazônia o gênero *Acidovorax* foi observado em todas as amostras de rios (figura 41) e de lagos (figura 42). No entanto, foi um pouco mais representado nas amostras de rios (figura 43). Um mínimo de uma sequência foi observada na amostra 6S e 7L e um máximo de doze na amostra 9U.

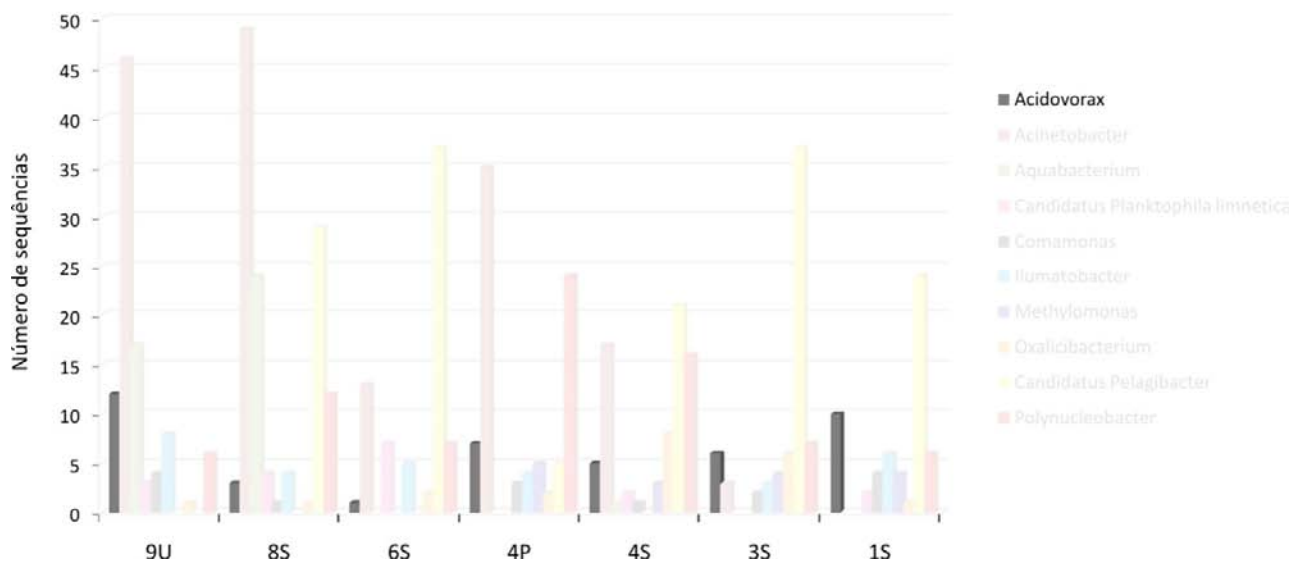


Figura 41- Abundância do gênero *Acidovorax* (cinza) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

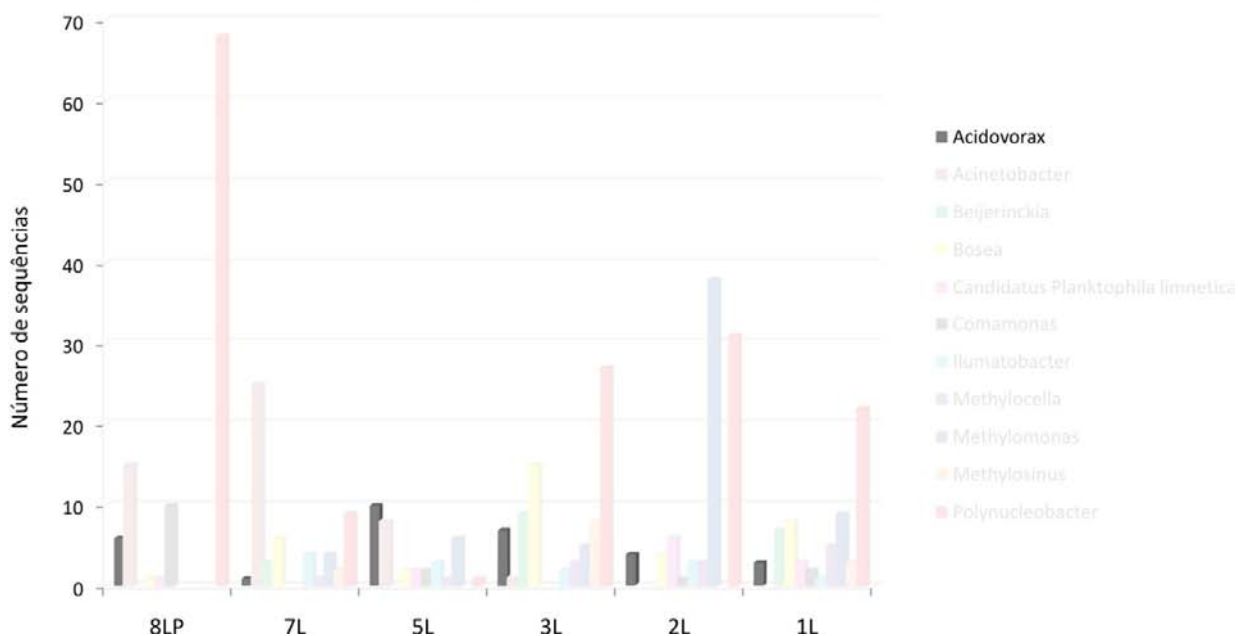


Figura 42- Abundância do gênero *Acidovorax* (cinza) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

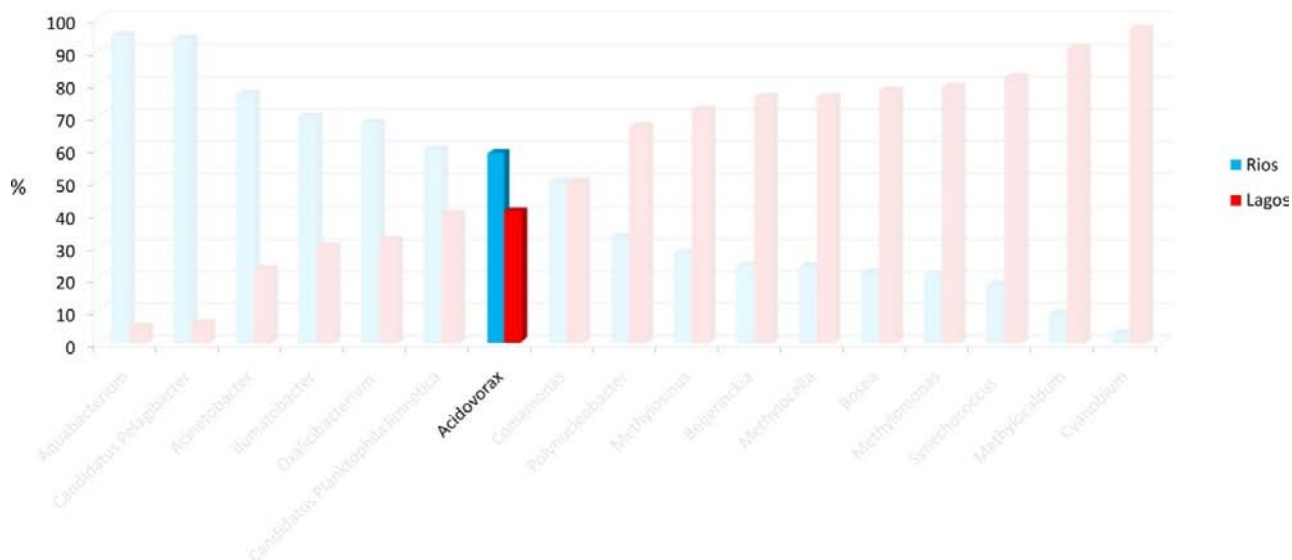


Figura 43 – Representatividade do gênero *Acidovorax* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Sequências com porcentagens de identidade superior a 97 % dentro do gênero *Acidovorax* resultaram na identificação de sequências afiliadas com a espécie *Acidovorax anthurii* CFBP 3232(T), considerada fitopatogênica. *Acidovorax anthurii* foi isolado de antúrios (*Anthurium andreanum*), plantas ornamentais importantes economicamente, que são encontradas na maioria dos países tropicais úmidos do mundo, em particular no Caribe, América Latina e no estado do Havaí (WEN *et al.*, 1999; GARDAN *et al.*, 2000).

Sequências afiliadas com a espécie *Acidovorax anthurii* CFBP 3232(T) foram observadas nas amostras de lago 8LP, 5L e 2L, com duas sequências cada (tabela 19) e nas amostras 9U (uma sequência), 4P (três sequências), 3S (uma sequência) e 1S (uma sequência) (tabela 20), com porcentagem máxima de identidade de 98,4% na amostra 5L. A relação com a espécie *Acidovorax anthurii* CFBP 3232(T) também pode ser notada na figura 44, onde nos mostra a proximidade das sequências observadas na Amazônia com a espécie em questão. Organismos associados com essa espécie nas amostras da Amazônia podem ser resultantes da floresta que está ao redor.

As demais sequências, nas quais uma porcentagem de identidade maior que 97 % não foi observada para espécies do gênero *Acidovorax*, podem ser resultantes da baixa qualidade destas sequências ou podem representar novas espécies dentro do gênero *Acidovorax*.

Tabela 19 – Espécie do gênero *Acidovorax* encontrada nas amostras de lagos. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Tabela 20 – Espécie do gênero *Acidovorax* encontrada nas amostras de rios. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

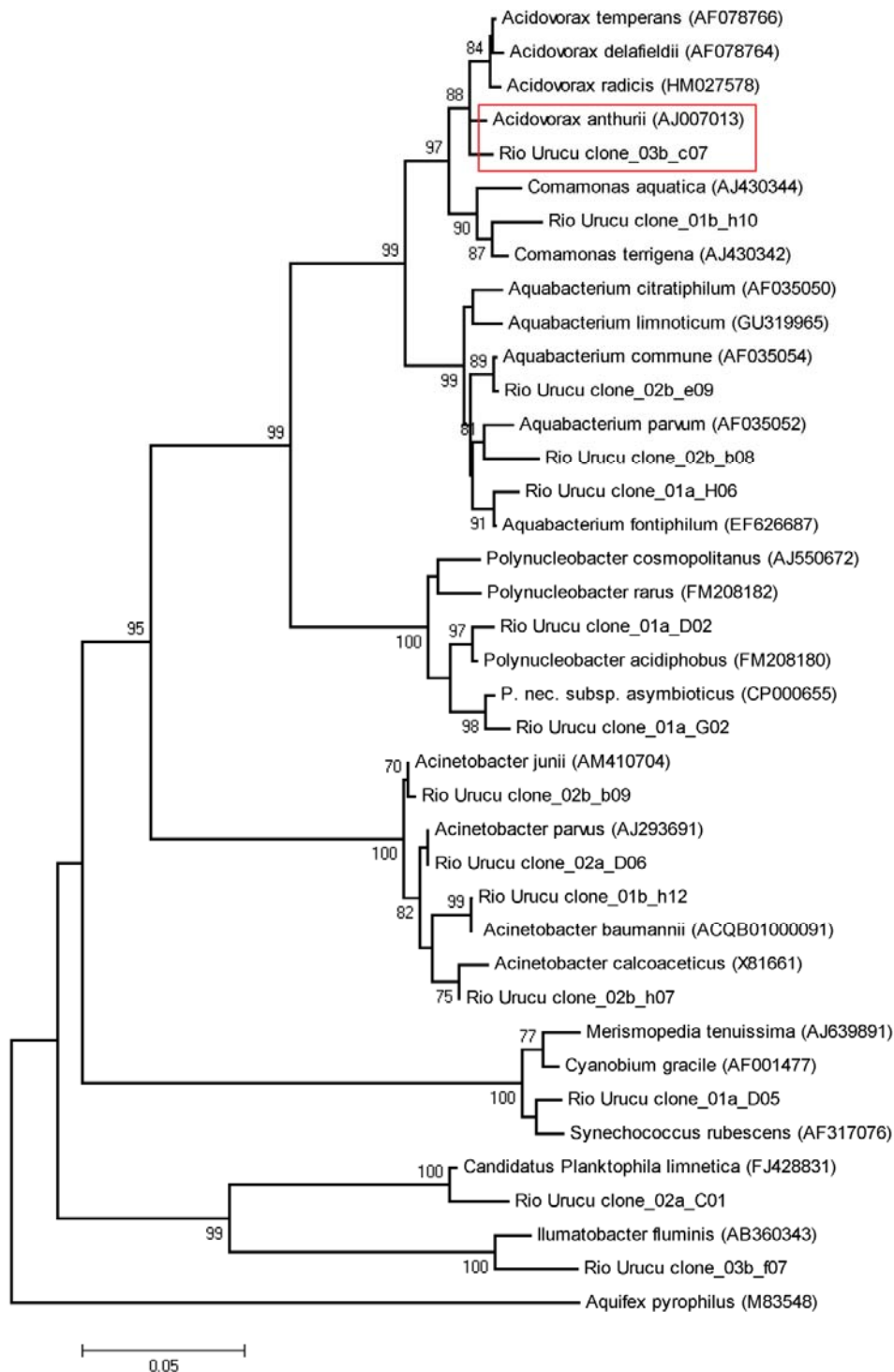


Figura 44 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com a espécie *Acidovorax anthurii* da amostra do Rio Urucu (9U). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

O gênero *Aquabacterium* foi proposto por Kalmbach *et al.* (1999) e atualmente compreende cinco espécies com nomes validamente publicados: *Aquabacterium citratiphilum*, *Aquabacterium commune*, *Aquabacterium parvum*, *Aquabacterium fontiphilum* e *Aquabacterium limnoticum*. O gênero pertence a ordem *Burkholderiales* na classe *Betaproteobacteria*. *Aquabacterium citratiphilum*, *Aquabacterium commune* e *Aquabacterium parvum* foram isoladas de biofilmes a partir do sistema de água potável em Berlin (KALMBACH *et al.*, 1999), enquanto que a espécie *Aquabacterium fontiphilum* foi isolada de uma amostra de água coletada de uma nascente localizada dentro do Nature Valley, Hsinchu County, Taiwan (LIN *et al.*, 2009).

As espécies pertencentes a este gênero são móveis por meio de flagelos polares únicos e o crescimento é observado sob condições aeróbicas e de microaerofilia (KALMBACH *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2009).

Nas amostras da Amazônia, o gênero foi mais observado nas amostras de rios do que de lagos (figura 45), sendo presente nas amostras 9U (dezessete sequências), 8S (vinte e quatro sequências), e uma sequências para a amostra 4S (figura 46).

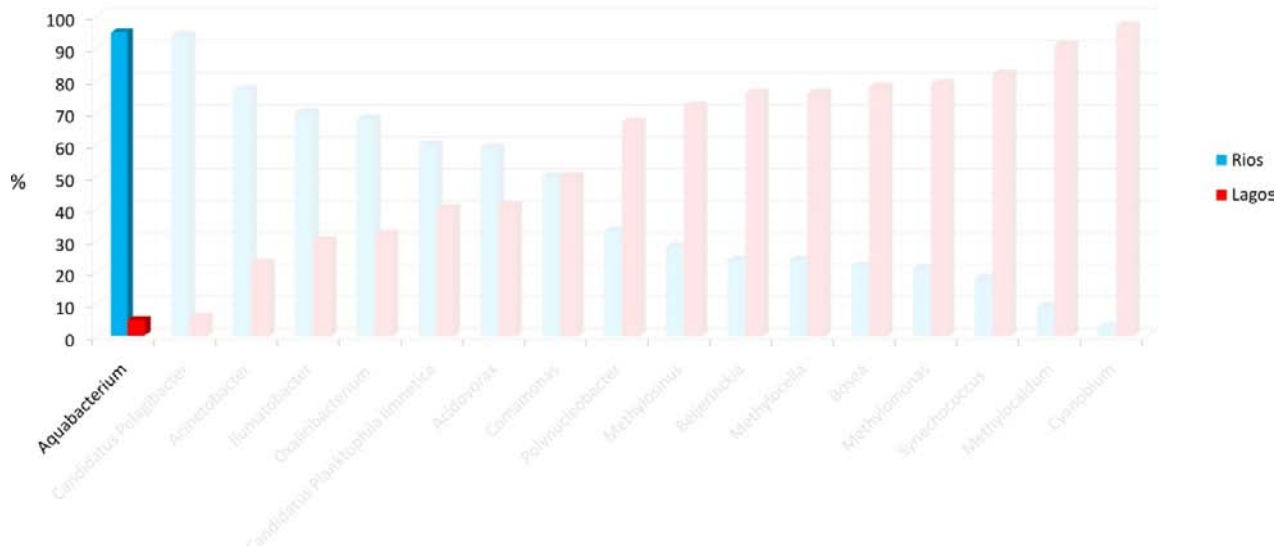


Figura 45 – Representatividade do gênero *Aquabacterium* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

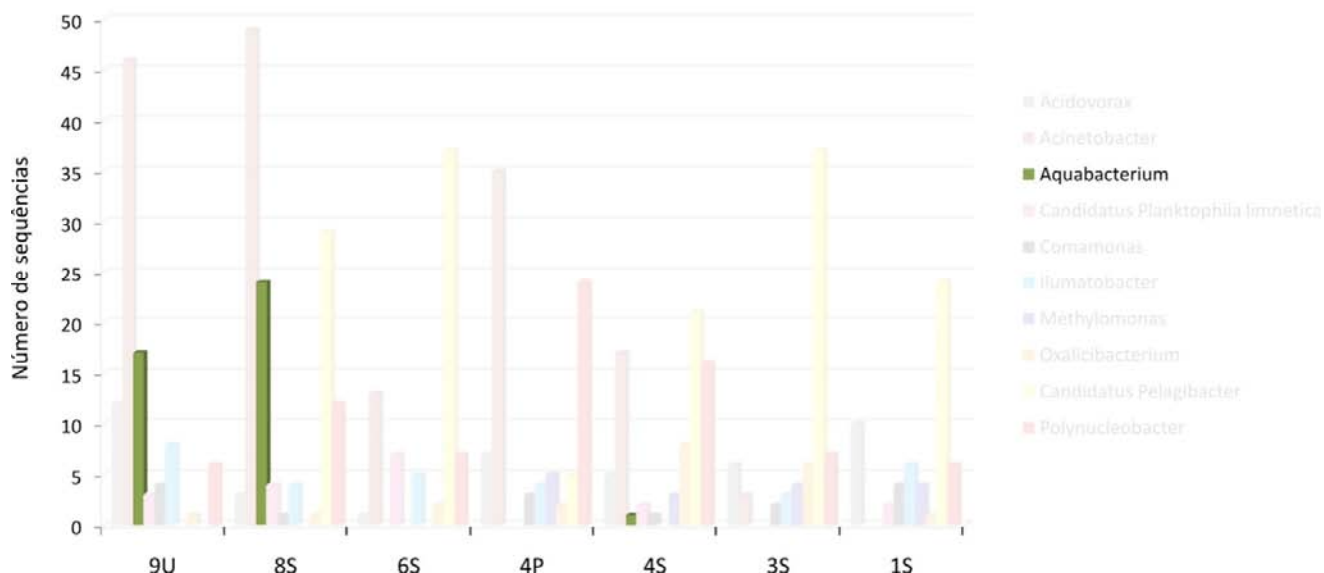


Figura 46- Abundância do gênero *Aquabacterium* (verde) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

Foram observadas sequências afiliadas com três das cinco espécies descritas para o gênero *Aquabacterium*: *Aquabacterium commune* B8(T), *Aquabacterium parvum* B6(T) e *Aquabacterium fontiphilum* CS-6(T) em apenas duas amostras de rios, Rio Urucu (9U) e Rio Solimões (8S), com um mínimo de uma sequência para *Aquabacterium commune* na amostra 8S a até oito sequências para *Aquabacterium parvum* na amostra 8S (tabela 21). Porcentagens de identidade foram observadas com um máximo de 97,8 % para *Aquabacterium commune* B8(T) na amostra 9U, 99% para *Aquabacterium parvum* B6(T) na amostra 8S e 98,6 % para *Aquabacterium fontiphilum* CS-6(T) na amostra 9U. A proximidade das sequências obtidas com as espécies em questão é ilustrada na árvore filogenética (figura 47).

Tabela 21 – Espécies do gênero *Aquabacterium* encontradas nas amostras de rios. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophilia limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

O gênero *Aquabacterium* é normalmente encontrado em ambientes oligotróficos, como sistemas de água potável, onde a atividade bacteriana pode ser limitada pelos baixos teores de carbono orgânico e, possivelmente, pela disponibilidade de fósforo. Esses micro-organismos necessitam de baixos requerimentos nutricionais para sobreviver (PANG & LIU, 2006).

Nas amostras da Amazônia, não foi possível realizar análises de nutrientes, não podendo assim afirmar com certeza, que a presença de organismos afiliados com espécies pertencentes ao gênero *Aquabacterium* nas amostras 9U e 8S seja pela baixa quantidade de nutrientes. Esse pode ser um fator que justificaria a presença desses organismos apenas nessas duas amostras, onde a pressão de seleção favoreceria o crescimento de organismos fisiologicamente adaptados para sobreviver sob condições de baixas quantidades de nutrientes. Sabe-se que o Rio Urucu (9U) é um rio de água preta e esse tipo de água é pobre em nutrientes e em material em suspensão.

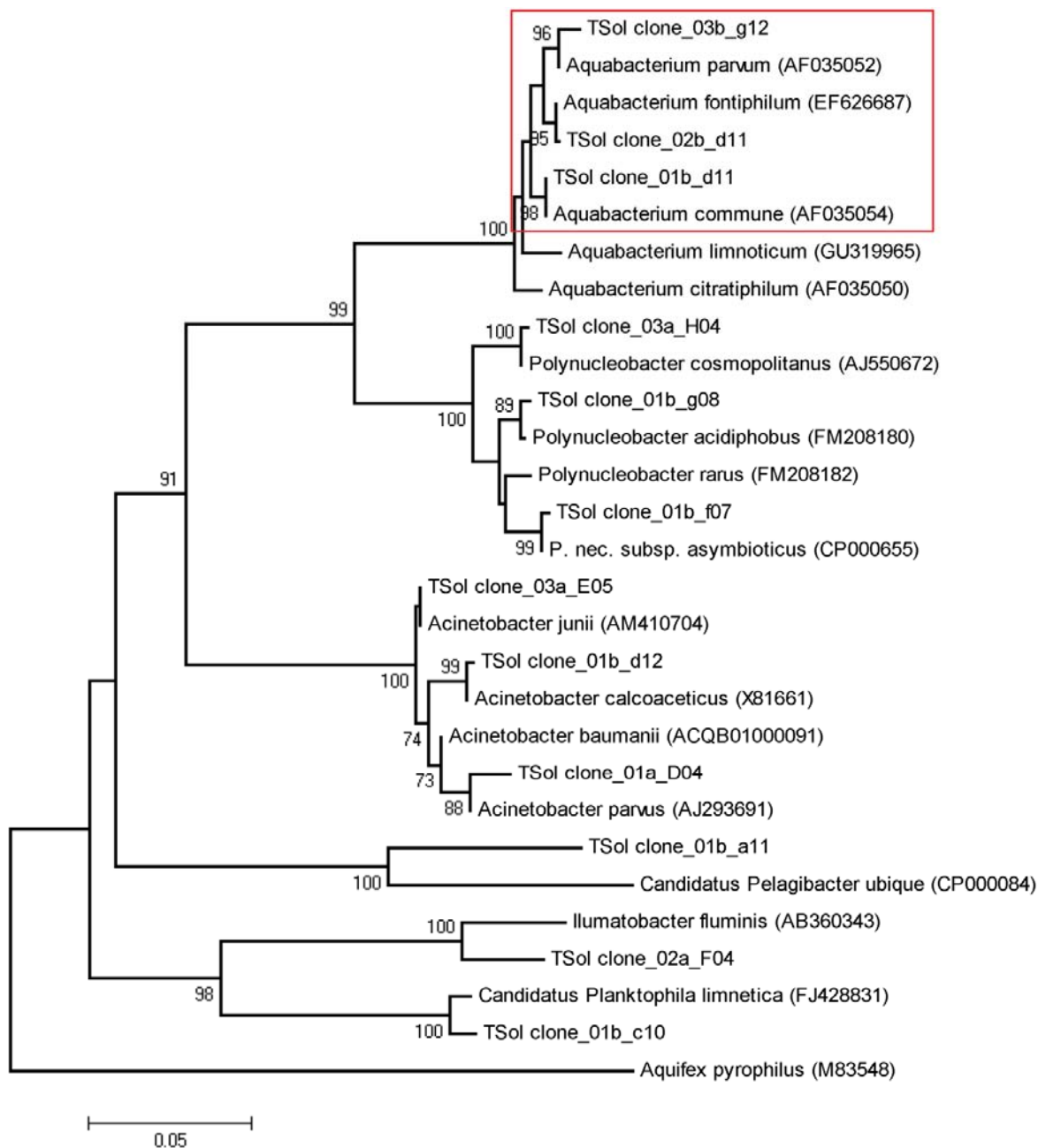


Figura 47 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies do gênero *Aquabacterium* da amostra do Rio Solimões TSOL (8S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Micro-organismos com sequências associadas com o gênero *Oxalicybacterium* (*Betaproteobacteria*) foram observados tanto nas amostras de rios quanto nas de lagos. No entanto, foram mais representativas nas amostras de rios (figura 48), sendo observados em todas as amostras de rios com um máximo de oito sequências na amostra 4S (figura 49). A relação das sequências observadas com o gênero *Oxalicybacterium* é notada na árvore filogenética (figura 50), devido à proximidade com espécies do gênero em questão. Organismos pertencentes a este gênero são aeróbicos e capazes de utilizar oxalato como única fonte de carbono e energia (TAMER *et al.*, 2002).

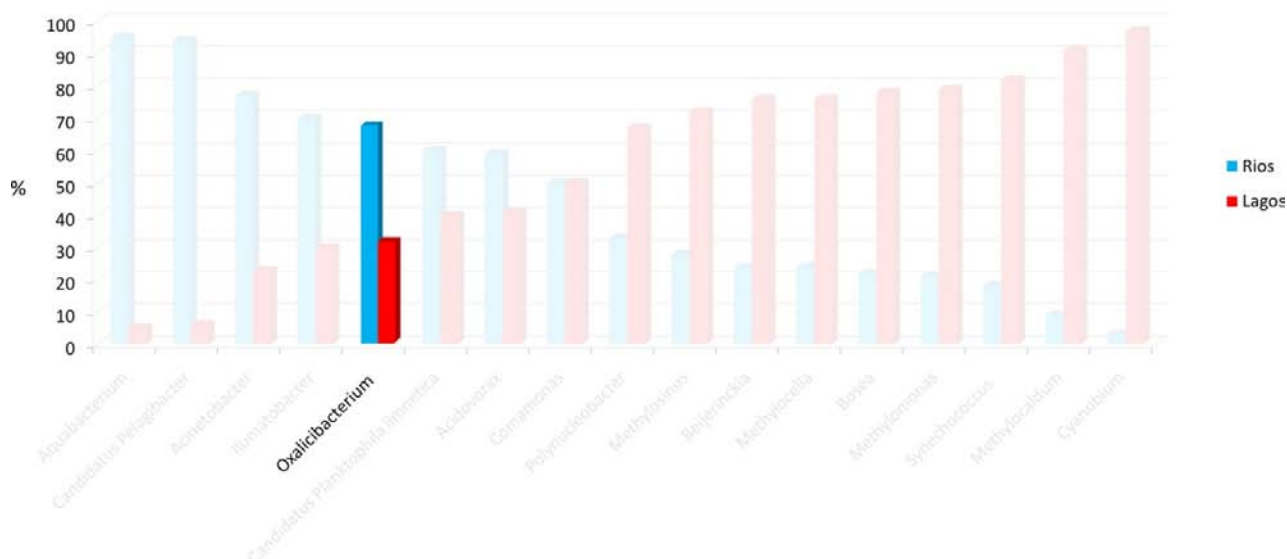


Figura 48 – Representatividade do gênero *Oxalicybacterium* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

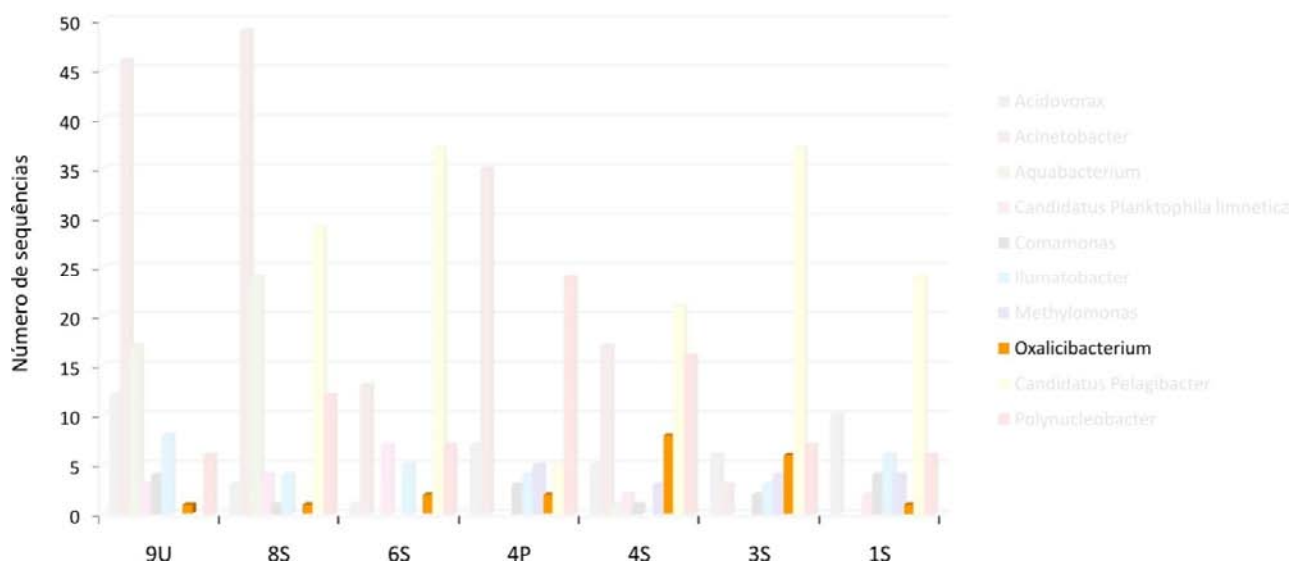


Figura 49- Abundância do gênero *Oxalicibacterium* (alaranjado) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

O ácido oxálico é frequentemente acumulado como um produto metabólico final em células de plantas e em fungos. Muitos gêneros de plantas acumulam quantidades significativas de cristais de oxalato, que podem ser rapidamente catabolizadas aerobicamente por micro-organismos de solo (TAMER *et al.*, 2002).

Até o momento, apenas quatro espécies foram descritas para este gênero, isoladas de resíduos de plantas que produzem oxalato, solos de jardim, solo urbano e esterco de galinha (TAMER *et al.*, 2002; SAHIN *et al.*, 2009; SAHIN *et al.*, 2010).

Com base nas características dos ambientes de onde as espécies do gênero *Oxalicibacterium* foram isoladas, acredita-se que as sequências afiliadas com organismos do gênero *Oxalicibacterium* presentes nas amostras de rios e lagos da Amazônia sejam resultantes do solo da floresta circundante.

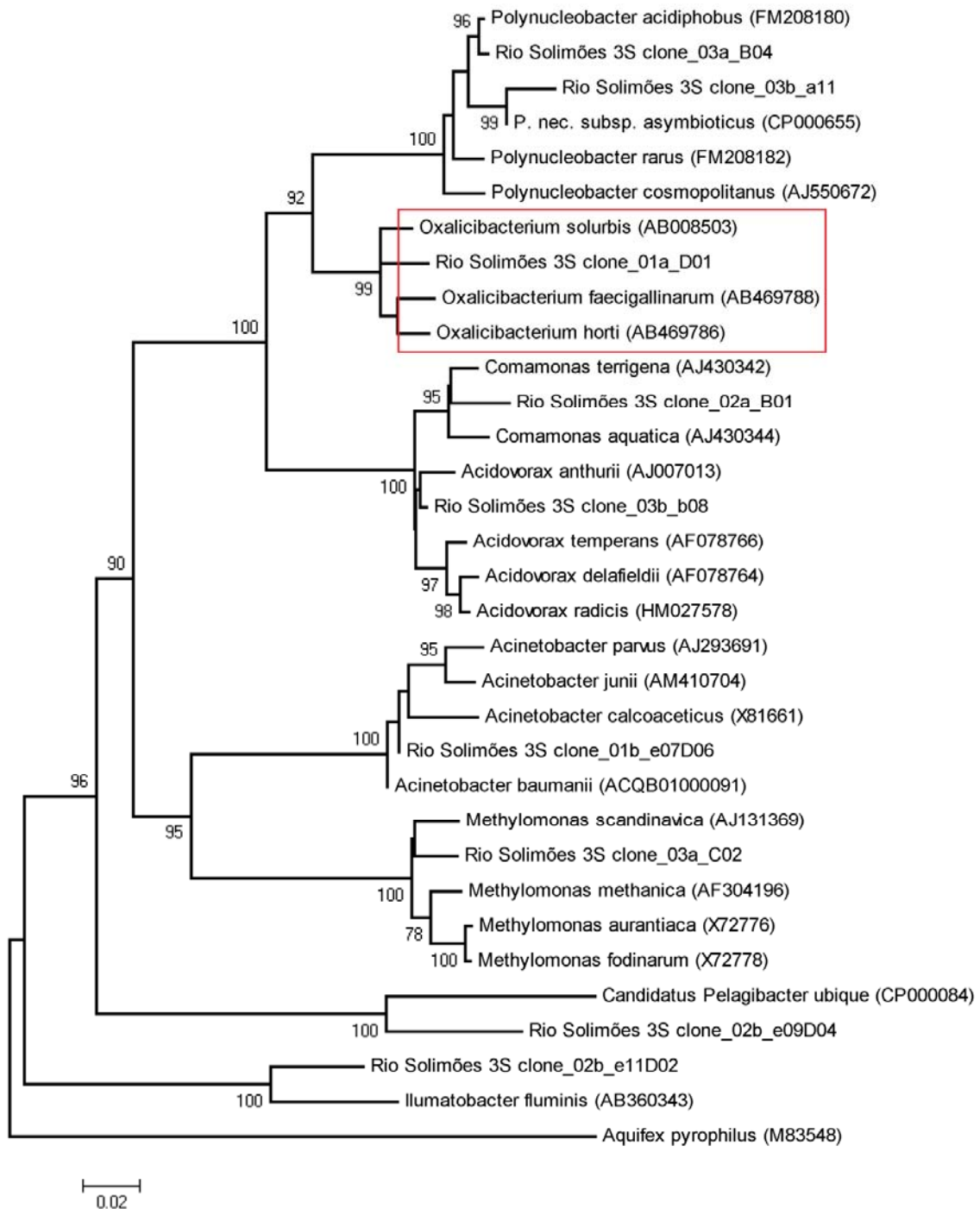


Figura 50 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com o gênero *Oxalicibacterium* da amostra do Rio Solimões (3S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

Já o gênero *Bosea* se encontra dentro da classe *Alphaproteobacteria*. Seus representantes são formados por organismos estritamente aeróbicos, capazes de oxidar compostos inorgânicos de enxofre reduzido e que são móveis por meio de um único flagelo polar ou subpolar (DAS *et al.*, 1996; OUATTARA *et al.*, 2003; LA SCOLA *et al.*, 2003).

Os micro-organismos utilizam compostos de enxofre para a biossíntese de material celular ou para transformar estes compostos como parte de um processo de geração de energia respiratória (DAS *et al.*, 1996).

Espécies do gênero *Bosea* foram isoladas de amostras de solo agrícola, de abastecimento de água de hospital e de um digestor anaeróbico. No entanto, essa espécie isolada do digestor é uma bactéria ambiental, provavelmente proveniente de solo ou água, que foi isolada como um micro-organismo transitório (DAS *et al.*, 1996; OUATTARA *et al.*, 2003; LA SCOLA *et al.*, 2003). Nas amostras da Amazônia, sequências associadas com o gênero *Bosea* foram observadas de maneira mais representativa nas amostras de lagos (figura 51), em todas as amostras, com um máximo de quinze sequências na amostra 3L (figura 52). Apesar de não ter sido possível a identificação em nível de espécie, podemos verificar, na figura 53, que as nossas sequências se encontram próximas a algumas espécies do gênero *Bosea* representadas na árvore filogenética. Desta forma, é possível que exista nesses ambientes um teor suficiente de enxofre, justificando a presença desses organismos.

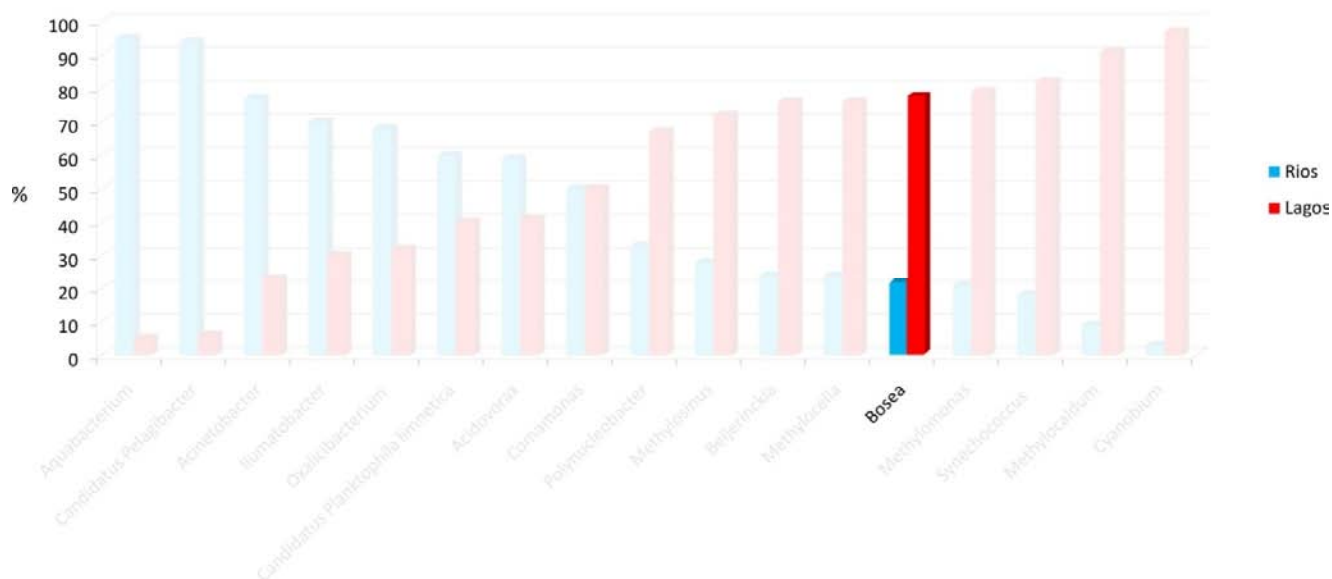


Figura 51 – Representatividade do gênero *Bosea* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

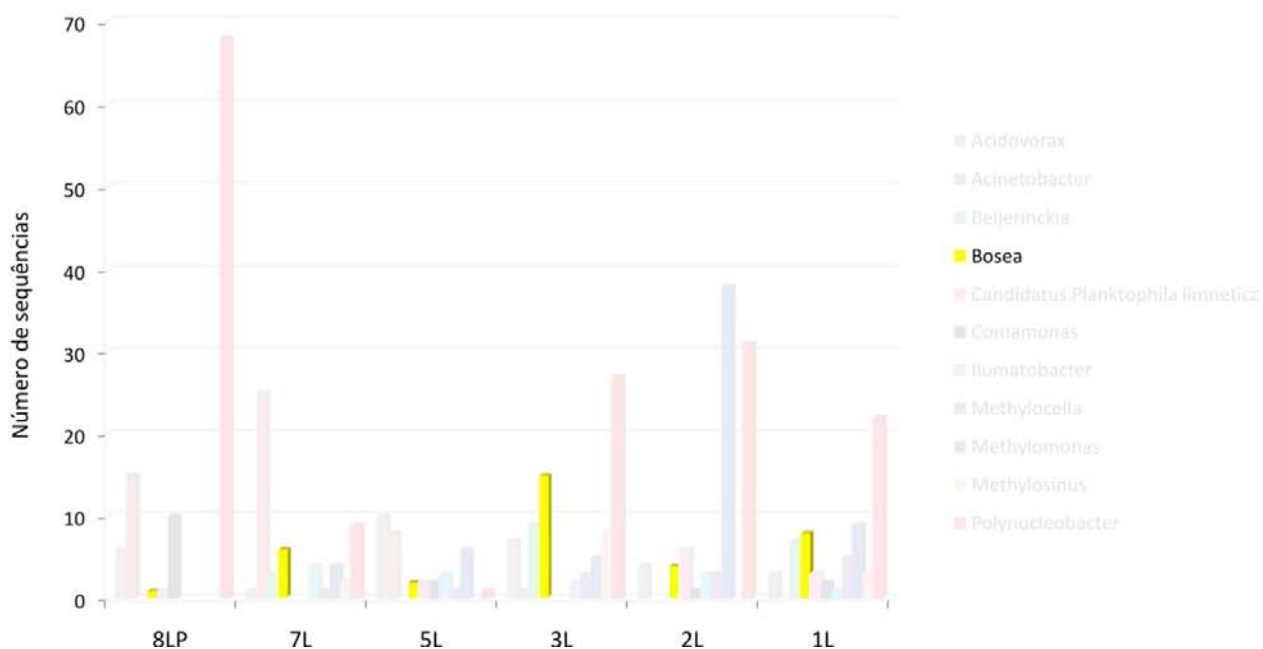


Figura 52- Abundância do gênero *Bosea* (amarelo) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

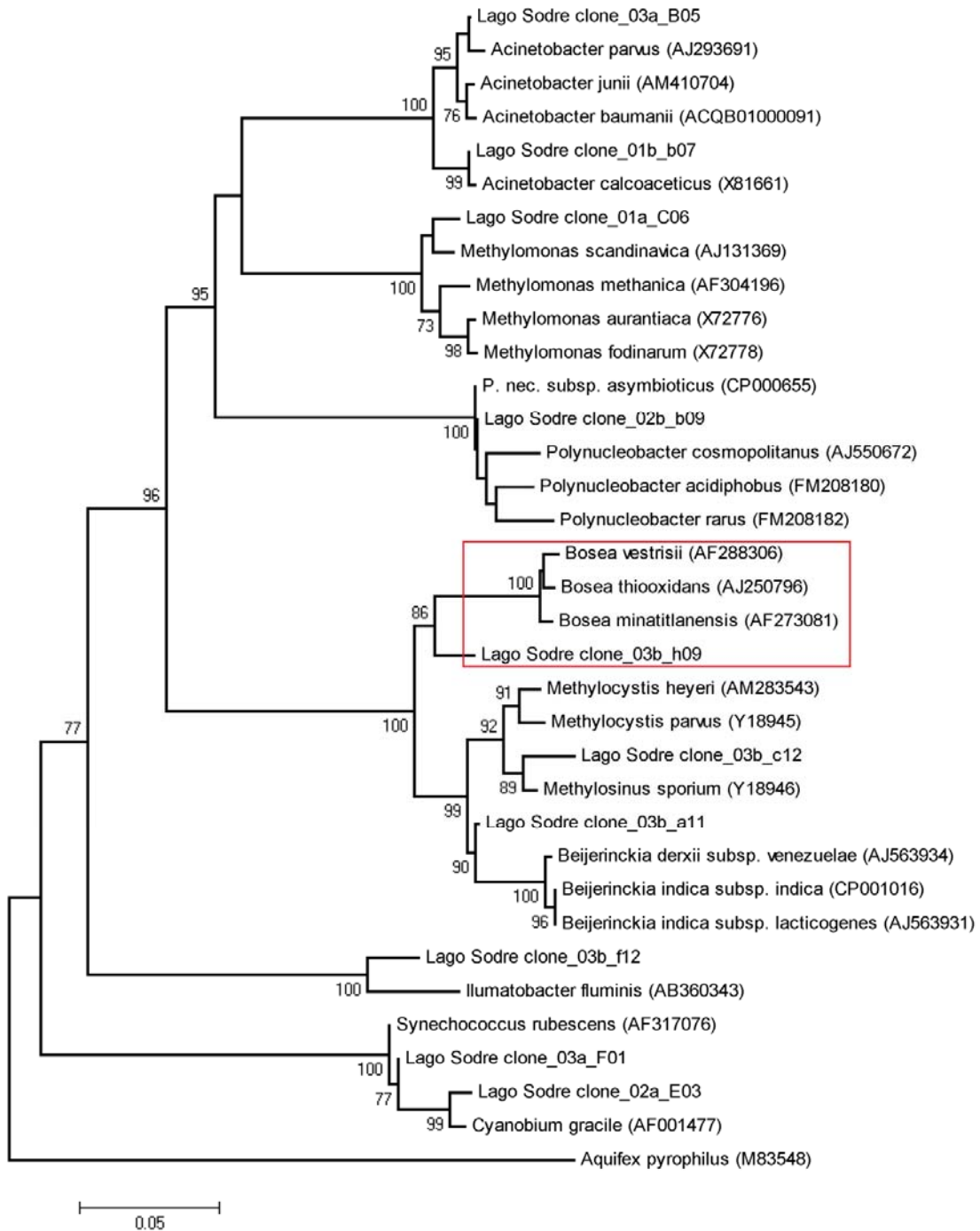


Figura 53 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com o gênero *Borea* da amostra do Lago Sodré (7L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

4.3.6 Bactérias encontradas neste estudo e que são típicas de ambientes marinhos

O gênero *Ilumatobacter*, pertence ao filo *Actinobacteria*, e é representado por bactérias aeróbicas, não-móveis. Até o momento, a única espécie descrita é a *Ilumatobacter fluminis*, que foi isolada de sedimentos de um estuário no Japão. Água marinha ou água marinha artificial é necessária para seu crescimento, em temperaturas entre 26 a 31°C e pH entre 7 – 11 (MATSUMOTO *et al.*, 2009). O gênero *Ilumatobacter* foi observado tanto nas amostras de lagos quanto nas amostras de rios, sendo mais representado nas amostras de rios (figura 54). Nas amostras de rios, um mínimo de três sequências foi observado na amostra 3S e um máximo de oito na amostra 9U (figura 55). Já nas amostras de lagos, um mínimo de uma sequência estava presente na amostra 1L a um máximo de quatro na amostra 7L (figura 56). Sequências afiliadas com o gênero em questão foram observadas em praticamente todas as amostras de rios e lagos com exceção das amostras 8LP e 4S. Foi observado um máximo de identidade de 95,3 % com a espécie *Ilumatobacter fluminis*, podendo as sequências encontradas em rios e lagos da Amazônia representar uma outra espécie ou mesmo outro gênero habitando ambientes de água doce, filogeneticamente próximos ao gênero *Ilumatobacter*. A proximidade com a espécie *Ilumatobacter fluminis* é verificada na figura 57, apesar das sequências da Amazônia não terem sido identificadas como associada com essa espécie, elas se encontram bem próximas, sugerindo que sejam do mesmo gênero.

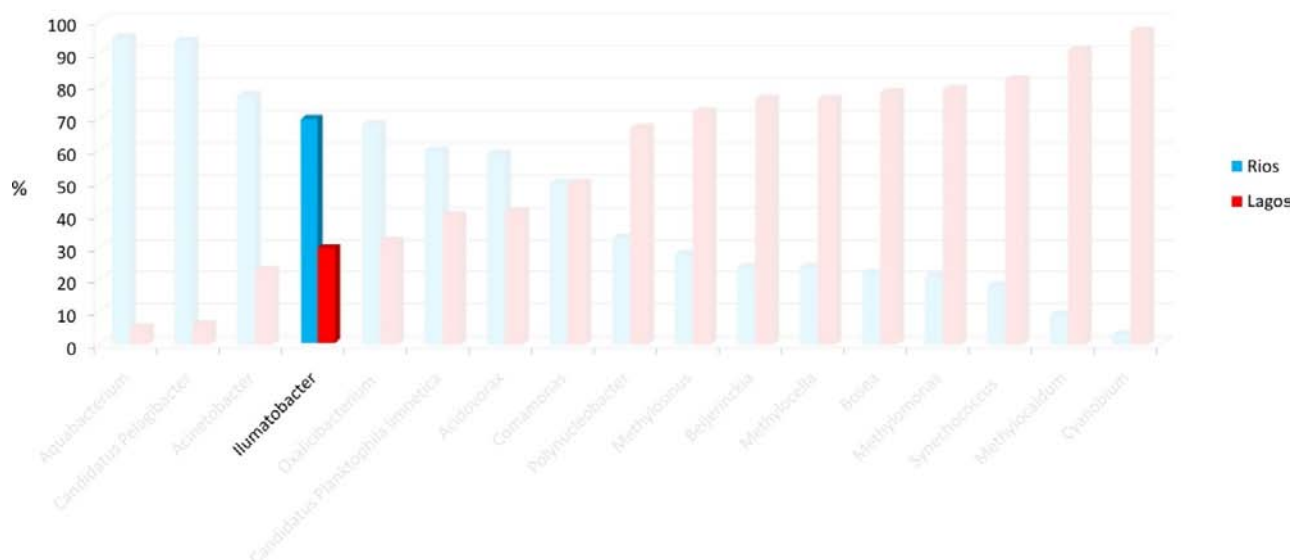


Figura 54 – Representatividade do gênero *Ilumatobacter* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

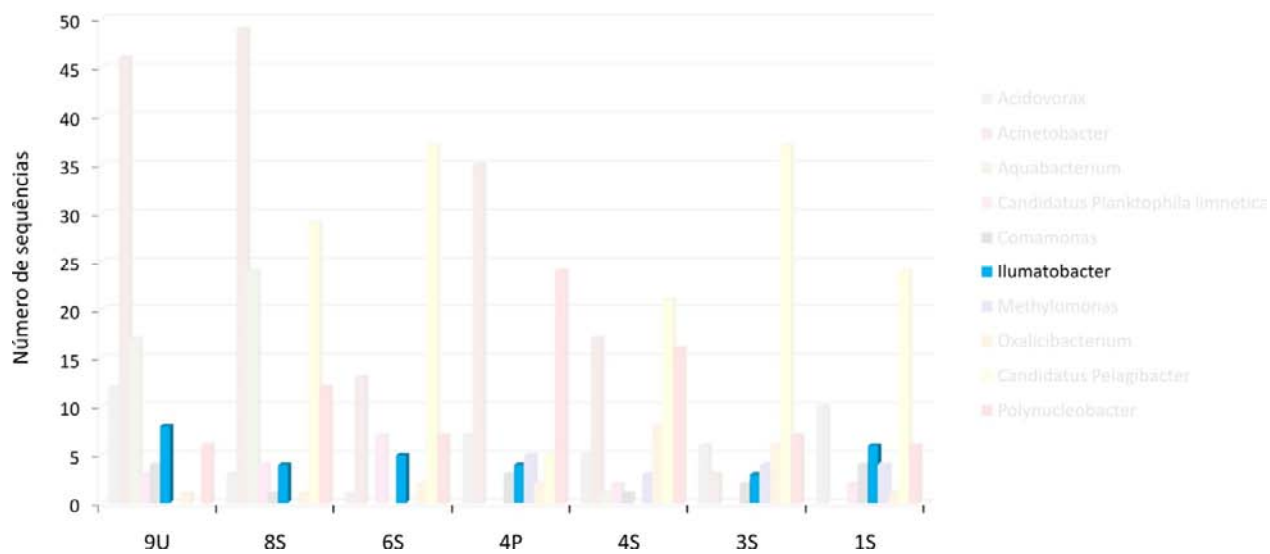


Figura 55- Abundância do gênero *Ilumatobacter* (azul) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

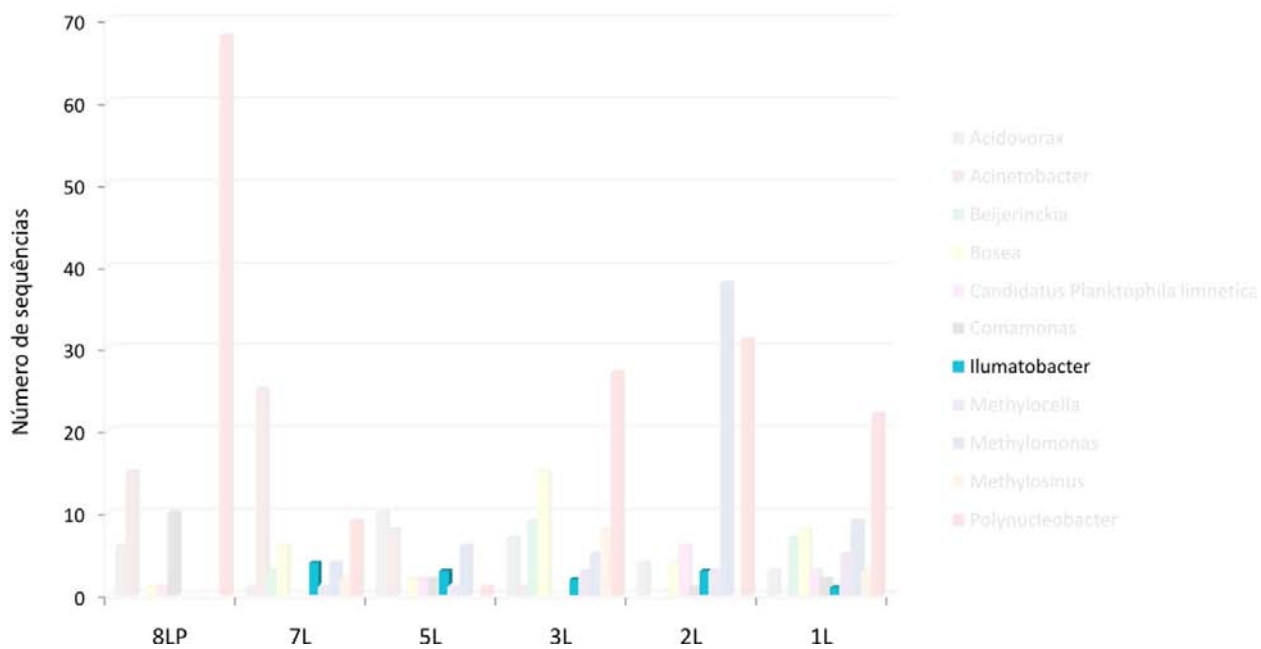


Figura 56- Abundância do gênero *Ilumatobacter* (azul) nas amostras de lagos. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

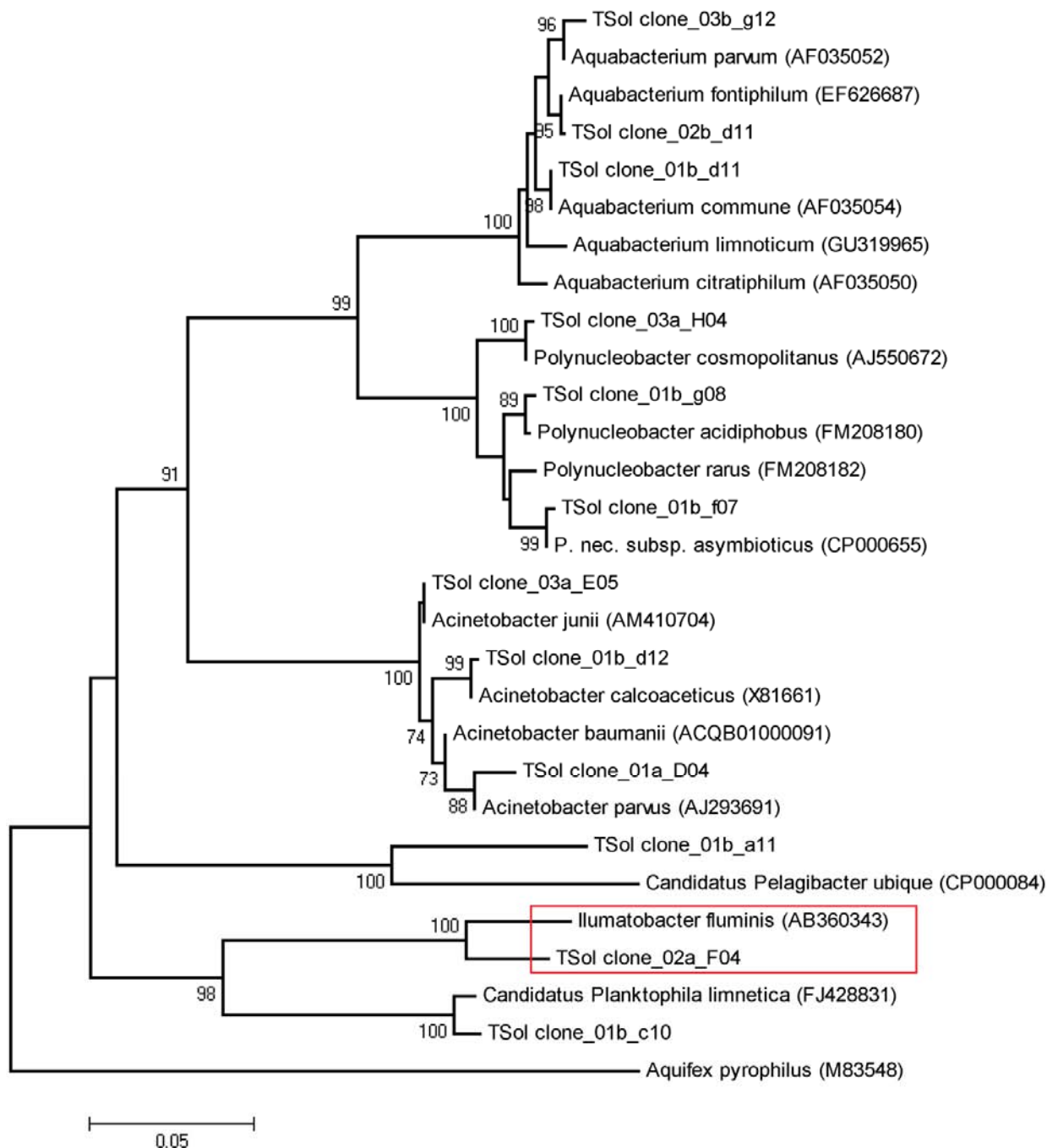


Figura 57 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com o gênero *Ilumatobacter* da amostra do Rio Solimões TSOL (8S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

O clado SAR11 apresenta membros da linhagem *Candidatus Pelagibacter*, que são comuns em ambientes marinhos, enquanto que são considerados raros ou ausentes em ambientes de água doce (PICCINI *et al.*, 2006). *Candidatus Pelagibacter ubique*, que se encontra dentro da classe *Alphaproteobacteria*, forma um grupo onipresente de bactérias aeróbicas, de vida livre, heterotróficas, marinhas, que podem representar até 35 % das populações do bacterioplâncton na superfície do oceano (SOWELL *et al.*, 2008; STEINDLER *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2011).

Sequências associadas com *Candidatus Pelagibacter* se mostraram abundantes nas amostras de rios da Amazônia (figura 58), constituindo um dos organismos mais representativos nessas amostras, sendo notada cerca de trinta e sete sequências nas amostras 6S e 3S (figura 59). No entanto, as sequências apresentaram baixa similaridade com *Candidatus Pelagibacter ubique*, com um máximo de identidade de 89 % nas amostras 8S, 6S e 4P. Porém, as sequências observadas nas amostras da Amazônia se encontram filogeneticamente próximas com a espécie *Candidatus Pelagibacter ubique* (figura 60), indicando que realmente essas sequências estão relacionadas com esse grupo marinho. No estudo metagenômico realizado por nosso laboratório (Ghai *et al.*, 2011) na amostra 8S, um substancial número de sequências associadas com *Candidatus Pelagibacter ubique* também foram observadas, confirmando os resultados do presente trabalho.

Essa baixa similaridade com *Candidatus Pelagibacter ubique* era esperada, uma vez que se trata de uma cepa marinha. Por outro lado, apesar de a linhagem *Candidatus Pelagibacter* ser rara em ambientes de água doce, ela ainda assim ocorre nesse meio. Dessa forma, a alta representatividade desse grupo nas amostras da Amazônia se deve provavelmente a uma linhagem típica de água doce, relacionada com esse grupo abundante em ambientes marinhos.

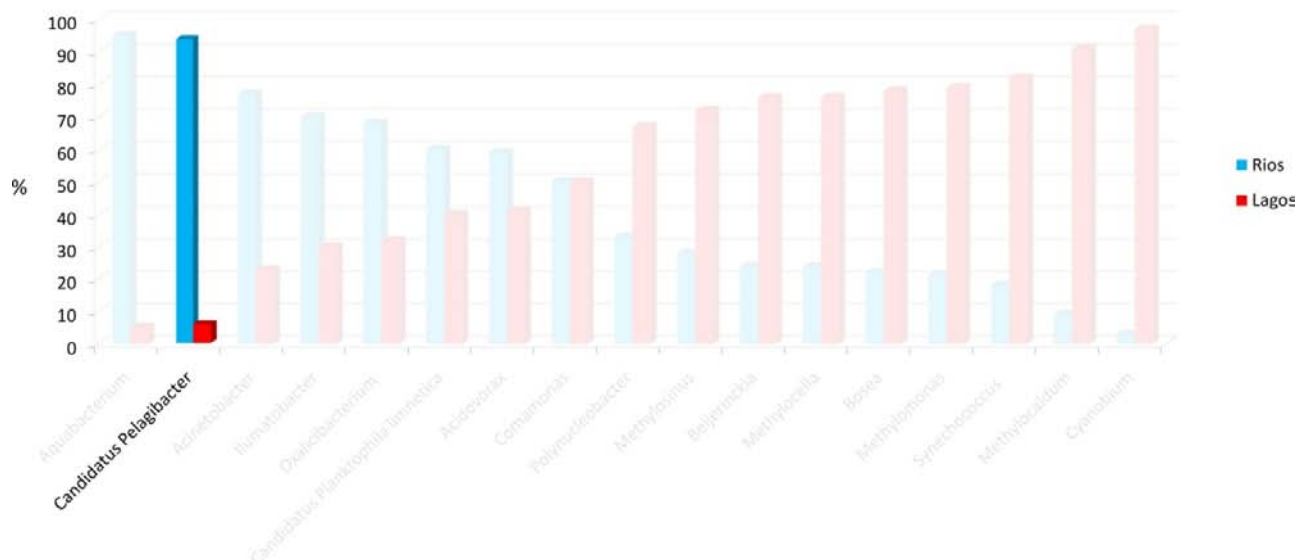


Figura 58 – Representatividade do gênero *Candidatus Pelagibacter* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

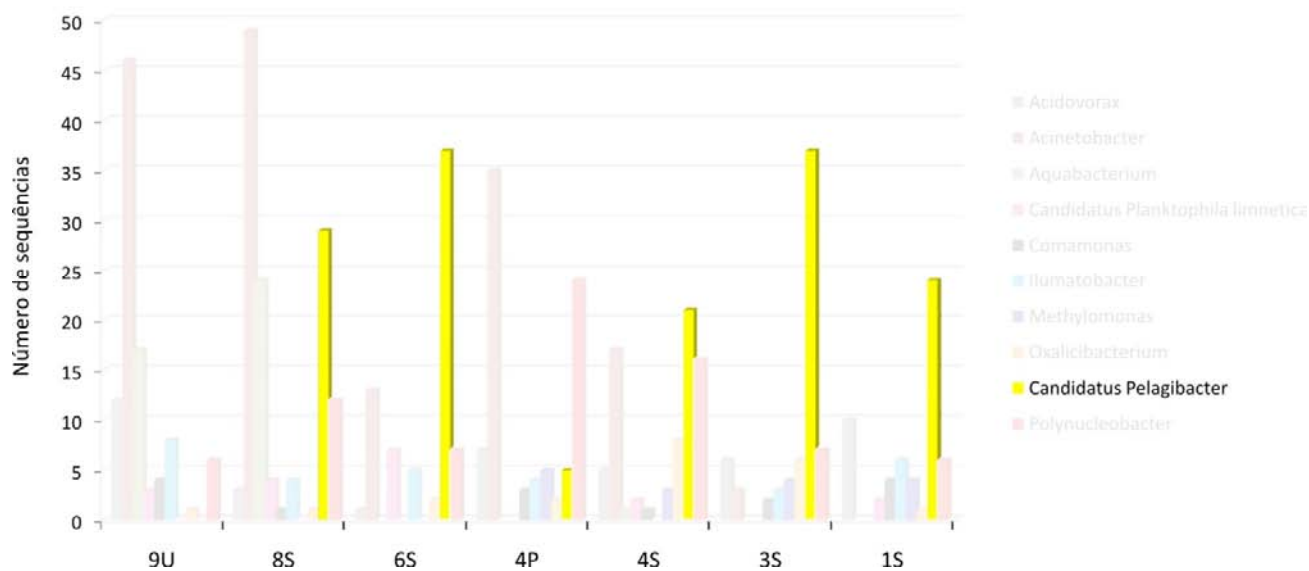


Figura 59- Abundância do gênero *Candidatus Pelagibacter* (amarelo) nas amostras de rios. Na figura, o gênero em questão, está realçado para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

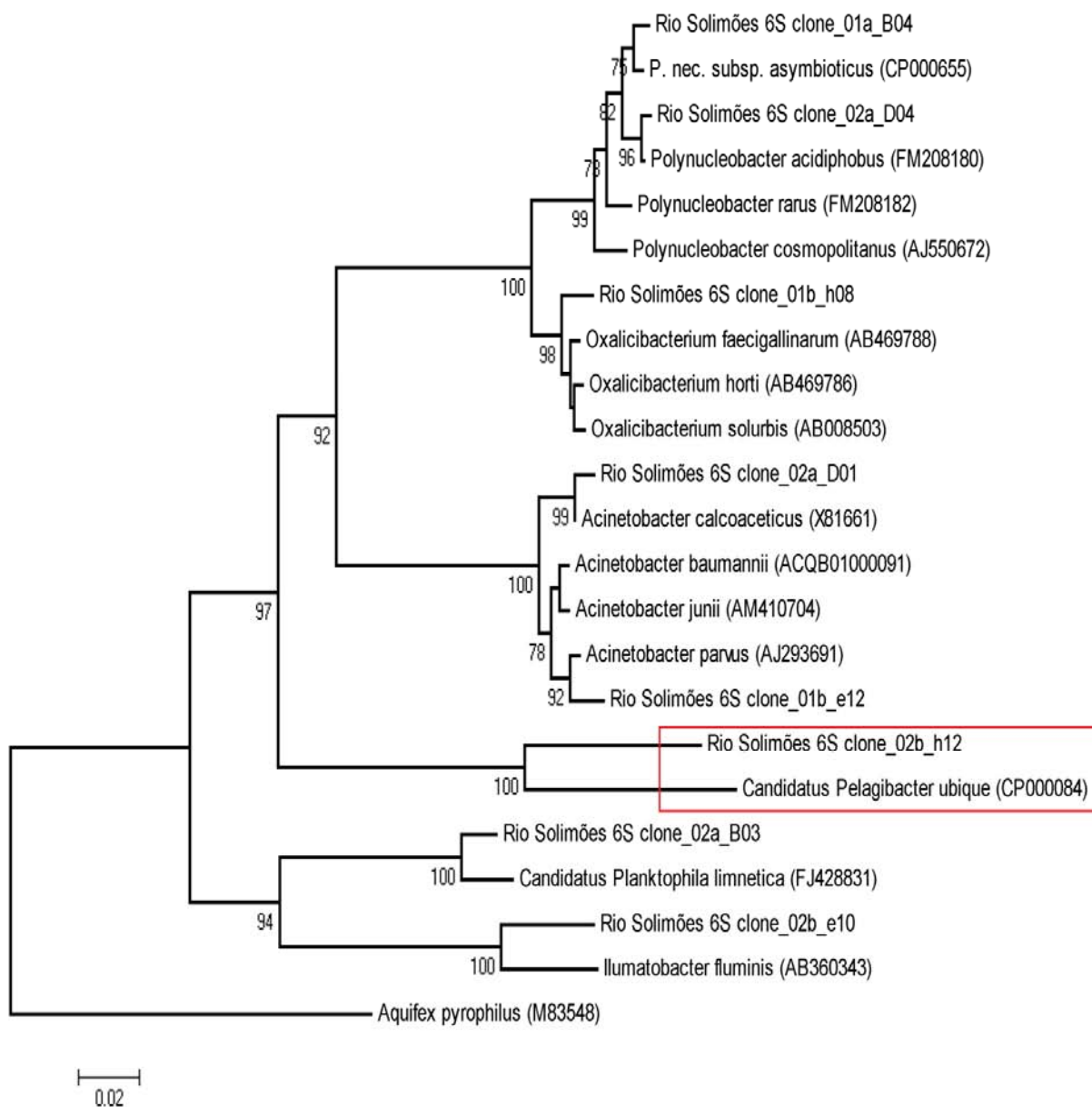


Figura 60 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com o gênero *Candidatus Pelagibacter* da amostra do Rio Solimões (6S). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

4.3.7 Produtores primários

Cianobactérias são procaríotos capazes de realizar a fotossíntese, que compartilham similaridade na estrutura e função do seu aparato fotossintético com plantas superiores, algas verdes e vermelhas (LOHSCHIEDER *et al.*, 2011).

As cianobactérias também são responsáveis por uma proporção significativa da fixação biológica de nitrogênio na Terra, que é realizada pelas espécies filamentosas que possuem células diferenciadas chamadas heterocistos. Na várzea amazônica, uma importante fonte de entrada de nitrogênio se deve às cianobactérias de vida livre que formam heterocistos (FIORE *et al.*, 2005).

No presente estudo, foram observadas cianobactérias denominadas de picocianobactérias, as quais variam em tamanho de 0,2 a 2 μm (CALLIERI & STOCKNER, 2002). Foram observadas sequências associadas com dois gêneros de picocianobactérias unicelulares, *Cyanobium* e *Synechococcus*, em praticamente todas as amostras de lagos (7L, 5L, 3L e 1L) (figura 61) e em uma amostra de rio (9U). Cianobactérias filamentosas ou maiores que 5 μm não foram observadas, pois provavelmente ficaram retidas nos filtros de 5 μm utilizados para a filtração prévia da amostra de água.

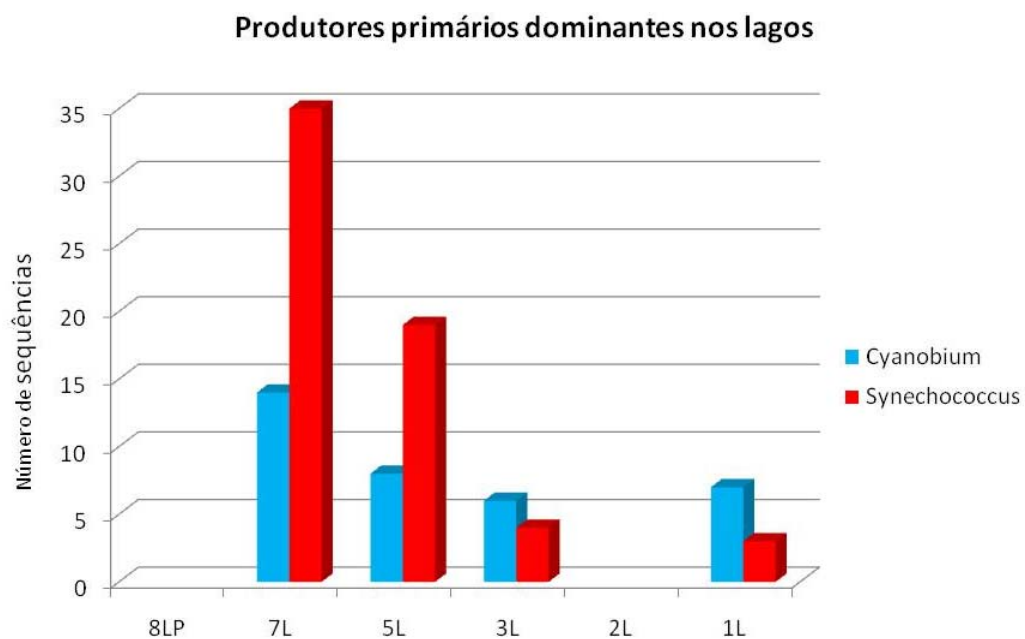


Figura 61 – Cianobactérias presentes nas amostras de lagos

Espécies do gênero *Synechococcus* são onipresentes e ocorrem em habitats marinhos e de água doce, contribuindo significativamente para a produção primária global em ecossistemas de todas as zonas climáticas. Podem ser observadas em habitats com condições extremas, como fontes termais e lagoas hipersalinas. Em habitats de água doce, *Synechococcus* é a picocianobactéria dominante (POSTIUS & ERNST, 1999; BECKER *et al.*, 2004). Nas amostras da Amazônia, *Synechococcus* foi abundante principalmente nas amostras 7L (trinta e cinco sequências) e 5L (dezenove sequências) (figura 61).

Sequências associadas com a espécie *Synechococcus rubescens* SAG B3.81 foram observadas nas amostras de lagos (tabela 22), com um mínimo de uma sequência (3L) a um máximo de dezenove (7L) e em uma amostra de rio (9U) (cinco sequências) (tabela 23). Uma porcentagem máxima de identidade de 98,4 % foi observada na amostra 1L. Esta espécie também foi observada na zona pelágica em três lagos subalpinos: Constance, Zurique e Maggiore (ERNST *et al.*, 2003).

Tabela 22 – Espécies do gênero *Cyanobium* e *Synechococcus* encontradas nas amostras de lagos. Na tabela, as espécies em questão, estão realçadas para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos lagos	8LP	7L	5L	3L	2L	1L
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	2		2		2	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	1		2			
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	10	7	1			
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)		5				
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	1		2		6	3
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)	5		1		1	
<i>Curvibacter delicatus</i> LMG 4328(T)	3				1	
<i>Cyanobium gracile</i> PCC6307		11	8	3		3
<i>Limnohabitans australis</i> MWH-BRAZ-DAM2DT	5					
<i>Limnohabitans curvus</i> MWH-C5T	3					
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)		1	1	2	14	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)		2		8		2
<i>Pelomonas saccharophila</i> DSM 654(T)			4			
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2	9		1	1		3
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	42	8		24	29	17
<i>Polynucleobacter rarus</i> MT-CBb6A5	8					
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81		19	10	1		3

Tabela 23 – Espécie do gênero *Synechococcus* encontrada nas amostras de rios. Na tabela, a espécie em questão, está realçada para melhor visualização, enquanto as demais estão em marca d'água

Espécies dominantes nos rios	9U	8S	6S	4P	4S	3S	1S
<i>Acidovorax anthurii</i> CFBP 3232(T)	1			3		1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606(T)	3			2	6	1	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006(T)	21	30	10	15	7		
<i>Acinetobacter junii</i> LMG 998(T)	7	1		5	2		
<i>Acinetobacter parvus</i> LUH 4616(T)	1	1	1	4			
<i>Aquabacterium commune</i> B8(T)	3	1					
<i>Aquabacterium fontiphilum</i> CS-6(T)	4	7					
<i>Aquabacterium parvum</i> B6(T)	5	8					
<i>Candidatus Planktophila limnetica</i> MWH-EgelM2-3	3	4	7		2		2
<i>Comamonas terrigena</i> LMG 1253(T)				2	1	1	1
<i>Curvibacter gracilis</i> 7-1(T)				2	3		
<i>Methylomonas scandinavica</i> R5(T)				1	1	1	
<i>Methylosinus sporium</i> NCIMB 11126(T)				3	2		
<i>Polynucleobacter acidiphobus</i> MWH-PoolGreen A3	1	3	4	2	8	4	4
<i>Polynucleobacter cosmopolitanus</i> MWH-Molso2		1		2	1		
<i>Polynucleobacter necessarius</i> subsp. <i>asymbioticus</i> QLW-P1DMWA-1	5	4	2	19	6	2	1
<i>Synechococcus rubescens</i> SAG 3.81	5						

Foram também observadas sequências associadas com a espécie de água doce *Cyanobium gracile* PCC 6307. Essas picocianobactérias são não-móveis e fotoautotróficas obrigatórias, observadas em praticamente todas as amostras de lagos com um mínimo de três sequências (1L e 3L) a um máximo de onze (7L) (tabela 22), e uma porcentagem máxima de 98,2 % na amostra 7L. A espécie tem sido isolada de lagos na zona temperada da Europa, América e Japão (ERNST *et al.*, 2003).

A figura 62 confirma a presença dessas duas picocianobactérias nos lagos da Amazônia, mostrando uma proximidade com essas espécies.

As picocianobactérias representam os menores produtores primários e desempenham um importante papel no abastecimento das cadeias alimentares de muitos ecossistemas oligotróficos de água doce e marinhos (JEZBEROVÁ & KOMÁRKOVÁ, 2007). Dessa forma, é possível que os lagos onde foram observadas grandes quantidades de sequências associadas com essas picocianobactérias (7L e 5L) sejam oligotróficos. No entanto, não é possível afirmar, já que análises limnológicas mais detalhadas não foram realizadas nesses lagos.

Como esperado, devido à dinâmica dos ambientes, os gêneros *Cyanobium* e *Synechococcus* foram os produtores primários dominantes nas amostras de lagos (figura 63).

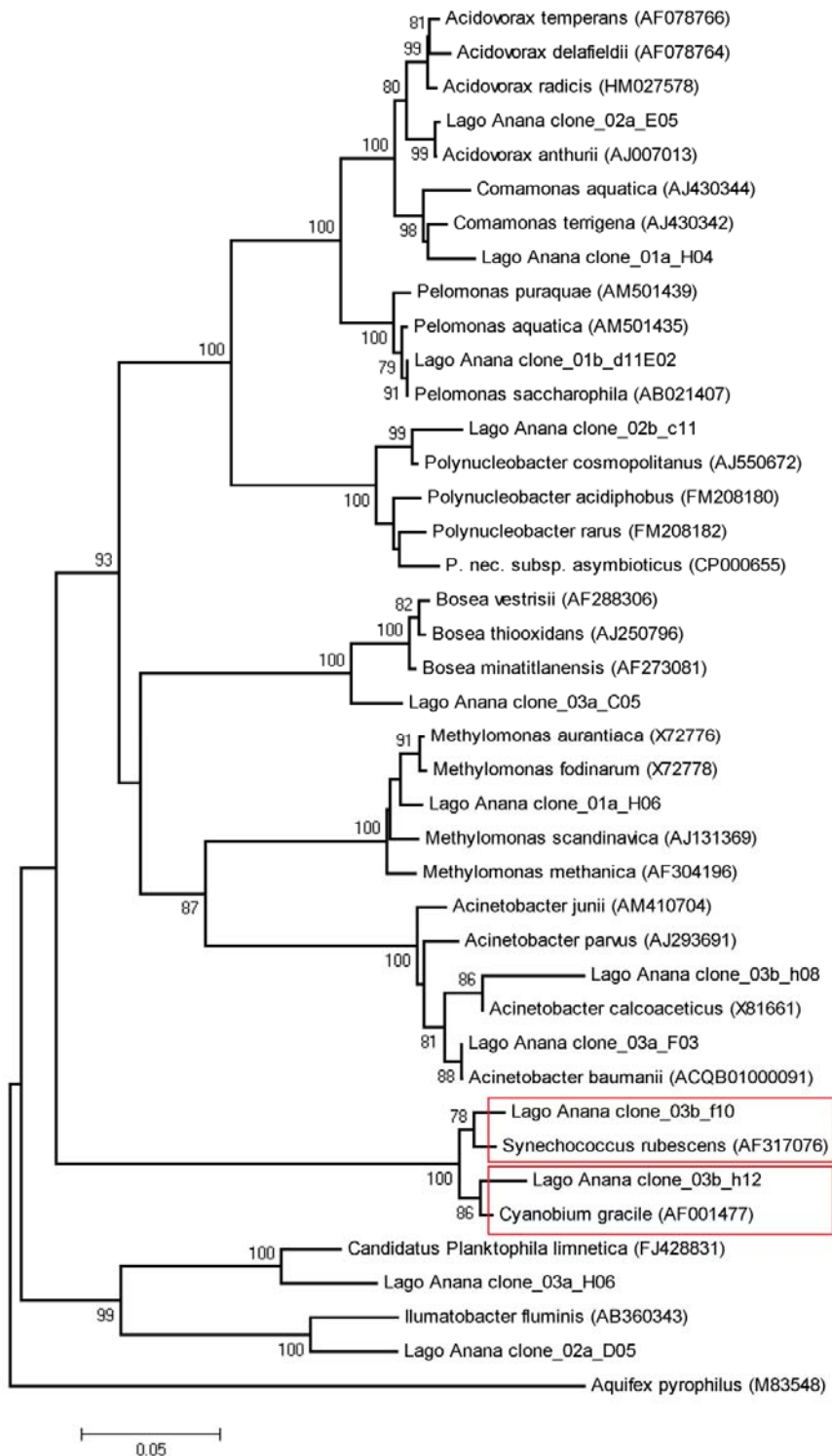


Figura 62 - Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sequências associadas com espécies de cianobactérias da amostra do Lago Ananá (5L). As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura-2-parâmetros e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* de 5000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Aquifex pyrophilus* foi usada como *outgroup*, essa espécie foi escolhida por ser filogeneticamente distante das espécies observadas nas amostras da Amazônia

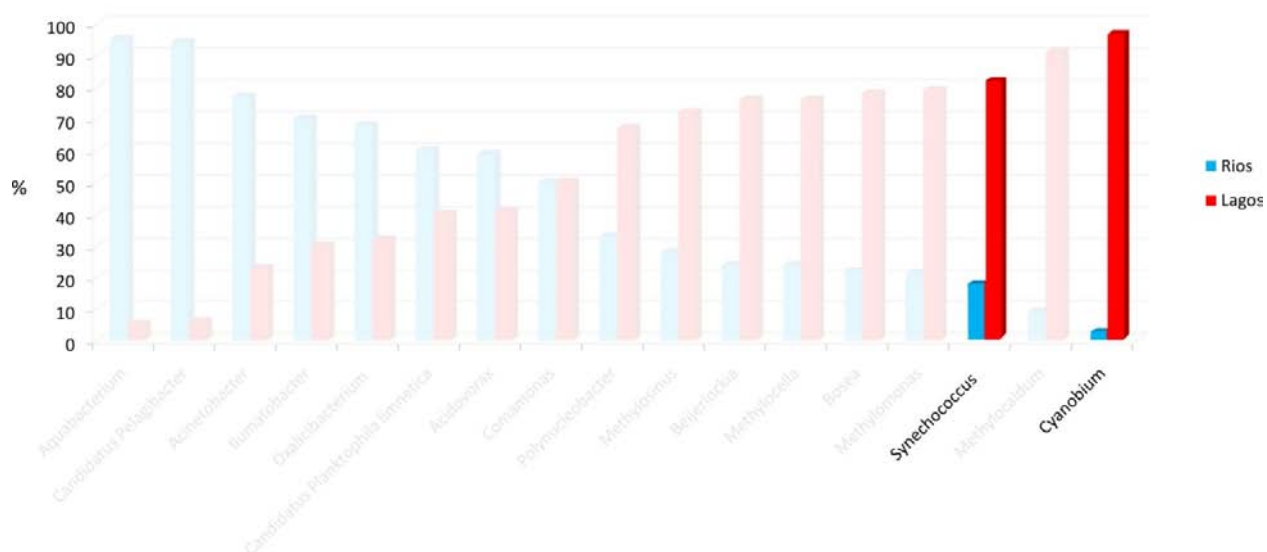


Figura 63 – Representatividade dos gêneros *Synechococcus* e *Cyanobium* nas amostras de rios (azul) e lagos (vermelho). Na figura, os gêneros em questão, estão realçados para melhor visualização, enquanto os demais estão em marca d'água

**RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE B:
ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE ARQUÉIA**

5. Estudo da biodiversidade de arqueia

Arquéias são micro-organismos filogeneticamente distintos das bactérias e que por algum tempo acreditou-se existir apenas em ambientes extremos. No entanto, avanços nas técnicas moleculares têm permitido a descoberta de arqueias nos mais diversos ambientes não extremos, o que nos levou a buscar esses organismos em nossas amostras da região Amazônica.

5.1 Resultados e Discussão

5.1.1 Amplificação do 16S rRNA

A amplificação do gene 16S rRNA do domínio *Archaea* foi realizada com os *primers* 21F e 958R, para amplificar especificamente uma região de 937 pb do gene 16S rRNA, como exemplificado na figura 64. No entanto, dos treze pontos amostrados, a amplificação do gene 16S rRNA foi possível apenas para cinco pontos de coleta: Rio Solimões - 1S (Município de Iranduba); Rio Solimões - 3S (Município de Manacapuru); Rio Solimões - 6S (Município de Codajás); Rio Solimões a montante do Terminal do Solimões - 8S TSOL (Município de Coari); e Foz do Rio Urucu - 9U (Município de Coari). Algumas amostras não amplificaram possivelmente devido à ausência de arqueia nos demais pontos ou pela baixa qualidade do DNA, dificultando a amplificação desses materiais.

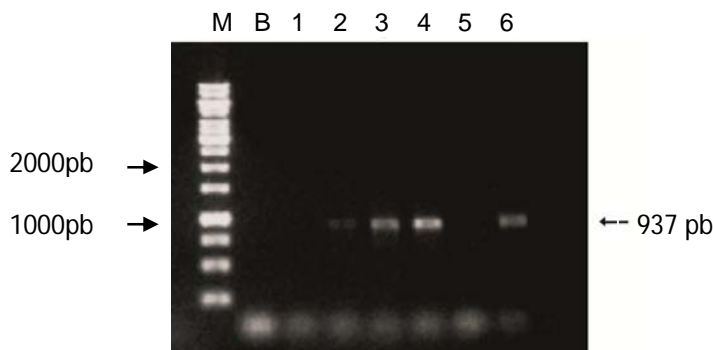


Figura 64 – Exemplos de amplificação do 16S rRNA de arqueia de diferentes pontos de coleta. A banda amplificada possui 937 pb. M: Marcador molecular 1kb “Gene Ruler”; B: Reação sem DNA; 1-6: Amostras do Rio Solimões e lagos adjacentes

5.1.2 Diversidade de arqueia em rios da Amazônia

A região amazônica possui uma grande diversidade biológica, tanto relacionada à fauna e flora, quanto microbiológica. Porém, muitos estudos ainda devem ser realizados para a compreensão da diversidade na região, principalmente no que diz respeito à diversidade microbiana. Borneman e Triplett (1997) publicaram o primeiro trabalho sobre a diversidade microbiana em solos da Amazônia, utilizando métodos moleculares independente de cultivo, onde dos 100 clones obtidos pela amplificação do gene 16S rRNA, 98 foram classificados no domínio *Bacteria* e 2 no domínio *Archaea*. Apesar da baixa quantidade de sequências, é notada a presença de arqueias nessa região.

Arquéias são micro-organismos procarióticos, que, por muito tempo, pensou-se que viviam apenas em ambientes extremos, tais como altas temperaturas, alta salinidade, acidez e pouco oxigênio. Porém, tem sido demonstrado que elas ocupam os mais diversos habitats (DeLONG 1998; CHABAN *et al.*, 2006). Taxonomicamente, o domínio *Archaea* é dividido em dois grandes grupos, *Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*, que, com base nas análises do 16S rRNA, tem sido demonstrado que são amplamente distribuídos.

No presente trabalho, foram construídas cinco bibliotecas de 16S rRNA para os seguintes pontos: Rio Urucu (9U), Rio Solimões a montante do Terminal do Solimões (TSOL) (8S), Rio Solimões - Município de Codajás (6S), Rio Solimões - Município de Manacapuru (3S) e Rio Solimões – Município de Iranduba (1S). A quantidade total de sequências e o número de sequências utilizadas para as análises podem ser observadas na tabela 24.

Tabela 24 – Número total e número de sequências utilizadas para análise da diversidade de arqueias

Local de coleta	ID	Número total sequências	N. de sequências utilizadas para as análises
Foz do Rio Urucu	9U	192	139
Rio Solimões TSOL	8S	288	237
Rio Solimões	6S	192	166
Rio Solimões	3S	192	171
Rio Solimões	1S	192	174

A análise taxonômica revelou uma notável predominância de clones afiliados ao filo *Crenarchaeota*, seguido por arqueias onde a classificação não foi possível e por uma pequena parcela de *Euryarchaeota* (figura 65). Para algumas sequências foi possível a identificação em nível de classe, considerando uma porcentagem de identidade maior que 85%.

Em todos os pontos amostrados, o filo *Crenarchaeota* foi dominante em todas as bibliotecas em relação ao filo *Euryarchaeota* (figura 65), assim como nos resultados obtidos por Ghai *et al.* (2011), que observaram um domínio dos representantes do filo *Crenarchaeota* em relação ao filo *Euryarchaeota* em estudos do Metagenoma da Amazônia, analisando a amostra 8S – Rio Solimões a montante do Terminal do Solimões. Em estudo realizado por Pazinato *et al.* (2010), foi estudada a diversidade de arqueias em solo de várzea da região amazônica, e os resultados foram semelhantes, com 65% das sequências para organismos pertencentes ao filo *Crenarchaeota* e 35% classificadas como pertencentes ao filo *Euryarchaeota*. Este tipo de solo, que sofre inundações sazonais, está localizado nas margens dos rios de águas brancas, que é o mesmo tipo de água do Rio Solimões, cujas amostras foram analisadas neste trabalho, corroborando assim com os resultados obtidos.

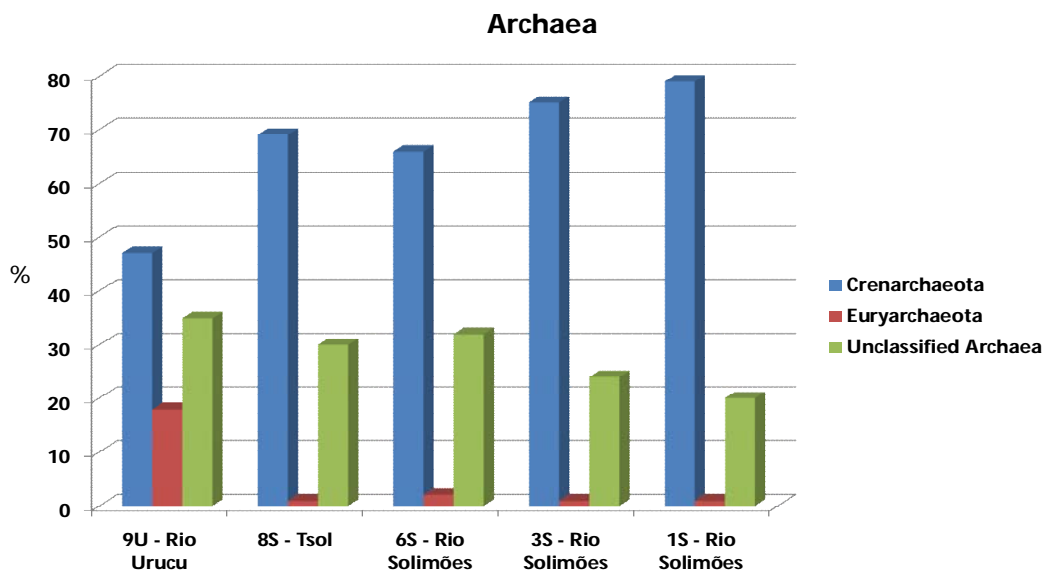


Figura 65 – Classificação em nível taxonômico superior para as cinco amostras de rios

Os membros do filo *Crenarchaeota* incluem organismos hipertermófilos, os quais são mais comumente encontrados em ambientes com temperaturas extremamente altas, mas também tem sido relatado nos mais diversos locais, o que sugere sua potencial importância nos ciclos biogeoquímicos.

Com o uso de técnicas moleculares independente de cultivo, tem sido evidenciado que membros do filo *Crenarchaeota* são amplamente distribuídos. No solo, o filo *Crenarchaeota* é abundante e constitui um número significativo de procaríotos em ambientes mesófilos (SCHLEPER *et al.*, 2005; NICOL *et al.*, 2006). *Crenarchaeotas* não termófilos podem ser encontrados em ambientes tão diferentes como uma grande variedade de solos (BINTRIM *et al.*, 1997; NICOL *et al.*, 2003; OCHSENREITER *et al.*, 2003; PAZINATO *et al.*, 2010), águas marinhas (DeLONG, 1992), sedimentos de lagos (CONRAD *et al.*, 2010). Könneke *et al.* (2005) conseguiram isolar o primeiro *Crenarchaeota* mesófilo oxidante de amônia em um aquário marinho e, no presente estudo, foi verificada a presença de *Crenarchaeota* na coluna d'água em rios da maior e mais extensa rede hidrográfica do mundo, a bacia hidrográfica amazônica, mesmo cenário escolhido para realizar o primeiro

estudo metagenômico de rios, obtendo também o maior conjunto de dados de ambientes de água doce até o momento (GHAJ *et al.*, 2011).

Nas cinco bibliotecas construídas, não foi possível avançar na classificação das sequências encontradas para o filo *Crenarchaeota*, devido à baixa porcentagem de identidade com as sequências depositadas no banco de dados. Os melhores hits encontrados, com porcentagem acima de 95%, foram para sequências não cultivadas de *Crenarchaeota*. Desta forma, as sequências foram classificadas apenas em nível de filo.

No que tange ao filo *Euryarchaeota*, somente 1-2% das sequências analisadas apresentaram similaridade com este filo, com exceção do Rio Urucu (9U), com 18% das sequências. Membros deste filo incluem uma grande diversidade de organismos halófilos e acidófilos extremos, hipertermófilos e metanogênicos (PAZINATO *et al.*, 2010).

Nas bibliotecas do Rio Solimões, a montante do Terminal do Solimões (TSOL) (8S) e Rio Solimões - Município de Manacapuru (3S), 1% das sequências foi classificado como sendo do filo *Euryarchaeota*, porém, não foi possível avançar na classificação das mesmas. Nas amostras do Rio Urucu (9U), Rio Solimões - Município de Codajás (6S) e Rio Solimões (1S) foi possível a classificação em nível de classe para algumas sequências.

No Rio Urucu (9U) (figura 66), foram encontradas arqueias metanogênicas pertencentes às classes *Methanobacteria* (uma sequência), *Methanococci* (uma sequência) e *Methanomicrobia* (uma sequência), além de 22 sequências de *Euryarchaeota*, em que os organismos encontrados não foram classificados. Em estudo realizado por Conrad *et al.* (2010), em sedimentos de dois lagos de águas claras na Amazônia, também foi observada a presença de arqueias metanogênicas pertencentes às classes *Methanobacteria* e *Methanomicrobia*.

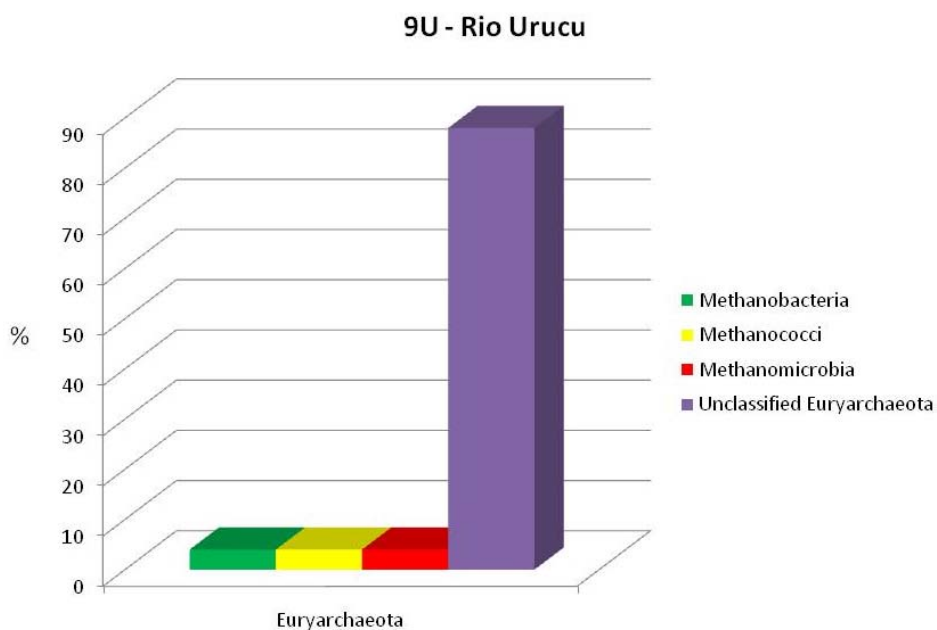


Figura 66– Classificação em nível de classe para sequências de *Euryarchaeota* no Rio Urucu (9U)

No Rio Solimões - Município de Codajás (6S) (figura 67), uma sequência foi encontrada para *Methanomicrobia* e duas para *Euryarchaeota*, cujos representantes não foram classificados.

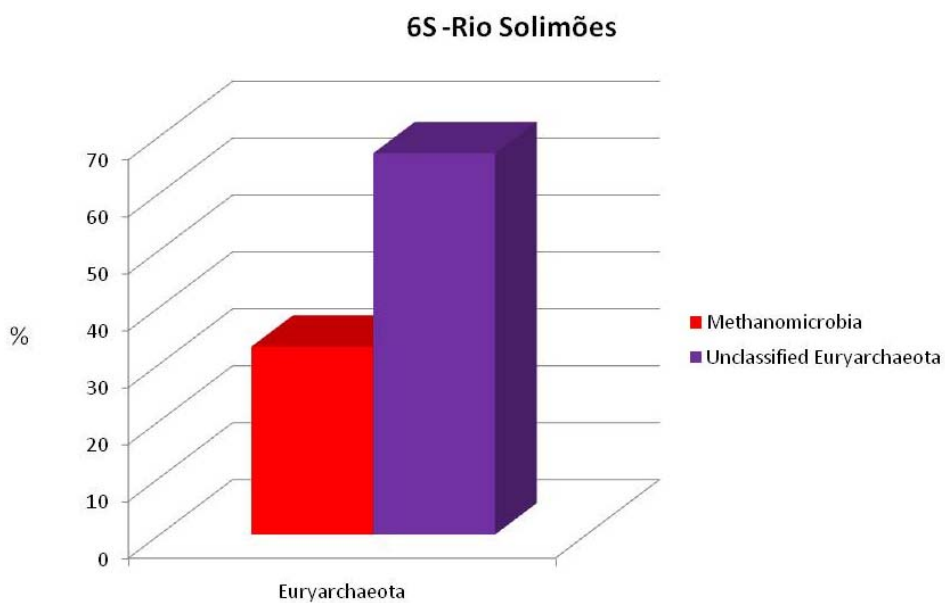


Figura 67– Classificação em nível de classe para sequências de *Euryarchaeota* no Rio Solimões - Município de Codajás (6S)

Na amostra do Rio Solimões (1S) (figura 68), as duas sequências encontradas foram classificadas como sendo de representantes de *Methanomicrobia* e *Methanococci*, classes do filo *Euryarchaeota*, também encontradas no estudo realizado em um solo de várzea da Amazônia por Pazinato *et al.* (2010).

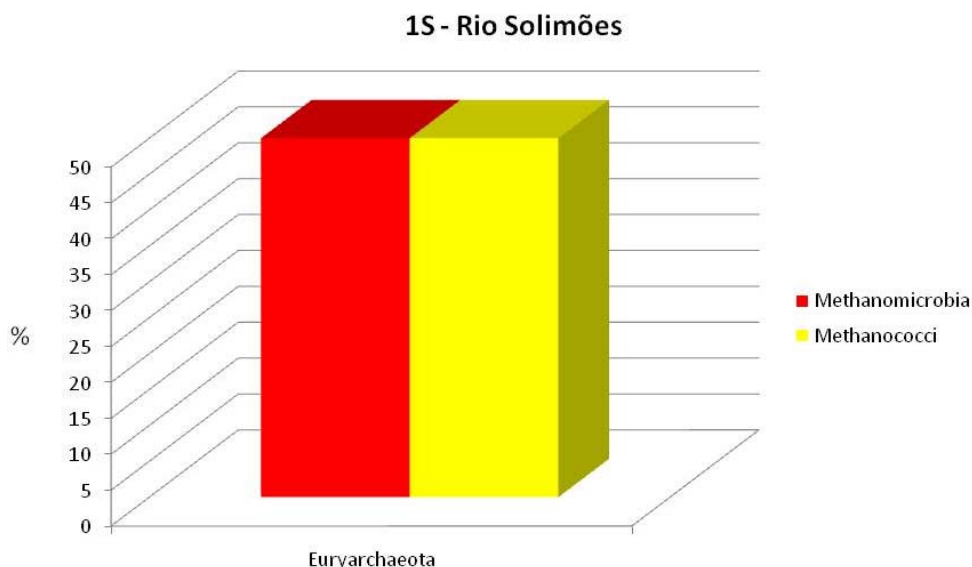


Figura 68 – Classificação em nível de classe para sequências de *Euryarchaeota* no Rio Solimões – Município de Iranduba (1S)

A possível explicação para a quase ausência desses micro-organismos nas amostras do Rio Solimões e do Rio Urucu, deve-se ao fato de que arqueias metanogênicas possuem uma enorme sensibilidade a ambientes oxigenados, como os dos rios estudados, uma vez que são micro-organismos anaeróbios obrigatórios e necessitam de condições anóxicas para seu crescimento (PAZINATO *et al.* 2010).

O maior número de sequências para organismos do filo *Euryarchaeota* foi encontrado na biblioteca construída para a amostra do Rio Urucu. A coleta realizada neste ponto se deu a uma profundidade de 1,5 m (ponto médio da profundidade total de 2,8 m no local amostrado). Já a profundidade total dos demais pontos foi de 15 a 22 m e a coleta sempre realizada na metade desta profundidade, ou seja, no mínimo a 8 m. Devido a essas diferenças de profundidade entre os locais amostrados, é possível que tenha havido coleta de organismos presentes no sedimento deste

ponto menos profundo amostrado, no Rio Urucu. As coletas foram realizadas em setembro, época de vazante, o que deve ter contribuído para os resultados obtidos.

Em sedimentos de água doce o metano é produzido pelas arqueias metanogênicas através da degradação da matéria orgânica sob condições anóxicas (CONRAD *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÕES

- Uma parcela considerável das sequências foi associada com bactérias não-cultiváveis nas amostras da Amazônia;
- O filo *Proteobacteria* foi dominante nas amostras de rios e lagos desta porção da região amazônica;
- A classe *Betaproteobacteria* foi predominante, com a maioria dos gêneros descritos pertencentes a esta classe;
- O táxon de água doce mais bem conhecido e amplamente distribuído *Polynucleobacter* foi observado em todas as amostras de rios e lagos;
- A espécie *Polynucleobacter rarus*, isolada de um lago ácido, foi observada apenas na amostra do Lago Poraquê, único lago com pH mais ácido.
- *Candidatus Planktophilia limnetica*, uma actinobactéria de água doce, foi relatada nas amostras de rios e lagos da Amazônia;
- Sequências associadas com micro-organismos marinhos foram observadas com baixa similaridade, podendo representar um grupo de bactérias de água doce;
- Os produtores primários predominantes foram as picocianobactérias dos gêneros *Cyanobium* e *Synechococcus*;
- O ecossistema de água doce da Amazônia apresenta bactérias típicas de água doce, assim como micro-organismos de solo provenientes da floresta circundante;

- O Domínio *Archaea*, representado pelo filo *Crenarchaeota* foi observado em cinco amostras de rios.
- O rio Urucu foi o que apresentou um maior número de sequências associadas com o filo *Euryarchaeota*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, H.; SCANLAN, J.; DUMONT, M.G.; MURRELL, J.C. Duplication of the mmoX gene in *Methylosinus sporium*: cloning, sequencing and mutational analysis. **Microbiology**. v.152, p.2931-42. 2006.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. 59(1):143-69. 1995.
- AUMAN, A.J.; STOLYAR, S.; COSTELLO, A.M.; LINDSTROM, M.E. Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.12, p.5259-66. 2000.
- AUMAN, A.J.; SPEAKE, C.C.; LINDSTROM, M.E. nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.9, p.4009-16. 2001.
- BAKER, G.C.; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**. 55(3):541-55. 2003.
- BARTHEM, R.B.; GUERRA, H.; VALDERRAMA, M. Diagnostico de los recursos hidrobiológicos de la Amazonia. **Tratado de Cooperación Amazónica**. Secretaria Pro Tempore. 22, 1995.
- BECKER, K.; HARMSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(11):4988-95. 2004.
- BECKER, S.; SINGH, A.K.; POSTIUS, C.; BOGER, P.; ERNST, A. Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance. **FEMS Microbiology Ecology**. v.49, n.2, p.181-90. 2004.
- BERTILSSON, S.; CAVANAUGH, C.M.; POLZ, M.F. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(12):6077-86. 2002.
- BINTRIM, S.B.; DONOHUE, T.J.; HANDELSMAN, J.; ROBERTS, G.P.; GOODMAN, R.M. Molecular phylogeny of Archaea from soil. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 94, p. 277-282, 1997.
- BODROSSY, L.; HOLMES, E.M.; HOLMES, A.J.; KOVÁCS, K.L.; MURRELL, J.C. Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. **Archives of Microbiology**. v.168, n.6, p.493-503. 1997.

- BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 1935–1943. 1996.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p. 2647-2653, 1997.
- BOUVET, P.J.M.; GRIMONT, P.A.D. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.36, n.2, p.228-240. 1986.
- BOUVET, P.J.M.; JEANJEAN, S.; VIEU, J.F.; DIJKSHOORN, L. Species, biotype, and bacteriophage type determinations compared with cell envelope protein profiles for typing *Acinetobacter* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28, n.2, p.170-6. 1990.
- BURKERT, U.; WARNECKE, F.; BABENZIEN, D.; ZWIRNMANN, E.; PERNTHALER, J. Members of a readily enriched proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, p.6550-9. 2003.
- CALLIERI, C.; STOCKNER, J.G. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. **Journal of Limnology**. 61, 1-14. 2002.
- CHABAN, B.; NG, S.Y.M.; JARREL, K.F. Archaeal Habitats from the Extreme to the Ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**. 52, 73-116. 2006.
- CHAINEAU, C.H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Science of the Total Environment**. v.227, p.237-47. 1999.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. 69:330–339. 2007.
- CHEN, Y.; CROMBIE, A.; RAHMAN, M.T.; DEDYSH, S.N.; LIESACK, W.; STOTT, M.B.; ALAM, M.; THEISEN, A.R.; MURRELL, J.C.; DUNFIELD, P.F. Complete genome sequence of the aerobic facultative methanotroph *Methylocella silvestris* BL2. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.14, p.3840-1. 2010.
- CHOI, B.K.; WYSS, C.; GÖBEL, U.B. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. **Journal of Clinical Microbiology**. 34(8):1922-5. 1996.

- CHUN, J.; LEE, J.H.; JUNG, Y.; KIM, M.; KIM, S.; KIM, B.K.; LIM, Y.W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal and Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.57, p.2259-61. 2007.
- CLARRIDGE, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**. 17(4):840-62. 2004.
- COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**. v.37, D141-5. 2009.
- CONRAD, R.; KLOSE, M.; CLAUS, P.; ENRICH-PRAST, A. Methanogenic Pathway, ¹³C Isotope Fractionation, and Archaeal Community Composition in the Sediment of Two Clear-Water Lakes of Amazonia. **Limnology and Oceanography**. 55, 689–702. 2010.
- COPRAPHI. Hidrobiologia e climatologia na região amazônica brasileira. Informação disponível e atividades em desenvolvimento. **Seminário internacional de hidrologia e climatologia da Amazônia**, Manaus. 23 a 27 julho de 1984.
- COSTELLO, A.M.; LIDSTROM, M.E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.11, p.5066-74. 1999.
- CRUMP, B.C.; HOBBIE, J.E. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. **Limnology and Oceanography**. v.50, p.1718-1729. 2005.
- DAMS, E.; HENDRIKS, L.; VAN DE PEER, Y.; NEEFS, J.M.; SMITS, G.; VANDENBEMPT, I.; DE WACHTER, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. **Nucleic Acids Research**. v.16, p.87-173. 1988.
- DANIEL, R. The soil metagenome: a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**. 15:199-204. 2004.
- DAS, S.K.; MISHRA, A.K.; TINDALL, B.J.; RAINEY, F.A.; STACKEBRANDT, E. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.46, n.4, p.981-7. 1996.
- DEDYSH, S.N.; LIESACK, W.; KHMELLENINA, V.N.; SUZINA, N.E.; TROTSENKO, Y.A.; SEMRAU, J.D.; BARES, A.M.; PANIKOV, N.S.; TIEDJE, J.M. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50 p.955-69. 2000.

- DEDYSH, S.N.; RICKE, P.; LIESACK, W. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. **Microbiology**. v.150, p.1301-13. 2004.
- DEDYSH, S.N.; KNIEF, C.; DUNFIELD, P.F. Methylocella species are facultatively methanotrophic. **Journal of Bacteriology**. v.187, n.13, p.4665-70. 2005a.
- DEDYSH, S.N.; SMIRNOVA, K.V.; KHMELENINA, V.N.; SUZINA, N.E.; LIESACK, W.; TROTSENKO, Y.A. Methylo-trophic autotrophy in Beijerinckia mobilis. **Journal of Bacteriology**. v.187, n.11, p.3884-8. 2005b.
- DeLONG, E.F. Archaea in coastal marine environments. **The Proceedings of the National Academic of Science of the USA**. 89: 5685–5689, 1992.
- DeLONG, E.F. Everything in moderation: Archaea as ‘non-extremophiles’. **Current Opinion in Genetics and Development**. 8: 649–654.1998.
- DE VOS, P.; KERSTERS, K.; FALSEN, E.; POT, B.; GILLIS, M.; SEGERS, P.; DE LEY, J. Comamonas Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and Comamonas terrigena Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.35, n.4, p.443-453. 1985.
- DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of Curvibacter gracilis gen. nov., sp. nov. and Herbaspirillum putei sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [Pseudomonas] huttiensis, [Pseudomonas] lanceolata, [Aquaspirillum] delicatum and [Aquaspirillum] autotrophicum as Herbaspirillum huttiense comb. nov., Curvibacter lanceolatus comb. nov., Curvibacter delicatus comb. nov. and Herbaspirillum autotrophicum comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.54, p.2223-30. 2004.
- ERNST, A.; BECKER, S.; WOLLENZIEN, U.I.A.; POSTIUS, C.; Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. **Microbiology**. v.149, p.217-28. 2003.
- FIORE, M.F.; NEILAN, B.A.; COPP, J.N.; RODRIGUES, J.L.M.; TSAI, S.M.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. **Water Research**. v.39, p.5017-26. 2005.
- FRIEDRICH, M.W.; SCHMITT-WAGNER, D.; LUEDERS, T.; BRUNE, A. Axial differences in community structure of Crenarchaeota and Euryarchaeota in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite Cubitermes orthognathus. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.4880-90. 2001.
- GALLEGO, J.L.R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**. v.12, p.325-35. 2001.

- GARDAN, L.; DAUGA, C.; PRIOR, P.; GILLIS, M.; SADDLER, G.S. *Acidovorax anthurii* sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.50, p.235-46. 2000.
- GHAI, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; MCMAHON, K.D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; OLIVEIRA, T.C.S.; GARCIA, J.W.; MIRANDA, F.P.; HENRIQUE-SILVA, F. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. **PLoS One**. 6(8): e23785. 2011.
- GIOVANNONI, S.J. **The Polymerase chain reaction**, p.177-203. In: E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York.1991.
- GLOCKNER, F.O.; FUCHS, B.M.; AMANN, R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.8, p.3721-6. 1999.
- GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; OLSEN, J.E. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. **Journal of Applied Microbiology**. v.87, p.659-67. 1999.
- GUO, Y.; RIBIERO, J.M.; ANDERSON, J.M.; BOUR, S. dCAS: a desktop application for cDNA Sequence annotation. **Bioinformatics**. 25(9), 1195-1196, 2009.
- HAHN, M.W. Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.9, p.5248-54. 2003.
- HAHN, M.W.; POCKL, M.; WU, Q.L. Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.8, p.4539-47. 2005.
- HAHN, M.W.; LANG, E.; BRANDT, U.; WU, Q.L.; SCHEUERL, T. Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *Polynucleobacter necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subsp. *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59, p.2002-9. 2009.
- HAHN, M.W.; LANG, E.; BRANDT, U.; LUNSDORF, H.; WU, Q.L.; STACKEBRANDT, E. *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60, p.166-173. 2010a.
- HAHN, M.W.; KASALICKY, V.; JEZBERA, J.; BRANDT, U.; JEZBEROVÁ, J.; SIMEK, K. *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60, p.1358-65. 2010b.

- HAHN, M.W.; KASALICKY, V.; JEZBERA, J.; BRANDT, U.; SIMEK, K. *Limnohabitans australis* sp. nov., isolated from a freshwater pond, and emended description of the genus *Limnohabitans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60, p.2946-50. 2010c.
- HAHN, M.W.; LANG, E.; BRANDT, U.; SPROER, C. *Polynucleobacter acidiphobus* sp. nov., a representative of an abundant group of planktonic freshwater bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.61, p.788-94. 2011a.
- HAHN, M.W.; LANG, E.; TARAO, M.; BRANDT, U. *Polynucleobacter rarus* sp. nov., a free-living planktonic bacterium isolated from an acidic lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.61, p.781-7. 2011b.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**. 5(10): 245-9. 1998.
- HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**. v.60, n.2, p.439-71. 1996.
- HECKMANN, K.; SCHMIDT, H. J. *Polynucleobacter necessarius* gen. nov., sp. nov., an obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.37, p.456-457. 1987.
- HEYER, J.; GALCHENKO, V.F.; DUNFIELD, P.F. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. **Microbiology**. v.148, p.2831-46. 2002.
- HIORNS, W.D.; METHE, B.A.; NIERZWICKI-BAUER, S.A.; ZEHR, J.P. Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.7, p.2957-2960. 1997.
- HUGENHOLTZ, P.; TYSON, W.G. Metagenomics. **Nature**. 455:481-483. 2008.
- HYLEMON, P.B.; WELLS, J.S.; KRIEG, N.R.; JANNASCH, H.W. The Genus *Spirillum*: Taxonomic Study. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.23, n.4, p.340-380. 1973.
- JEZBERA, J.; SHARMA, A.K.; BRANDT, U.; DOOLITTLE, W.F.; HAHN, M.W. 'Candidatus Planktophilia limnetica', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59. p.2864-9. 2009.

- JEZBERA, J.; JEZBEROVÁ, J.; BRANDT, U.; HAHN, M.W. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subspecies *asymbioticus* results from ecological diversification. **Environmental Microbiology**. v.13, n.4, p.922-31. 2011.
- JEZBEROVÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. **Environmental Microbiology**. v.9, n.7, p.1858-62. 2007.
- JEZBEROVÁ, J.; JEZBERA, J.; BRANDT, U.; LINDSTROM, E.S.; LANGENHEDER, S.; HAHN, M.W. Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* ssp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogeneous 2000 km area. **Environmental Microbiology**. v.12, n.3, p.658-69. 2010.
- JORDAN, D.C.; MCNICOL, P.J. Identification of *Beijerinckia* in the high Arctic (Devon Island, Northwest Territories). **Applied Environmental Microbiology**. v.35, n.1, p.204-5. 1978.
- JUNG, J.; BAEK, J.H.; PARK, W. Complete genome sequence of the diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.18, p.4794-5. 2010.
- JUNK, W.J. **Wetlands of tropical South America**. In: Whigham, D.F. (ed.) *Wetlands of the World*. The Hague, Kluwer, p. 679-902. 1993.
- KALMBACH, S.; MANZ, W.; WECKE, J.; SZEWZYK, U. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49, p.769-77. 1999.
- KATAOKA, M.; UEDA, K.; KUDO, T.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**. 151(2):249-55. 1997.
- KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**. 56:211-236. 2002.
- KEOUGH, B.P.; SCHMIDT, T.M.; HICKS, R.E. Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. **Microbial Ecology**. v.46, p.238-48. 2003.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. v.16, p. 111-120, 1980.
- KÖNNEKE, M.; BERNHARD, A.E.; DE LA TORRE, J.R.; WALKER, C.B.; WATERBURY, J.B.; STAHL, D.A. Isolation of an Autotrophic Ammonia-Oxidizing Marine Archaeon. **Nature**. 437, 543-546. 2005.

- KUSKE, C.R.; BARNS, S.M.; BUSCH, J.D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n.9. 3614-3621, 1997.
- LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, New York. 1991.
- LA SCOLA, B.; MALLET, M.N.; GRIMONT, P.A.D.; RAOULT, D. *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.15-20. 2003.
- LEIFSON, E. The Bacterial Flora of Distilled and Stored Water .III. New Species of the Genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**. v.12, n.4, p.161-170. 1962.
- LIN, M.C.; JIANG, S.R.; CHOU, J.H.; ARUN, A.B.; YOUNG, C.C.; CHEN, W.M. *Aquabacterium fontiphilum* sp. nov., isolated from spring water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59, p.681-5. 2009.
- LINDSTROM, E.S.; AGTERVELD, M.P.K.; ZWART, G. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.12, p.8201-6. 2005.
- LOHSCHIEDER, J.N.; STRITTMATTER, M.; KUPPER, H.; ADAMSKA, I. Vertical distribution of epibenthic freshwater cyanobacterial *Synechococcus* spp. strains depends on their ability for photoprotection. **PLoS One**. v.6, n.5, e20134. 2011.
- LU, J.J.; PERNG, C.L.; LEE, S.Y.; WAN, C.C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**. 38(6):2076-80. 2000.
- LUDWIG, W.; BAUER, S.H.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K.H. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. 153(1):181-90. 1997.
- MACRAE, A.; RIMMER, D.L.; O'DONNELL, A.G. Novel bacterial diversity recovered from the rhizosphere of oilseed rape (*Brassica napus*) determined by the analysis of 16S ribosomal DNA. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 78(1):13-21. 2000.

- MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; DYMOCK, D.; WADE, W.G. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. 64(6):2333. 1998.
- MARIN, M.; PEDREGOSA, A.; RÍOS, S.; ORTIZ, M.L.; LABORDA, F. Biodegradation of Diesel and Heating Oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: Its Possible Applications on Bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.35, p.269-285. 1995.
- MATSUMOTO, A.; KASAI, H.; MATSUO, Y.; OMURA, S.; SHIZURI, Y.; TAKAHASHI, Y. *Ilumatobacter fluminis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the sediment of an estuary. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v.55, p.201-5. 2009.
- MAYNARD, C.; BERTHIAUME, F.; LEMARCHAND, K.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**. 71(12):8548-57. 2005.
- MAYUMI, D.; YOSHIMOTO, T.; UCHIYAMA, H.; NOMURA, N.; NAKAJIMA-KAMBE, T. Seasonal change in methanotrophic diversity and populations in a rice field soil assessed by DNA-stable isotope probing and quantitative real-time PCR. **Microbes and Environments**. v.25, n.3, p.156-63. 2010.
- MCCABE, K.M.; ZHANG, Y.H.; HUANG, B.L.; WAGAR, E.A.; MCCABE, E.R. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. **Molecular Genetics and Metabolism**. 66(3):205-11. 1999.
- MCDONALD, I.R.; KENNA, E.M.; MURRELL, J.C. Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.1, p.116-21. 1995.
- MEIRELLES, J. **Livro de ouro da Amazônia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ediouro, 2006.
- MUNSON, M.A.; BANERJEE, A.; WATSON, T.F.; WADE, W.G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(7):3023-9. 2004.
- NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; CLEENWERCK, I.; DE BAERE, T.; JANSSENS, D.; VAN DER REIJDEN, T.J.K.; JEZEK, P.; VANEECHOUTTE, M. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.1563-7. 2003.
- NEWTON, R.J.; KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W.; MCMAHON, K.D. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. **Environmental Microbiology**. v.8, n.6, p.956-70. 2006.

- NEWTON, R.J.; JONES, S.E.; HELMUS, M.R.; MCMAHON, K.D. Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria *act* lineage. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, n.22, p.7169-76. 2007.
- NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**. 5:152–162. 2003
- NICOL, G.W.; TSCHERKO, D.; CHANG, L.; HAMMESFAHR, U.; PROSSER, J.I. Crenarchaeal Community Assembly and Microdiversity in Developing Soils at Two Sites Associated with Deglaciation. **Environmental Microbiology**. 8, 1382–1393. 2006.
- NISHIMURA, Y.; NAGATA, T. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). **Aquatic Microbial Ecology**. v.48, p.231-240. 2007.
- OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, L.; SCHLEPER, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environmental Microbiology**. 5:787–797. 2003.
- OGGERIN, M.; ARAHAL, D.R.; RUBIO, V.; MARÍN, I. Identification of *Beijerinckia fluminensis* strains CIP 106281T and UQM 1685T as *Rhizobium radiobacter* strains, and proposal of *Beijerinckia doebereineriae* sp. nov. to accommodate *Beijerinckia fluminensis* LMG 2819. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.59, p.2323-8. 2009.
- OGGERIN, M.; RUBIO, V.; MARÍN, I.; ARAHAL, D.R. The status of the species *Beijerinckia fluminensis* Dobereiner and Ruschel 1958. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.61, p.1757-9. 2011.
- OH, S.; CARO-QUINTERO, A.; TSEMENTZI, D.; DELEON-RODRIGUEZ, N.; LUO, C.; PORETSKY, R.; KONSTANTINIDIS, K.T. Metagenomic insights into the evolution, function, and complexity of the planktonic microbial community of lake Lanier, a temperate freshwater ecosystem. **Applied and Environmental Microbiology**. v.77, n.17, p.6000-11. 2011.
- OLTMAN, R.E. Reconnaissance investigations of the discharge and water quality of the Amazon River. **United States Geological Survey**, Washington, D.C. 16 pp. 1968.
- OUATTARA, A.S.; ASSIH, E.A.; THIERRY, S.; CAYOL, J.L.; LABAT, M.; MONROY, O.; MACARIE, H. *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.53, p.1247-51. 2003.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**. 276: 734-740. 1997.

- PANG, C. M.; LIU, W. T. Biological filtration limits carbon availability and affects downstream biofilm formation and community structure. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n.9, p.5702-12. 2006.
- PAZINATO, J.M.; PAULO, E.N.; MENDES, L.W.; VAZOLLER, R.F.; TSAI, S.M. Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. **Diversity**. 2, 1026-1047. 2010.
- PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. v.21, n.3, p.538-82. 2008.
- PERCENT, S.F.; FRISCHER, M.E.; VESCIO, P.A.; DUFFY, E.B.; MILANO, V.; MCLELLAN, M.; STEVENS, B.M.; BOYLEN, C.W.; NIERZWICKI-BAUER, S.A. Bacterial community structure of acid-impacted lakes: what controls diversity? **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n.6, p.1856-68. 2008.
- PETTI, C.A.; POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER, P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(12):6123-5. 2005.
- PICCINI, C.; CONDE, D.; ALONSO, C.; SOMMARUGA, R.; PERNTHALER, J. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, n.10, p.6560-8. 2006.
- PLASENCIA, A.; BAÑERAS, L.; LLIRÓS, M.; CASAMAYOR, E.O.; BORREGO, C. Maintenance of previously uncultured freshwater archaea from anoxic waters under laboratory conditions. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.99, p.403-8. 2010.
- POPE, P.B.; PATEL, B.K. Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. **FEMS Microbiology Ecology**. v.64, n.1, p.9-27. 2008.
- POSTIUS, C.; ERNST, A. Mechanisms of dominance: coexistence of picocyanobacterial genotypes in a freshwater ecosystem. **Archives of Microbiology**. v.172, p.69-75. 1999.
- RIESENFELD, C.S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **Annual Review Genetics**. v.28, p. 525-552. 2004.
- RODRÍGUES-VALERA, R.F. Environmental genomics, the big picture? **FEMS Microbiology Letters**. 231:153-158. 2004.

- RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 66(6):2541-7. 2000.
- ROTHMAN, R.E.; MAJMUDAR, M.D.; KELEN, G.D.; MADICO, G.; GAYDOS, C.A.; WALKER, T.; QUINN, T.C. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. **The Journal of Infectious Diseases**. 186(11):1677-81. 2002.
- RUSCH, D.B.; HALPERN, A.L.; SUTTON, G.; HEIDELBERG, K.B.; WILLIAMSON, S.; YOOSEPH, S.; WU, D.; EISEN, J.A.; HOFFMAN, J.M.; REMINGTON, K.; BEESON, K.; TRAN, B.; SMITH, H.; BADEN-TILLSON, H.; STEWART, C.; THORPE, J.; FREEMAN, J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; VENTER, J.E.; LI, K.; KRAVITZ, S.; HEIDELBERG, J.F.; UTTERBACK, T.; ROGERS, Y.H.; FALCÓN, L.I.; SOUZA, V.; BONILLA-ROSSO, G.; EGUIARTE, L.E.; KARL, D.M.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; BIRMINGHAM, E.; GALLARDO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; FERRARI, M.R.; STRAUSBERG, R.L.; NEALSON, K.; FRIEDMAN, R.; FRAZIER, M.; VENTER, J.C. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. **PLoS Biology**. v.5, n.3,e77. 2007.
- SACHDEV, D.; NEMA, P.; DHAKEPHALKAR, P.; ZINJARDE, S.; CHOPADE, B. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of Acinetobacter community from the rhizosphere of wheat. **Microbiological Research**. v.165, p.627-38. 2010.
- SAHIN, N.; PORTILLO, M.C.; KATO, Y.; SCHUMANN, P. Description of Oxalicibacterium horti sp. nov. and Oxalicibacterium faecigallinarum sp. nov., new aerobic, yellow-pigmented, oxalotrophic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v.296, n.2, Jun, p.198-202. 2009.
- SAHIN, N.; GONZALEZ, J.M.; IIZUKA, T.; HILL, J.E. Characterization of two aerobic ultramicrobacteria isolated from urban soil and a description of Oxalicibacterium solurbis sp. nov. **FEMS Microbiology Letters**. v.307, p.25-9. 2010.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbour-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v.4, p. 406-425, 1987.
- SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated Archaea. **Nature Reviews Microbiology**. 3:479-488. 2005.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p.303-310. 2003.

- SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(8):3557-63. 2001.
- SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 75:955-962. 2007.
- SEKIGUCHI, H.; WATANABE, M.; NAKAHARA, T.; XU, B.H.; UCHIYAMA, H. Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5142-5150. 2002.
- SOWELL, S.M.; NORBECK, A.D.; LIPTON, M.S.; NICORA, C.D.; CALLISTER, S.J.; SMITH, R.D.; BAROFSKY, D.F.; GIOVANNONI, S.J. Proteomic analysis of stationary phase in the marine bacterium "Candidatus Pelagibacter ubique". **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n.13, p.4091-100. 2008.
- STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**. v.247, p.105-111. 2005.
- STEINDLER, L.; SCHWALBACH, M.S.; SMITH, D.P.; CHAN, F.; GIOVANNONI, S.J. Energy starved Candidatus Pelagibacter ubique substitutes light-mediated ATP production for endogenous carbon respiration. **PLoS One**. v.6, n.5, p.e19725. 2011.
- STREIT, W.R.; SCHMITZ, R.A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**. 7:492–498. 2004.
- SUN, J.; STEINDLER, L.; THRASH, J.C.; HALSEY, K.H.; SMITH, D.P.; CARTER, A.E.; LANDRY, Z.C.; GIOVANNONI, S.J. One Carbon Metabolism in SAR11 Pelagic Marine Bacteria. **PLoS One**. v.6, n.8, p.e23973. 2011.
- SUNDH, I.; BASTVIKEN, D.; TRANVIK, L.J. Abundance, activity, and community structure of pelagic methane-oxidizing bacteria in temperate lakes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.11, p.6746-52. 2005.
- TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and amoA genes. **Microbial Ecology**. v.59, p.734-43. 2010.
- TAMAS, I.; DEDYSH, S.N.; LIESACK, W.; STOTT, M.B.; ALAM, M.; MURRELL, J.C.; DUNFIELD, P.F. Complete genome sequence of Beijerinckia indica subsp. indica. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.17, p.4532-3. 2010.
- TAMER, A.U.; ARAGNO, M.; SAHIN, N. Isolation and characterization of a new type of aerobic, oxalic acid utilizing bacteria, and proposal of Oxalicibacterium flavum gen. nov., sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. v.25, p.513-9. 2002.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v.24, p.1596-1599, 2007.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions –specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22, p.4673-4680, 1994.
- THULER, D.S.; FLOH, E.I.S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H.R. *Beijerinckia derxii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. **Journal of Applied Microbiology**. v.95, p.799-806. 2003.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic Diversity – Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. **Science**. 296:1064-1066. 2002.
- VAN DE PEER, Y.; NICOLAÏ, S.; DE RIJK, P.; DE WACHTER, R. Database on the structure of small ribosomal subunit RNA. **Nucleic Acids Research**. 24(1):86-91. 1996.
- VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; ARTZ, R.R.E.; HAANSTRA, R.; FORNEY, L.J. Association of marine archaea with the digestive tracts of two marine fish species. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.8, p.2894-2898. 1998.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKUCH, C.; ROGERS, Y.H.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**. 304: 66–74. 2004.
- VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**. 24:1-7. 2001.
- WAGNER, M.; ERHART, R.; MANZ, W.; AMANN, R.; LEMMER, H.; WEDI, D.; SCHLEIFER, K.H. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, n.3, p.792-800. 1994.
- WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **Plos One**. 4(10): e7401. 2009.
- WARNECKE, F.; AMANN, R.; PERNTHALER, J. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. **Environmental Microbiology**. v.6, n.3, p.242-53. 2004.

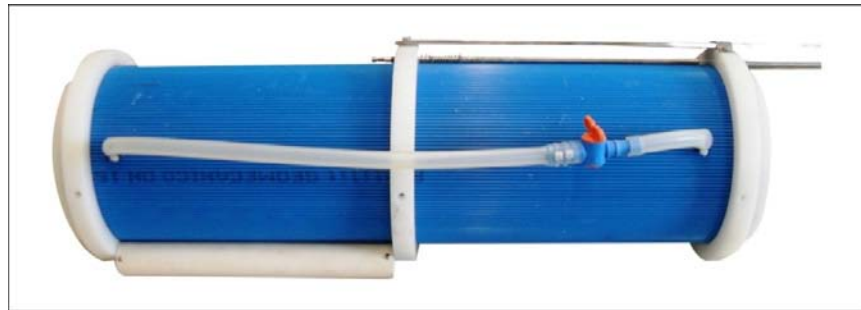
- WARNECKE, F.; SOMMARUGA, R.; SEKAR, R.; HOFER, J.S.; PERNTHALER, J. Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.9, p.5551-9. 2005.
- WEN, A.; FEGAN, M.; HAYWARD, C.; CHAKRABORTY, S.; SLY, L.I. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49, p.567-76. 1999.
- WILLEMS, A.; POT, B.; FALSEN, E.; VANDAMME, P.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Polyphasic Taxonomic Study of the Emended Genus *Comamonas*: Relationship to *Aquaspirillum aquaticum*, E.Falsen Group10, and Other Clinical Isolates. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.41, n.3, Jul, p.427-444. 1991.
- WILLEMS, A.; GOOR, M.; THIELEMANS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.42, n.1, p.107-19. 1992.
- WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v.74, n.11, p.5088-90. 1977.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**. 51:221-271, 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 the National Academy of Sciences of the USA**. v.87, p.4576-9. 1990.
- WU, Q.L.; HAHN, M.W. Differences in structure and dynamics of Polynucleobacter communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. **FEMS Microbiology Ecology**. v.57, n.1, p.67-79. 2006.
- XIE, C.H.; YOKOTA, A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.55, p.2419-25. 2005.
- XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**. v.15, n.7, p.1713-31. 2006.

YOUNG, C.C.; CHOU, J.H.; ARUN, A.B.; YEN, W.S.; SHEU, S.Y.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; REKHA, P.D.; CHEN, W.M. *Comamonas composti* sp. nov., isolated from food waste compost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.58, p.251-6. 2008.

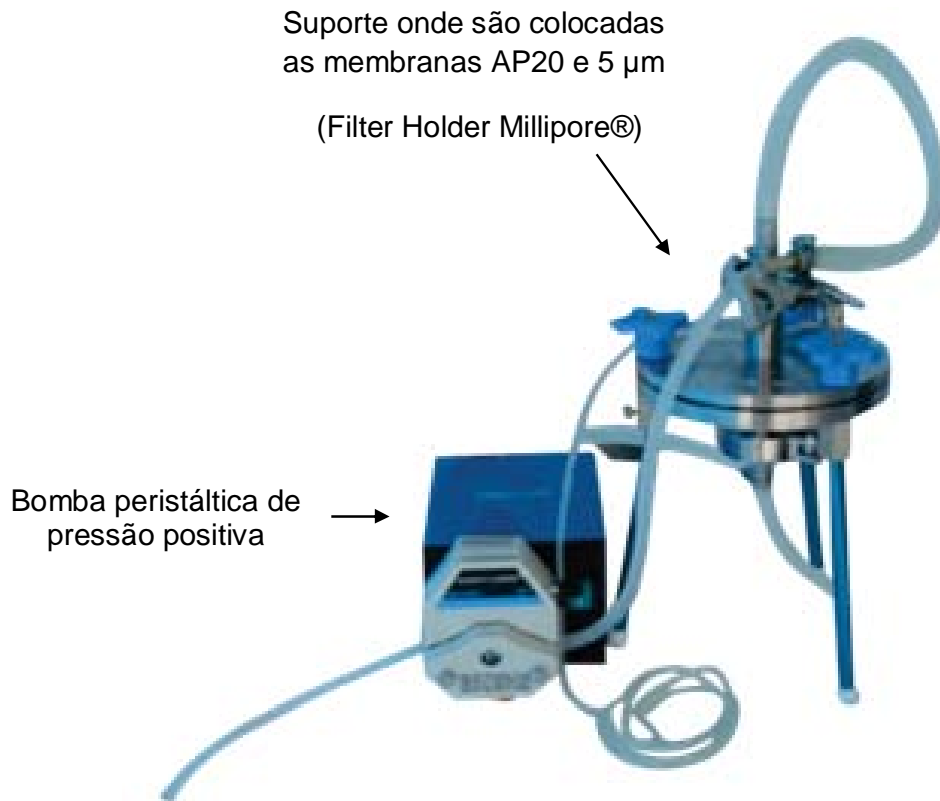
ZWART, G.; CRUMP, B.C.; AGTERVELD, M.; HAGEN, F.; HAN S. K. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**. v.28, n.2, p.141-155. 2002.

8. ANEXOS

A. Garrafa Ninski de 10 L utilizada para coleta de água



B. Equipamentos utilizados para filtração da água coletada



C. Metagenomics of the water column in a pristine portion of the Solimões-Amazon River, Brazil.

Rohit Ghai; Francisco Rodríguez-Valera; Katherine D. McMahon; Danyelle Toyama; Raquel Rinke; Tereza Cristina Souza de Oliveira; José Wagner Garcia; Fernando Pellon de Miranda; Flavio Henrique-Silva.

Este trabalho contou com a minha participação e foi realizado com a amostra de água coletada no Rio Solimões a montante do Terminal do Solimões (TSOL) – 8S. Análises de 16S rRNA também foram analisadas e, o mesmo ponto também foi alvo do estudo descrito na presente dissertação sobre a diversidade bacteriana e de arqueia.

Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River

Rohit Ghai^{1*}, Francisco Rodríguez-Valera^{1*†}, Katherine D. McMahon¹, Danyelle Toyama², Raquel Rinke², Tereza Cristina Souza de Oliveira³, José Wagner Garcia⁴, Fernando Pellon de Miranda⁵, Flavio Henrique-Silva^{2*}

1 Evolutionary Genomics Group, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Alicante, Spain, **2** Laboratory of Molecular Biology, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, **3** Universidade Federal do Amazonas, Setor Sul do Campus Universitário, Manaus, AM, Brasil, **4** Noosfera Projetos Especiais Ltda, São Paulo, SP, Brasil, **5** Petróleo Brasileiro S.A. – Petrobras, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Melo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Abstract

River water is a small percentage of the total freshwater on Earth but represents an essential resource for mankind. Microbes in rivers perform essential ecosystem roles including the mineralization of significant quantities of organic matter originating from terrestrial habitats. The Amazon river in particular is famous for its size and importance in the mobilization of both water and carbon out of its enormous basin. Here we present the first metagenomic study on the microbiota of this river. It presents many features in common with the other freshwater metagenome available (Lake Gatun in Panama) and much less similarity with marine samples. Among the microbial taxa found, the cosmopolitan freshwater act lineage of the actinobacteria was clearly dominant. Group I Crenarchaea and the freshwater sister group of the marine SAR11 clade, LD12, were found alongside more exclusive and well known freshwater taxa such as *Polynucleobacter*. A metabolism-centric analysis revealed a disproportionate representation of pathways involved in heterotrophic carbon processing, as compared to those found in marine samples. In particular, these river microbes appear to be specialized in taking up and mineralizing allochthonous carbon derived from plant material.

Citation: Ghai R, Rodríguez-Valera F, McMahon KD, Toyama D, Rinke R, et al. (2011) Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. PLoS ONE 6(8): e23785. doi:10.1371/journal.pone.0023785

Editor: Purification Lopez-Garcia, Université Paris Sud, France

Received: April 15, 2011; **Accepted:** July 25, 2011; **Published:** August 19, 2011

Copyright: © 2011 Ghai et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Petróleo Brasileiro S.A. - Petrobras, as part of a research agreement (#0050.0045454.08-4) with the Federal University of São Carlos, SP, Brazil, within the context of the Cognitus Project. FHS is recipient of a Research Productivity Scholarship from The National Council for Research and Development (CNPq #305655/2009-4). DT and RR were recipients of a master scholarship from the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). This work was also supported by projects MAGYK (BIO2008-02444), MICROGEN (Programa CONSOLIDER-INGENIO 2010 CSD2009-00006), METAGHALO (BIO2009-10138) and HALOMET (CGL2010-19303) from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, DIMEGEN (PROMETEO/2010/089) from the Generalitat Valenciana. RG was supported by a Juan de la Cierva scholarship, from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: José Wagner Garcia is employed by Noosfera Projetos Especiais Ltda, São Paulo, Brazil. Fernando Pellon de Miranda is employed by Petróleo Brasileiro S.A - Petrobras, Brasil. Francisco Rodríguez-Valera is an academic editor at PLoS.

* E-mail: frvalera@umh.es (FRV); dfhs@ufscar.br (FHS)

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

River water, around which civilizations flourish, is only a very small percentage (0.006%) of the total freshwater on earth, and a miniscule 0.0002% of the total water in the hydrosphere [1]. Even so, freshwater habitats like rivers, streams, lakes and wetlands, provide invaluable ecosystem services to human populations in the form of drinking water, recreation, and fisheries. They also play a previously underestimated but surprisingly important role in the oxidation, storage, and release of terrestrial carbon, thereby affecting global carbon budgets [2,3,4]. The Amazon river basin is the largest river basin in the world, comprising ~40% of the total area of the continent of South America. The Amazon river itself is by far the largest river in the world in terms of volumetric discharge (6.3 trillion m³/year), with a length of 6280 km, a catchment area the size of ~7000 square kilometres, and runoff amounting to nearly 15% of the total runoff of all the rivers in the world together. The tropical rainforest surrounding the river is an

extraordinarily diverse ecosystem, boasting thousands of plant and animal species, many endemic to it, with several regions still untouched by anthropogenic pressure. However, such a situation may not continue for long since the extent of pristine waters in these regions might be dramatically reduced in the future. This, of course, has serious consequences for the macrofauna and flora, the most visible components of the ecosystem. However, the less visible, microscopic component of this habitat has been largely ignored. We have practically no information on the major microbial species that dominate the Amazon River.

Freshwater habitats harbor microbial taxa distinct from those routinely detected in marine and terrestrial ecosystems [5,6]. Notably, surveys targeting 16S rRNA genes in freshwater lakes and reservoirs (reviewed in [7]) have identified several “cosmopolitan” and prevalent freshwater lineages of Betaproteobacteria [8,9,10,11,12] and Actinobacteria [13,14,15,16,17]. Other commonly recovered lineages belong to the Bacteroidetes, Verrucomicrobia, and Alphaproteobacteria. Cyanobacteria and Gamma

proteobacteria are retrieved frequently in particular types of lakes (e.g. highly productive or polluted). Much has been learnt about the primary factors determining lake bacterioplankton community composition, such as trophic status [18,19], pH [20,21], landscape position [22], and retention time [20]. Comparatively fewer studies have been conducted on lotic systems, and these frequently focused on rivers or streams much smaller than the Amazon. Many have specifically targeted biofilm communities [23]. Pelagic or suspended bacterioplankton in large flowing rivers tends to comprise freshwater taxa routinely detected in lakes [24,25,26], but very little is known about their traits or functions. Though there have been instances of 16 S rRNA based surveys of river waters [27], surprisingly, only three metagenomic studies exploring the functional capabilities of freshwater microbes have been published to date, representing tropical lakes Gatun (Panama) [28], and Samsonvale (Australia) [29] and the temperate eutrophic Lac du Bourget (France) [30]. Apart from the large sequencing effort for the Lake Gatun sample, the other studies were relatively small (0.15 Mb Samsonvale, 11 Mb Lac du Bourget).

This is the first study to present the analysis of a large (375 Mb) freshwater metagenomic dataset. Besides, we provide a first glimpse into the functional characteristics of microbiota of the water column of the Solimões-Amazon (henceforth referred to as the Amazon) river in its upper reaches (about 420 km upstream from Manaus), a region relatively pristine with little (if any) human impact and more than 1300 km from the nearest ocean (the Atlantic). Total DNA from a single sample from the mid water column, which provides us with a snapshot of this part of the river, was directly 454 pyrosequenced providing 375 Mb of sequence data. Here we present the analysis of this dataset.

Results and Discussion

Sample Description

The source of the Amazon river is in the Andes mountains. Several rivers gradually merge together (mainly the Rio Ucayali and Rio Marañón from the Peruvian Andes) to form the Amazon proper. The river and its tributaries, including the floodplains, cover about 300,000 km². The floodplains are of fundamental importance to the flora and fauna of the region. Three types of streams are usually distinguished in the Amazon hydrological basin; clearwater, white-water and blackwater [31]. Clearwater streams are low in suspended sediment and dissolved carbon, whereas white-water streams have high sediment concentrations. Both types have a near-neutral pH. Blackwater streams, on the other hand, are low in suspended sediment but are rich in dissolved organic matter and have a lower pH (about 4–5). The sample analyzed here is a typical example of mainstem white water. The sample was collected at a site nearly 400 km upstream from Manaus, Brazil, at the end of the dry season (September, average rainfall for the month 50 mm) and was taken from mid stream and mid waters (8 m depth with the bottom at 15 m) (Figure S1). This site is upstream from the Coari Terminal of Petrobras (Brazil's state-controlled petroleum company), and still in a pristine condition. Physicochemical parameters of the sample are provided in Table S1. One full plate of 454 sequencing yielded nearly one million reads ($n = 1153502$), with an average read length of 325 bases. This amounts to a total of 375 Mb, the largest reported so far for any freshwater habitat. The next largest dataset from a freshwater metagenome is that of Lake Gatun, a freshwater lake near the Panama Canal that was sampled during the Global Ocean Survey (GOS) [28], and the only freshwater sample in that collection (total 315 Mb). We note, however, that the Lake Gatun sample comprised the 0.1–0.8 μm size fraction from the near

surface (2 m deep) while our Amazon sample constituted the 0.2–5 μm fraction and was taken from mid depth (8 m).

Comparative characteristics of freshwater metagenomic datasets

The GC content plot of metagenomic datasets is often characteristic with widely different values and shape depending on the habitat. Two extremes are marine oligotrophic water samples with a marked low GC peak (~32%) and soil with a distinctly higher GC peak (~65%) (Figure 1). The GC% of the Amazon dataset, along with Gatun had a distinctive bimodal distribution with almost equally sized peaks of low and high GC% (~45% and 65%) (Figure 1). The low GC peak of ca. 45% might be a freshwater hallmark since it was found in both freshwater metagenomes, but its difficult to make a generalization based on only two samples. However, in both estuary samples from the GOS datasets two peaks were again observed, one coinciding with the purely marine waters (~35%) and the other (~45%) with the low GC% peak of the Amazon and Gatun datasets.

Salinity has been shown to be a critical environmental factor in determining community structure of the microbiota [32]. We compared the sequences retrieved here with other aquatic metagenomic datasets with different salinities using all versus all comparisons of reads with BLASTN. The most similar sample to the Amazon metagenome was the freshwater sample from Lake Gatun, followed by two estuary samples (Figure 2 and Figure S2). As a reference we included in the comparison metagenomes from hypersaline ponds and the divergence between the two freshwater datasets was similar to that found between a 19% (5 times seawater salinity) and 37% (10 times seawater salinity). We know that these two environments still share many microbes at least at the level of genus [33]. A closer comparison to the Lake Gatun dataset revealed that the Amazon reads could overlap with nearly 55% of the Lake Gatun sequences (using Amazon metagenome reads as queries, 50% query coverage and with %identity of >90%), indicating a high amount of similar sequences in these two habitats, i.e. extremely closely related microbes inhabiting both locations. Reference genomes were used to recruit reads common to both datasets, to determine which organisms might be common to both systems (Table S2).

Microbiota of the Amazon

To analyze the community structure of the mainstem Amazon we have used the results from the direct 454 pyrosequencing and classified the 16S rRNA gene fragments recovered from the metagenome (722 sequences) (Figure 3). The advantage of this approach is that it is free from any amplification (PCR) or cloning bias [34]. The most frequently recovered 16S rRNA gene sequences were affiliated with the Actinobacteria and Proteobacteria (Alpha, Beta and Gamma) (Figure 3). We also attempted to bin all 1.1 million pyrosequencing reads with the MG-RAST server and found very similar results (~49% % of reads could be assigned to a taxon) (Figure 3 and Table 1). Finally, the recruitment of genomes of representative strains that were detected was analyzed to assess the coverage and the overall similarity of the relatives in the Amazon dataset (Figure S3).

All approaches confirmed the presence of large numbers of Actinobacteria (20–25% of reads). Although this was not unexpected since they have been found in freshwaters of all kinds (still and flowing), [7,13,14,17]. Actinobacterial genomes recruited smaller numbers individually but when pooled together they recruited the most (20% of binned reads). Actually, the available actinobacterial genomes recruited at a very low similarity (60% mean percentage identity in translated sequence comparisons)

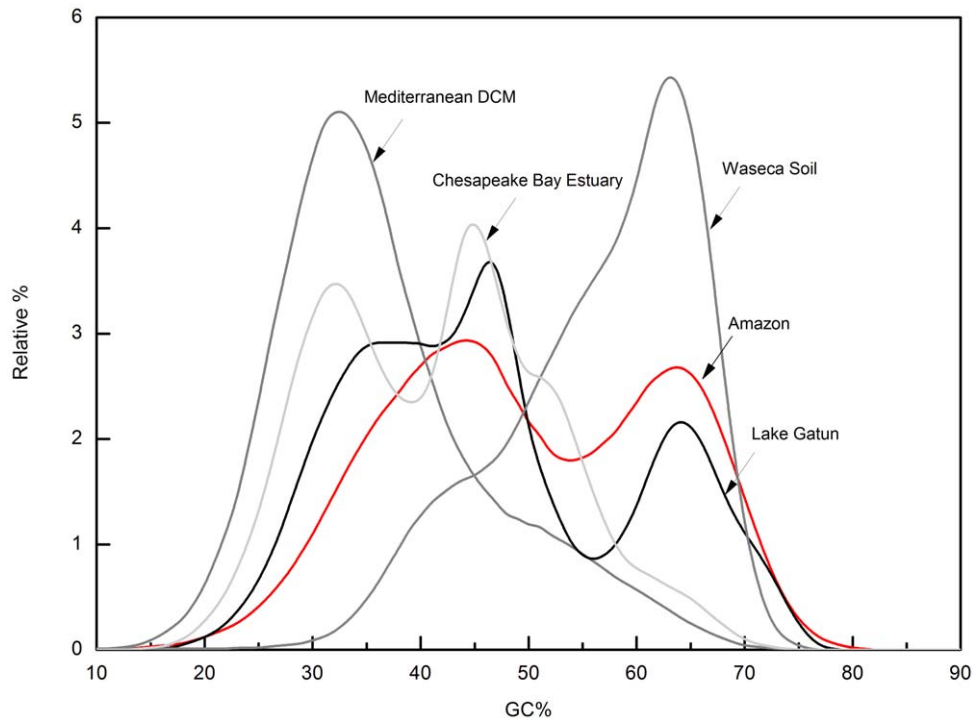


Figure 1. GC content of diverse metagenomic datasets. The GC% profile of the Amazon reads is shown (red) in comparison to a freshwater datasets (Lake Gatun), an estuary (Chesapeake Bay), a typical marine sample (Mediterranean Deep Chlorophyll Maximum) and a soil metagenome (Waseca County Soil).

doi:10.1371/journal.pone.0023785.g001

indicating a very distant relationship with the ones found in the Amazon. Cosmopolitan lineages of freshwater Actinobacteria have remained difficult to culture and thus no complete genomes are yet available. In the absence of complete genome information, we performed phylogenetic analysis of the actinobacterial rRNA reads in context of nearly full-length rRNA sequences from freshwater Actinobacteria recovered previously using PCR-based 16S rRNA gene cloning to determine more specifically which actinobacterial clades were present in the metagenome sample. A total of 135 reads were identified as containing partial 16S rRNA gene

sequences related to Actinobacteria, and these were inserted into a maximum likelihood phylogenetic tree constructed with nearly full-length 16S rRNA sequences (Figure 4). Based on this analysis, most were affiliated with the acI lineage (73%) and with the acIV lineage (17%). A few were also assigned to the acII, acTH2, acVII, and acSTL lineages. Therefore, we infer that most of the metagenomic reads binned as Actinobacteria are derived either from acI or acIV, both of which are cosmopolitan freshwater taxa found in many different types of lakes, reservoirs, and rivers. It has been proposed that these have a photoheterotrophic lifestyle since

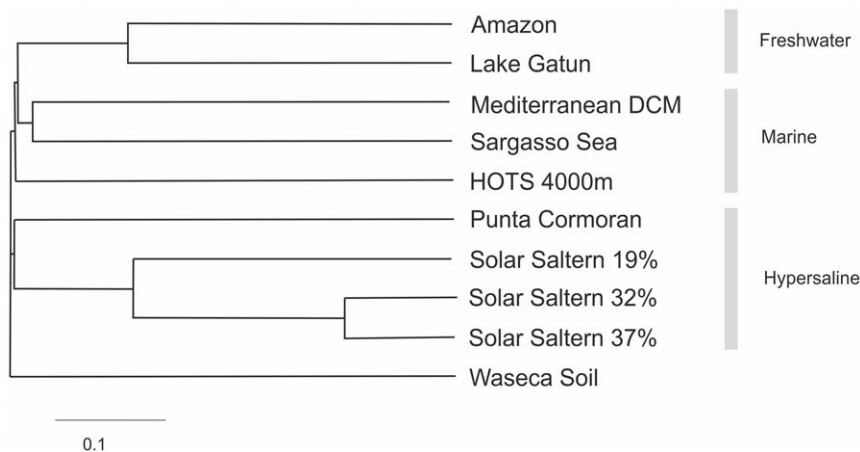


Figure 2. Metagenomic dataset similarity to each other. The tree shows the relatedness of diverse metagenomic datasets based on Jaccard distance derived from all versus all comparisons of reads with BLASTN. Datasets of different salinities were chosen for the comparison. Freshwater: Amazon, Lake Gatun; Marine: Mediterranean DCM, Sargasso Sea G5000a, HOTS 4000 m; Hypersaline: Punta Cormoran 6% (salinity) and Santa Pola salterns of three different salinities 19%, 32% and 37%). Waseca county soil dataset was used as an outgroup to construct the tree (see methods). doi:10.1371/journal.pone.0023785.g002

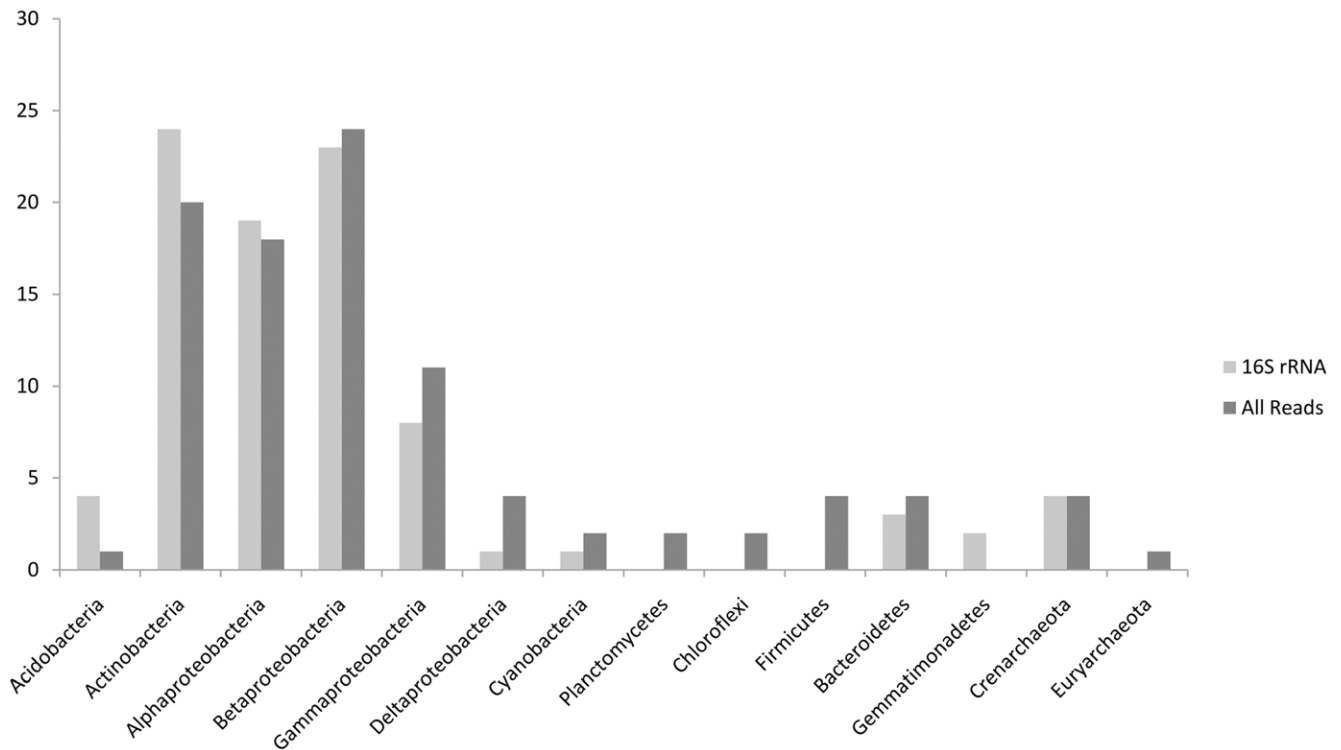


Figure 3. Phylogenetic profile of the Amazon metagenome. Phylogenetic profile of the Amazon metagenome is shown using two different approaches, one, using the 16 s rRNA sequences gathered from the metagenome, and the other using all the reads and comparing against sequenced microbial genomes (using the MG-RAST server). doi:10.1371/journal.pone.0023785.g003

Table 1. Sequenced genomes with most hits to the Amazon metagenome (using the MG-RAST server).

Taxonomic Group	Organism Name	# Hits
Crenarchaeota	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	17012
Betaproteobacteria	<i>Polynucleobacter</i> sp. QLW-P1DMWA-1	16460
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978	13424
Alphaproteobacteria, SAR11 cluster	<i>Candidatus Pelagibacter ubique</i> HTCC1062	12269
<u>Actinobacteria</u>	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	10656
Betaproteobacteria	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	10116
Acidobacteria	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	10059
Betaproteobacteria	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	8980
<u>Actinobacteria</u>	<i>Streptomyces scabiei</i> str. 87.22	8741
<u>Actinobacteria</u>	<i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	8697
<u>Actinobacteria</u>	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	7909
<u>Actinobacteria</u>	<i>Thermobifida fusca</i> YX	7628
Betaproteobacteria	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	7524
<u>Actinobacteria</u>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	7204
Betaproteobacteria	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	7046
<u>Actinobacteria</u>	<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	6577
Betaproteobacteria	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> DSM 15236	6524
<u>Actinobacteria</u>	<i>Frankia</i> sp. EAN1pec	6177
Betaproteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	5496
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. citrulli AAC00-1	5495

doi:10.1371/journal.pone.0023785.t001

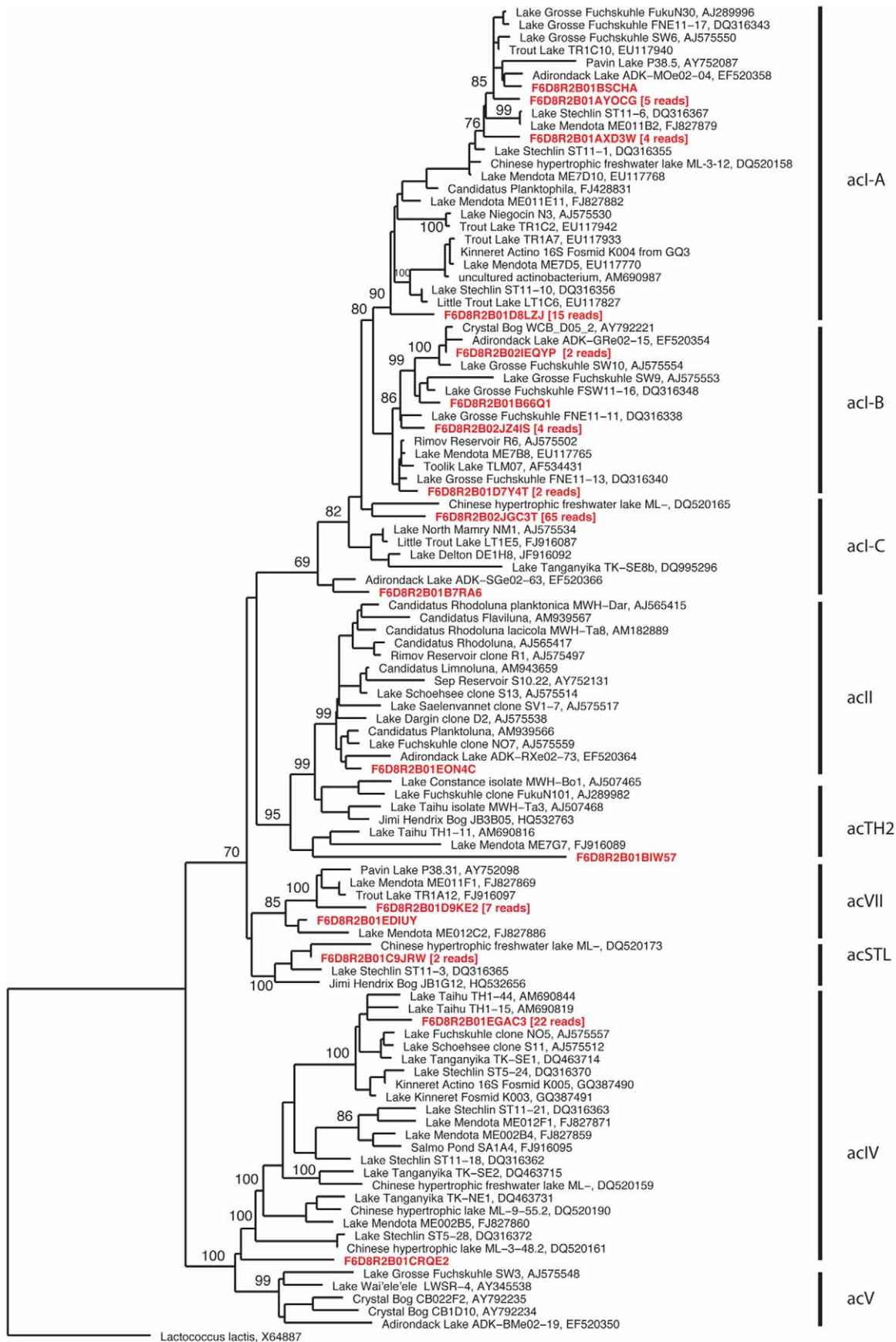


Figure 4. Phylogenetic affiliation of the Actinobacterial reads of the Amazon metagenome. Most of the 16S rRNA reads affiliated with the freshwater *actI* and *actIV* lineages. Phylogenetic reconstruction was conducted by maximum likelihood (RAxML) with near full length (>1300 nt) reference 16S rRNA gene sequences from a manually curated alignment [32] and highly variable positions masked. Metagenomic reads were added without altering tree topology using maximum parsimony criterion and a 50% base frequency filter in the ARB software package. Bootstrap values are indicated above nodes with greater than 60% support and the scale bar represents 10 base substitutions per 100 nt positions. doi:10.1371/journal.pone.0023785.g004

rhodopsins affiliated to actinobacteria have been described (actinorhodopsins) in Lake Gatun [35]. In our dataset as well, the abundance of actinorhodopsins was evident (71 out of a total of 125).

The individual reads ascribed to Actinobacteria were low GC (Figure 5), as has been recently described for the abundant freshwater actinobacteria [36]. It is interesting that the only large freshwater metagenome available in databases (Lake Gatun) also contained a massive fraction (close to 40%) of actinobacterial reads, explaining a large part of the sequence overlap between the two environments (~47% of the overlap). A soil metagenome (Waseca County Soil Sample) and the deep sea HOTS 4000 m sample showed only the presence of high GC Actinobacteria. The other important taxa that contributed prominently to the low GC reads in the Amazon dataset were the Crenarchaea and Bacteroidetes (Figure S4).

Betaproteobacteria were the next most dominant group. They were represented by a diverse collection of organisms, with members of the *Polynucleobacter* (Pnec) and Methylophilaceae (betIV) lineages comprising 9% and 22% of betaproteobacterial rRNA reads, respectively. In addition, the *Polynucleobacter* sp. QLW-PIDMWA-1 genome recruited more reads than any other available bacterial genome, although at low similarity (Table 1 and Figure S3). The presence of *Polynucleobacter* relatives is not surprising as it is among the most well known and widely

distributed bacterium that has been isolated from both lentic and lotic habitats all over the world [8,11].

Even though archaea accounted for only about 6% of the 16S rRNA detected, the genome that recruited the most reads (3% of binned reads) was *Nitrosopumilus maritimus*, an ammonia oxidizing crenarchaeon isolated originally from a marine fish tank [37] (Table 1 and Figure S3). Crenarchaea were originally thought to be constrained to harsh environmental niches but several surveys have now demonstrated the ubiquity of crenarchaea in aquatic systems [38]. A few studies done in freshwater systems have demonstrated the role of group 1 crenarchaeota in ammonia-oxidation [39,40]. We examined the abundance of archaeal reads in diverse metagenomic datasets and they always comprised a small percentage (less than 6%) of the total (Figure S5). For instance, the deep ocean HOTS 4000 m sample [41] which was the highest percentage of archaeal reads we found in the datasets we examined, contained 5.8% archaeal reads. Besides, only the Amazon and Lake Gatun datasets were found to contain more Crenarchaea than Euryarchaea, while the opposite was observed for a soil metagenome and the Mediterranean Deep Chlorophyll Maximum, and a selected sample from Sargasso Sea and the deep ocean HOTS 4000 m sample had nearly equal amounts of both taxa (Figure S5). It is clear that crenarchaea are numerically dominant in freshwater systems than in marine and thus probably have a greater role to play in nutrient cycling in both lentic and

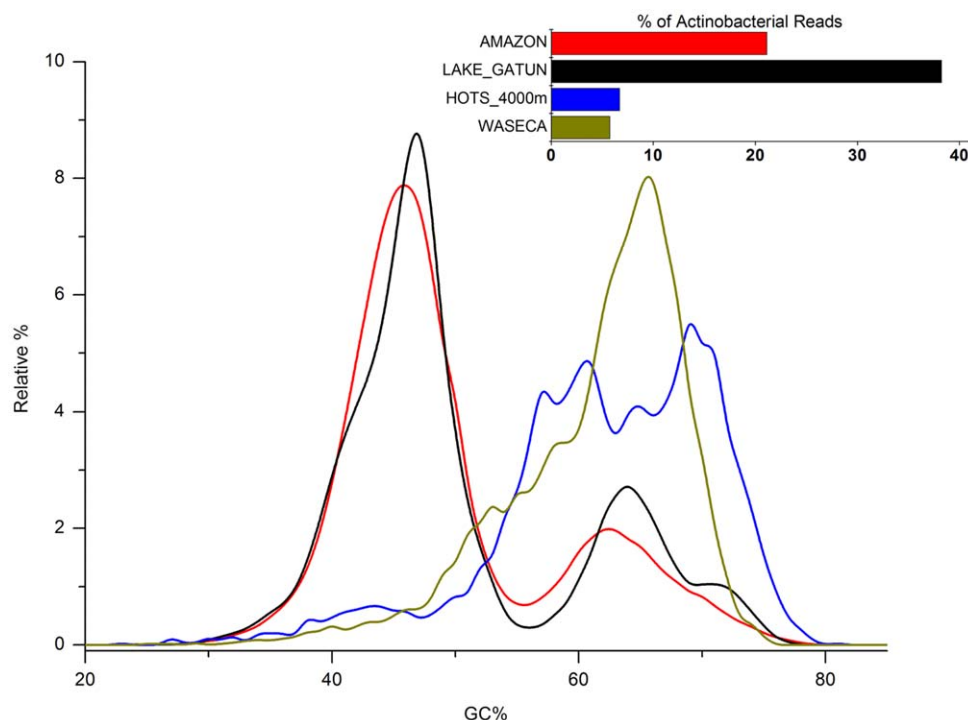


Figure 5. GC% of actinobacterial reads in diverse metagenomic datasets. The GC% of all reads assigned to actinobacteria in different datasets is shown. Datasets shown are the Amazon metagenome (red), Lake Gatun (black), HOTS 4000 m (deep blue), Waseca County Soil (Brown). The inset shows the % of actinobacterial reads in each dataset. doi:10.1371/journal.pone.0023785.g005

lotic habitats, as some previous PCR studies of 16S rRNA genes already indicated [42,43,44].

Assembly of the entire dataset using stringent cutoffs to avoid chimeric assemblies (see methods) yielded a total of 65 contigs larger than 3 kb. Of these, 16 were clearly crenarchaeal and 7 were of alphaproteobacterial origin. The taxonomic affiliation of the remaining contigs could not be ascertained. In the crenarchaeal contigs, the majority of the predicted genes had highest similarities to *N. maritimus* and to a lesser extent, to *Cenarchaeum symbiosum* or to uncultured crenarchaeotes. All these contigs were low GC%, with the mean GC% of the genes ~39%, fitting well with the known low GC% of *N. maritimus* genome (34%), but not with *C. symbiosum* (57%). The assembly of these contigs directly from the metagenomic data alone provides convincing evidence that freshwater crenarchaeotes are indeed abundant organisms in the sample and may not be very diverse (compared to others that might be abundant but do not assemble). Remarkably, one of the contigs ascribed to crenarchaea was syntenic to the genomic region in the *N. maritimus* genome containing the important genes for ammonia-oxidation (*amoA*, *amoB* and *amoC* genes) (Figure 6). A search for ammonium monooxygenases (all subunits), using several representative archaeal proteins always retrieved better hits (% similarity ranging from 85% to 98%) than the bacterial homologs that yielded lower similarity levels (% similarity ranging from 45% to 82%), indicating that ammonia-oxidation in this microbial community is a function primarily performed by archaea. Other approaches have shown previously that in marine, freshwater and soil environments archaeal oxidation of ammonia to nitrite has been shown to be dominant over bacterial contribution [40,43,45].

An unexpected result from the taxonomic analysis was the presence of a close relative of *Acinetobacter baumannii*, a gammaproteobacterium often isolated from nosocomial infections. The genome of a human isolate, strain ATCC 17978, recruited a high number of reads (2.38% of binned reads) at very high % identity levels (Table 1 and Figure S3). *Acinetobacter* are routinely

isolated from soil and water samples [46,47]. However, they are not generally detected using PCR-based 16S rRNA gene surveys of freshwater [6,7] suggesting they are usually present only at low abundance compared to typical freshwater organisms. Thus, the presence of an *Acinetobacter* species sharing so much genetic content with a previously sequenced human isolate in our sample might be the result of contamination during sample manipulation. However, closer inspection of the metagenomic reads affiliating with *Acinetobacter* 16S rRNA genes (72% of gammaproteobacteria-affiliated 16S rRNA reads) showed that nearly half the reads had the highest similarity to several other non-*baumannii* *Acinetobacter* species making it difficult to definitively conclude the identity of the microbes recruiting the reads. Besides, 16S rRNA gene PCR amplification in a total of four independent samples taken from the river mainstem, at this and other locations revealed large numbers of 16S rRNA that could be assigned to the genus *Acinetobacter*, but not the species *A. baumannii*. (data not shown). In any case, the natural habitat (reservoir) of nosocomial *A. baumannii* has been elusive and there has been recent evidence pointing towards a freshwater origin, e.g. it has been proven that freshwater amoeba can aid the survival of *A. baumannii* by inclusion in cysts [48]. Therefore, the presence in river waters of *A. baumannii* genotypes that might be eventually involved in nosocomial outbreaks is not out of the question. In fact, the ‘outbreak’ of a similarly unlikely nosocomial pathogen has been observed in a pristine South American lagoon system [49].

The genome of the marine, alpha-proteobacterial SAR11 strain *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 also recruited a substantial number of reads from the Amazon dataset (Table 1 and Figure S3) and the Lake Gatun metagenomic dataset (Table S3). The SAR11 lineage is the most dominant bacterioplankton in the oceanic waters and the existence of a freshwater sister group (LD12 or alfV-A) has been known for some time [6,7]. Genomic sequence information for LD12 is scarce, apart from 16S rRNA gene sequences. However, phylogenetic studies have indicated that there are distinct differences between the freshwater and the

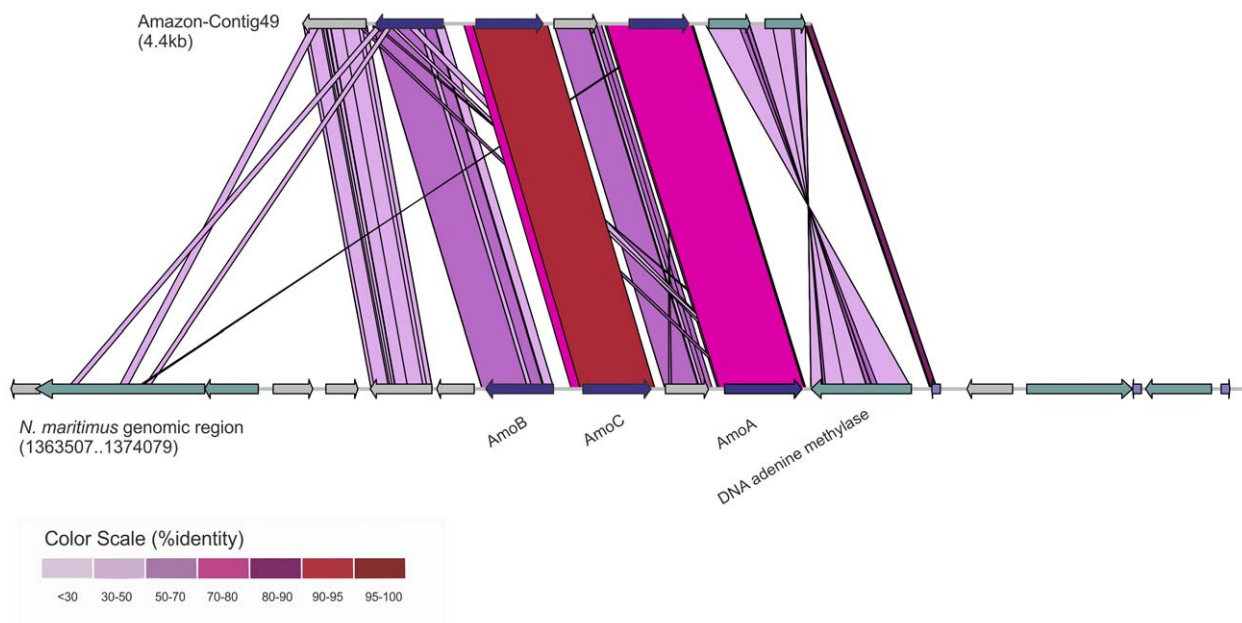


Figure 6. Synteny of assembled crenarchaeal contig from the Amazon metagenome to the *Nitrosopumilus maritimus* genomic region containing the genes for ammonia oxidation. The Amazon contig is shown on top and the *N. maritimus* genomic region is shown below. The colors indicate the level of %identity (using TBLASTX) between the sequences. doi:10.1371/journal.pone.0023785.g006

marine groups [5]. Both appear to have adapted independently to their niches with almost no mixing despite enormous population sizes. Although the *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 genome recruited many reads from both the Amazon and Lake Gatun datasets, the Alphaproteobacteria in these systems are clearly distinct from the marine SAR11 lineage, sharing 64% mean protein sequence identity with the Pelagibacter genome. Notably, nearly one-third of rhodopsins found in our dataset (41 out of 125) were binned as alphaproteobacterial, indicating that this freshwater clade, like the marine SAR11, might also use rhodopsins for photoheterotrophy.

Seven contigs contained several genes most similar to *Candidatus Pelagibacter* species, supporting the abundant presence of the freshwater group LD12 in the freshwater sample. These contigs were also low GC% (mean GC% was 31%), fitting well with the low GC% of known *Candidatus Pelagibacter* genomes (~30%). It has been hypothesized that low GC is an adaptation by the marine SAR11 clade to counter the low availability of nitrogen in the oligotrophic ocean waters [50]. However, the GC content of the Amazon dataset reads with best hits to this genome was also very low (~32%), suggesting that the LD12 group also has a low GC content. This section of the Amazon river is unlikely to be nitrogen limited (implying that there may be other factors involved in determining GC content than nitrogen availability alone).

Signatures of heterotrophy

To explore functional differences between flowing freshwater and marine microbial communities, we compared the Amazon sample to selected, representative marine metagenomic datasets using STAMP [51]. We chose the dataset of the Mediterranean Deep Chlorophyll Maximum (DCM), that was generated in a similar fashion [34], and three warm water sample datasets from a latitude similar to the Amazon from the GOS dataset; GS15, coastal sample from the Caribbean Sea, Off Key West Florida; GS16, a coastal sea sample from and GS26, and open ocean sample 134 miles from the Galapagos Islands. There are fundamental ecosystem-level differences between these marine and the freshwater dataset of the Amazon. For example, the DCM is located in an oligotrophic, phosphate poor environment and has an abundant photosynthetic cyanobacterial population, while phytoplankton production has been found to be limited in the Amazon mainstem, due to turbidity [52]. The DCM is a more stable and a more or less closed system with very low amount of external inputs in the form of organic matter. The three other marine samples are typical oligotrophic sea surface samples as well. The Amazon, however, is a more dynamic, physically mobile system, with continuous terrestrial organic matter inputs.

One of the most striking differences between the Amazon and the marine datasets was a strong signature of microbial heterotrophy in the Amazon (File S1). Marine samples contained more reads from photosystems (I and II) and carotenoid biosynthesis (for primary production), and also of uptake systems for choline and betaine (compatible solutes). The latter are hallmarks of osmotically unbalanced habitats, including seawater. The Amazon sample, on the other hand, was enriched in pathways required for degrading many diverse carbon sources including aromatic compounds, (e.g. phenylacetate, benzoate) and amino acids (e.g. Histidine, Leucine, Isoleucine, Arginine). Formate hydrogenase, the Entner-Doudoroff pathway for glycolysis, and TCA cycle genes were markedly over-represented in the Amazon as compared to the GOS samples. In addition, polyhydroxybutyrate metabolism genes were also more abundant indicating extensive use of this important carbon storage material

by the freshwater microbiota. These results are consistent with the Amazon being a net heterotrophic ecosystem. Indeed, the bulk of the organic matter in the river originates from the surrounding forest [53] and others have measured high rates of microbial respiration, even in the absence of high primary production [54].

Closer inspection of the pathways involved in carbon metabolism revealed that microbes in the Amazon are likely processing organic matter fixed by terrestrial plants, providing further evidence for allochthony (File S1). For example, phenylacetate and phenylpropanoids are aromatic secondary metabolites produced by plants [55]. Some of the latter are precursors for the formation of lignin, an important structural polymer in plant cell walls. Lignin is a highly refractory compound and resistant to degradation, but can be degraded by basidiomycete fungi (e.g. white rot) and bacteria. Degradation leads to the formation of ferulic, vanillic and protocatechuic acids, all phenylpropanoids [56]. These can be used as a substrate by several bacteria as the sole source of carbon [57]. Several key proteins involved in the uptake (a vanillate transporter vanK), and subsequent conversion of ferulic acid to 3-carbon metabolites (Feruloyl-CoA synthetase, phenylpropanoid dioxygenase) were identified as abundant in the Amazon sample. Enzymes in a related pathway, also leading to the transport and production of 3-carbon metabolites from benzoic acid, were also identified. The genes conferring ability to assimilate alkanesulfonates were also overrepresented in the Amazon dataset. Soil is a major reservoir for alkanesulfonates derived originally from plant material [58].

Although it is tempting to conclude that the above characteristics of Amazon microbes can be attributed to the freshwater habitat more generally, we found many of the carbon-processing features were unique even in comparison to Lake Gatun. The Amazon sequences were also comparatively more enriched in genes for aromatic compound degradation, amino acid degradation, polyhydroxybutyrate metabolism, and alkanesulfonate assimilation. This indicates that these represent strategies utilized by the microbial community of the Amazon specifically. However, among the important pathways enriched in the Amazon sample relative to the marine samples, that were also found in Lake Gatun were genes in the Entner-Doudoroff pathway, archaeal Embden-Meyerhoff Pathway and gluconeogenesis, and glycerate metabolism (File S1). This implies fundamental differences in carbon metabolism pathways between freshwater and marine environments. We also did not find any evidence of differences in light-dependent metabolic genes (e.g. photolyases, rhodopsins) except for photosystem II genes which were underrepresented in comparison to Lake Gatun.

We also found genes involved in resistance to cobalt-zinc and cadmium overrepresented in the Amazon alone, compared to all these other datasets, and the majority of these genes could be attributed to betaproteobacteria, that are much more abundant in the Amazon (23% of classifiable reads) than in Lake Gatun (9% of classifiable reads).

To further infer unique functional features of the Amazon river as compared to Lake Gatun, we annotated all the PFAM domains found in the predicted proteins of the two datasets, and identified domains that were more frequent in one dataset versus the other. Among the domains that were markedly more frequent in the Amazon were a number of phage-protein related domains (e.g. coat proteins, terminases, portal proteins) (Table S4 and Table S5), indicating the presence of some Amazon-dataset specific phages. One particularly interesting feature was the overrepresentation of the Tannase domain in the Amazon dataset. This domain is found in proteins involved in degradation of aromatic

compounds (e.g. tannins) [59], indicating that much this specific activity is much more common in the Amazon. This is another piece of evidence for the importance of terrestrial organic matter in Amazon carbon cycle. Analysis of the taxonomic distribution of the metagenomic reads revealed this function to be broadly distributed amongst Acidobacteria and Proteobacteria (alpha, beta and gamma) to nearly equal amounts.

However, the most frequently found protein domain in the Amazon dataset, and which was also overrepresented compared to Lake Gatun, was the Bug domain (Table S4), which is found in proteins that are extracytoplasmic tripartite tricarboxylic acid receptors [60]. The substrate binding specificity of these receptors is largely uncharacterized, but citrate, glutamate, and aspartate have been co-crystallized with Bug proteins [61]. This domain was found mainly in betaproteobacterial reads (83% of all reads with the Bug domain), which is consistent with previous studies searching for Bug genes in finished genomes [60]. Their abundance in the dataset indicates that tricarboxylic acids may be a common source of carbon in the flowing river or may simply reflect the abundance of betaproteobacteria in the Amazon (23% of all reads) as compared to Lake Gatun (9% of all reads).

Concluding Remarks

Much less is known about freshwater bacteria than marine ones, or those that impact human health directly (e.g. pathogenic bacteria). This is evidenced by the paucity of genomic sequences available for freshwater bacteria, for instance, *Polynucleobacter necessarius* is the only cosmopolitan freshwater bacteria that has one strain genome sequenced. This can also be attributed to the hurdles in culturing, which has been the main starting point of nearly all sequenced bacterial genomes. Even metagenomic studies, which provide a culture-free alternative, have been heavily biased towards marine systems. Freshwaters play a previously underestimated but surprisingly important role in the oxidation, storage, and release of terrestrial carbon, thereby affecting global carbon budgets [2,3,4]. Our results confirm the importance of heterotrophic metabolism in this large river. Most of the information that has been gathered about the freshwater microbes has been through 16S rRNA gene cloning studies and limited fosmid end sequencing [30], but our results should encourage additional efforts to better characterize the freshwater metagenome in both rivers and lakes, particularly with respect to carbon metabolism.

Importantly, we confirm by a metagenomic approach that actinobacteria are primary members of freshwater ecosystems. The GC content of these relatively unknown actinobacteria does not conform to the generally held views that free living actinobacteria have high GC content [36]. Also, the results indicate that the genomic sequence fragments that we have recovered from these actinobacteria do not correspond to any particular actinobacterial species, but to a multitude, indicating that they are quite divergent from all known actinobacteria.

Apart from actinobacteria, the genomic fragments of the freshwater sister group of *Candidatus Pelagibacter* (LD12) was also found to be quite abundant and distinct from the marine species. Another surprising finding was that maximum number of reads could be assigned not to a bacterial genome, but to the genome of *N. maritimus*, a crenarchaeon. These reads likely belong to a freshwater relative of this marine microbe. Moreover, it appears that crenarchaea in general seem to be much more abundant in freshwaters than in marine systems. These observations taken together indicate the near non existence of closely related genome sequences of microbes belonging to this dataset, and point to the

high degree of uniqueness of this sample. This is an even more pressing reason to conduct further meta-omics based work in these previously neglected ecosystems.

Materials and Methods

Sample collection and processing

The sample was collected in accordance with the Brazilian law (IN n° 154/2007 IBAMA, Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources). The sample was collected from a depth of 8 m from the Solimões-Amazon River (03°56'11.08"S, 63°10'14.45"W) with a 10 liter Niskin bottle on 17 September, 2008, at 2:00 pm. River depth and width at this location were 15 m and 2100 m respectively, and the sample was taken 600 m away from the shore. Some physico-chemical parameters are shown in Table S1.

Four liters of water were filtered in 3 independent Sterivex filters. Each sample was sequentially filtered through a AP20 glass fiber filter (142 mm of diameter); 5 µm pore size polycarbonate filter (142 mm of diameter) and 0.22 µm-pore size Sterivex GV filters (Durapore, Millipore) using a peristaltic pump. Sterivex filters (retaining the 0.2–5 µm-diameter planktonic cells) were filled up with lysis buffer (40 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, 0.75 M sucrose) and stored at –20°C until DNA extraction. The solution was harvested from the filters and DNA was extracted using the Metagenomic DNA from Environmental Water Samples Kit (EPICENTRE, WI, USA). DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop ND 1000 instrument (Thermo Scientific, DE, USA). Five micrograms was used for sequencing in the 454 Sequencing GS FLX Titanium platform (Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil).

Annotation and assembly

The raw metagenomic data were initially processed using CLC Genomics Workbench 3.5, where sequences were quality trimmed. Sequences less than 60 bp were discarded. Assembly was performed using the CLC Genomics Workbench Assembler (>95% identity and >50% of read length). Gene prediction was performed on the assembled sequences using the program MGA (Noguchi *et al.*, 2006). Protein sequences were annotated by using the best blast hit against the NCBI NR database. The entire unassembled dataset was also annotated using the MG-RAST server [62].

Community structure using all reads. For taxonomy, the dataset was compared using BLAST [63] to a combined database containing the NCBI- NT database and whole genome shotgun assembly data for 1000 draft microbial genomes from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/lproks.cgi>). The data were analyzed using MEGAN [64]. The taxonomic analysis was also performed using the MG-RAST server using a cutoff of minimum alignment length ~50 and an evaluate cutoff of 1e-5.

Community structure using rRNA

Ribosomal rRNA gene sequences in the metagenomic data were identified by comparison against the RDP [65] using BLASTN. Only alignments longer than 100 bp were considered. Sequences were considered identified to the genus level if they had a %identity >95% with a well identified existing sequence that was not annotated as “uncultured” or “unidentified”. The best named hit to the metagenomic rRNA sequence was considered to assign the sequence to a high-level taxonomic group. Otherwise only higher taxonomic levels were used. Sequences that matched only those

annotated as “unidentified” or “uncultured” and those with <90% identity to the best matching hit were considered unidentified.

Recruitment plots

Fragment recruitment of the Amazon dataset was performed against all complete and draft microbial genomes using BLASTN. The criteria for counting a hit were minimum %identity of 95% and minimum alignment of 50 bp. Data was plotted using R (<http://cran.r-project.org>). For selected genomes, recruitment was also performed using TBLASTX (evalue cutoff 1e-5 and minimum alignment length 50).

Comparison with GOS dataset

The Amazon data were compared against the entire Global Ocean Sampling (GOS) expedition data [28] using BLASTN, and a hit was counted using the criteria of minimum 95% identity and alignment length of at least 50 bases.

Clustering with selected metagenomic datasets

All vs all comparison was performed using BLASTN with all selected datasets. Only blast hits with >70% identity and >100 bp length were considered. The Jaccard distance D between two datasets (A and B) can be computed as follows

$$D = 1 - (2 AB_s / (AA_s + BB_s))$$

where AB_s is the total bit score of all the common hits between datasets A and B , AA_s and BB_s are the total bit scores of the comparisons of the datasets A and B to themselves. The tree was built using the neighbor program in the PHYLIP package.

Functional profile comparison

Comparison of functional profiles was performed using STAMP [51]. The minimum %identity was 70% and the minimum alignment length was ~100. Statistical significance of the differences between samples was assessed by the Two-sided Fisher’s Exact test and Storey’s FDR method was used for multiple test correction. The most important metabolic categories were selected by filtering by q-value (0.05), and using only those categories that had at least 100 sequences and more than 2-fold ratio between the proportions.

Pfam Domain analysis

Orf prediction in the metagenomic reads was performed using FragGeneScan [66] and HMMER3 package was used to identify Pfam domains in translated protein sequences >60 aa in length. In the comparisons to detect more frequent protein domains in dataset X versus dataset Y, the abundance ratio is computed as % of domain in dataset X/% of domain in dataset Y.

Accession numbers

Sequence data have been deposited in the INSDC Sequence Read Archive under the accession SRP005263.2.

Supporting Information

Figure S1 Location where the sample was taken. The red arrow in the magnified view (right panel) marks the location of the site.
(TIF)

Figure S2 Comparison of Amazon dataset to the entire GOS dataset. Comparison done using BLASTN. Minimum criteria for counting a hit were %identity $\geq 90\%$, and minimum

alignment length of 50 bases. Data shown are hits to each dataset (using Amazon metagenome as query) normalized by the total number of sequences in each GOS sample. Only the top 10 samples are represented here. Shown above each bar are the Latitude, Longitude, Sample Depth, Chlorophyll Content, Salinity, Temperature and Date of Collection. (NA: data not available)

(TIF)

Figure S3 Recruitment of Amazon metagenome reads by microbial genomes (*Nitrosopumilus maritimus*, *Polynucleobacter necessarius* QLW-PIDMWA, *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978). The vertical axis represents the %identity of the metagenomic read to the genome. The comparison was made using TBLASTX.

(TIF)

Figure S4 Phylogenetic profile of the Low GC (<50% GC) and the High GC (>50% GC) reads of the amazon metagenome. Total low GC reads (including unclassified) = 594257, Total high GC reads (including unclassified) = 559245

(TIF)

Figure S5 Archaeal reads in diverse metagenomes.

A) Archaeal vs Bacterial Reads across several metagenomic datasets (shown as a % of all reads with a hit at evalue <1e-5 and alignment length 50). B) Comparison of Archaeal taxonomic groups across several metagenomic datasets (shown as a % of all archaeal reads). Nanoarchaeota not shown as they comprised less than 1% reads in all datasets)

(TIF)

Table S1 Sample parameters.

(DOCX)

Table S2 Phylogenetic Profile of reads common between Amazon and Lake Gatun.

(DOCX)

Table S3 Phylogenetic Profile of Lake Gatun using the MG-RAST Server.

(DOCX)

Table S4 Protein domains overrepresented in the Amazon dataset versus Lake Gatun dataset.

(DOCX)

Table S5 Protein domains overrepresented in the Lake Gatun dataset versus Lake Gatun dataset.

(DOCX)

File S1 The file contains the results of the STAMP comparison of the Amazon dataset versus the other datasets (Lake Gatun, Deep Chlorophyll Maximum and 3 GOS samples GS15, GS16 and GS26).

(XLSX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Ana-Belen Martin-Cuadrado, Lejla Pašić and Carolina Megumi Mizuno for helpful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FRV FHS. Performed the experiments: DT RR TCSdO JWG FPdM FHS. Analyzed the data: RG FRV KDM. Wrote the paper: RG FRV KDM.

References

- Shiklomanov I, Rodda J, eds. (2003) World water resources at the beginning of the 21st century.
- Cole JJ, Prairie YT, Caraco NF, McDowell WH, Tranvik LJ, et al. (2007) Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* 10: 171–184.
- Downing JA, Prairie YT, Cole JJ, Duarte CM, Tranvik LJ, et al. (2006) The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography* 51: 2388–2397.
- Downing JA, Cole JJ, Middelburg JJ, Striegl RG, Duarte CM, et al. (2008) Sediment organic carbon burial in agriculturally eutrophic impoundments over the last century. *Global Biogeochemical Cycles* 22: 10.
- Logares R, Brate J, Heinrich F, Shalchian-Tabrizi K, Bertilsson S (2010) Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11). *Mol Biol Evol* 27: 347–357.
- Zwart G, Crump BC, Agetvereld MPKV, Hagen F, Han SK (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 141–155.
- Newton RJ, Jones SE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S (2011) A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 14–49.
- Hahn MW (2003) Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Appl Environ Microbiol* 69: 5248–5254.
- Wu QL, Hahn MW (2006) Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 67–79.
- Hahn MW, Lang E, Brandt U, Lunsdorf H, Wu QL, et al. (2010) *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 166–173.
- Jezberova J, Jezberova J, Brandt U, Lindstrom ES, Langenheder S, et al. (2010) Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* ssp. *asymbioticus* in lentic freshwater habitats of a heterogeneous 2000 km area. *Environ Microbiol* 12: 658–669.
- Jezberova J, Jezberova J, Brandt U, Hahn MW (2011) Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subspecies *asymbioticus* results from ecological diversification. *Environ Microbiol* 13: 922–931.
- Glockner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, et al. (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 5053–5065.
- Warnecke F, Amann R, Pernthaler J (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ Microbiol* 6: 242–253.
- Allgaier M, Bruckner S, Jaspers E, Grossart HP (2007) Intra- and inter-lake variability of free-living and particle-associated Actinobacteria communities. *Environ Microbiol* 9: 2728–2741.
- Hahn MW (2009) Description of seven candidate species affiliated with the phylum Actinobacteria, representing planktonic freshwater bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 112–117.
- Jezberova J, Sharma AK, Brandt U, Doolittle WF, Hahn MW (2009) ‘*Candidatus Planktophila limnetica*’, an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2864–2869.
- Jones SE, Newton RJ, McMahon KD (2009) Evidence for structuring of bacterial community composition by organic carbon source in temperate lakes. *Environmental Microbiology* 11: 2463–2472.
- Yamarell AC, Kent AD, Lauster GH, Kratz TK, Triplett EW (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microb Ecol* 46: 391–405.
- Lindstrom ES, Kamst-Van Agetvereld MP, Zwart G (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl Environ Microbiol* 71: 8201–8206.
- Newton RJ, Jones SE, Helmus MR, McMahon KD (2007) Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria *aci* lineage. *Appl Environ Microbiol* 73: 7169–7176.
- Yamarell AC, Triplett EW (2005) Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* 71: 227–239.
- Rubin MA, Leff LG (2007) Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microb Ecol* 54: 374–383.
- Crump BC, Armbrust EV, Baross JA (1999) Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl Environ Microbiol* 65: 3192–3204.
- Lemke MJ, Lienau EK, Rothe J, Pagioro TA, Rosenfeld J, et al. (2009) Description of freshwater bacterial assemblages from the upper parana river floodpulse system, Brazil. *Microb Ecol* 57: 94–103.
- Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu B, Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* 68: 5142–5150.
- Winter C, Hein T, Kavka G, Mach RL, Farnleiner AH (2007) Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Appl Environ Microbiol* 73: 421–431.
- Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, et al. (2007) The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biol* 5: e77.
- Pope PB, Patel BKC (2008) Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *Fems Microbiology Ecology* 64: 9–27.
- Debroas D, Humbert JF, Enault F, Bronner G, Faubladiere M, et al. (2009) Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget–France). *Environ Microbiol* 11: 2412–2424.
- Sioli H (1950) Das Wasser im Amazonasgebiet. *Forschungen und Fortschritte* 26: 274–280.
- Lozupone CA, Knight R (2007) Global Patterns in Bacterial Diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11436–11440.
- Oren A (2002) Halophilic Microorganisms and their Environments Kluwer Academic Publishers.
- Ghai R, Martin-Cuadrado AB, Molto AG, Heredia IG, Cabrera R, et al. (2010) Metagenome of the Mediterranean deep chlorophyll maximum studied by direct and fosmid library 454 pyrosequencing. *ISME J* 4: 1154–1166.
- Sharma AK, Zhaxybayeva O, Papke RT, Doolittle WF (2008) Actinorhodopsins: proteorhodopsin-like gene sequences found predominantly in non-marine environments. *Environ Microbiol* 10: 1039–1056.
- Ghai R, McMahon KD, Rodriguez-Valera F (2011) Breaking a Paradigm: Cosmopolitan and Abundant Freshwater Actinobacteria are Low GC. in press.
- Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, et al. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437: 543–546.
- Callieri C, Corno G, Caravati E, Rasconi S, Contesini M, et al. (2009) Bacteria, archaea, and crenarchaeota in the epilimnion and hypolimnion of a deep hololimnetic lake. *Appl Environ Microbiol* 75: 7298–7300.
- Liu Z, Huang S, Sun G, Xu Z, Xu M (2010) Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea in the Dongjiang River, China. *Microbiol Res*.
- Rogers DR, Casciotti KL (2010) Abundance and diversity of archaeal ammonia oxidizers in a coastal groundwater system. *Appl Environ Microbiol* 76: 7938–7948.
- Konstantinidis KT, Bruff J, Karl DM, DeLong EF (2009) Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4,000 meters at station ALOHA in the North Pacific subtropical gyre. *Appl Environ Microbiol* 75: 5345–5355.
- August JC, Barberan A, Casamayor EO (2010) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal* 4: 182–190.
- Llirios M, Gich F, Plasencia A, August JC, Darchambeau F, et al. (2010) Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epilimnetic waters of Lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo). *Appl Environ Microbiol* 76: 6853–6863.
- Urbach E, Vergin KL, Larson GL, Giovannoni SJ (2007) Bacterioplankton communities of Crater Lake, OR: dynamic changes with euphotic zone food web structure and stable deep water populations. *Hydrobiologia* 574: 161–177.
- Agogue H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ (2008) Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 456: 788–791.
- Jung J, Back JH, Park W (2010) Complete genome sequence of the diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. *J Bacteriol* 192: 4794–4795.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 538–582.
- Cateau E, Verdon J, Fernandez B, Hechard Y, Rodier MH (2011) *Acanthamoeba* sp. promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 319: 19–25.
- Piccini C, Conde D, Alonso C, Sommaruga R, Pernthaler J (2006) Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 72: 6560–6568.
- Giovannoni SJ, Tripp HJ, Givan S, Podar M, Vergin KL, et al. (2005) Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309: 1242–1245.
- Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26: 715–721.
- Fisher T (1979) Plankton and primary production in aquatic systems of the Central American Basin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 62A: 31–38.
- Hedges J, Cowie G, Richey J, Quay P, Benner R, et al. (1994) Origins and Processing of Organic Matter in the Amazon River as Indicated by Carbohydrates and Amino Acids. *Limnology and Oceanography* 39: 743–761.
- Richey J, Hedges J, Devol A, Quay P, Victoria R, et al. (1990) Biogeochemistry of Carbon in the Amazon River. *Limnology and Oceanography* 35: 352–371.
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* 3: 2–20.
- Narbad A, Gasson MJ (1998) Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 144(Pt 5): 1397–1405.
- Merkens H, Beckers G, Wirtz A, Burkovski A (2005) Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol* 51: 59–65.
- Autry AR, Fitzgerald JW (1990) Sulfonate-S - A major form of forest soil organic sulfur. *Biology and Fertility of Soils* 10: 50–56.

59. Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, Mizusawa K, Sekine H (1996) Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene* 175: 215–221.
60. Antoine R, Jacob-Dubuisson F, Drobecq H, Willery E, Lesjean S, et al. (2003) Overrepresentation of a Gene Family Encoding Extracytoplasmic Solute Receptors in *Bordetella*. *Journal of Bacteriology* 185: 1470–1474.
61. Fischer M, Zhang QY, Hubbard RE, Thomas GH (2010) Caught in a TRAP: substrate-binding proteins in secondary transport. *Trends Microbiol* 18: 471–478.
62. Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, et al. (2008) The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9: 386.
63. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
64. Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17: 377–386.
65. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37: D141–145.
66. Rho M, Tang H, Ye Y (2010) FragGeneScan: predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Res* 38: e191.

Supplementary Information

Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon River

Rohit Ghai¹, Francisco Rodriguez-Valera^{1*}, Katherine D. McMahon¹, Danyelle Toyama², Raquel Rinke², Teresa Cristina Souza de Oliveira³, José Wagner Garcia⁴, Fernando Pellon de Miranda⁵, Flavio Henrique-Silva^{2*}

Affiliations:

¹Evolutionary Genomics Group, Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Apartado 18, San Juan de Alicante, Alicante, Spain.

²Laboratory of Molecular Biology, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luis, km 235, São Carlos, SP, Brasil.

³Universidade Federal do Amazonas, Setor Sul do Campus Universitário - Bloco H, Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos Ramos, 3000, Manaus, AM – Brasil.

⁴Noosfera Projetos Especiais Ltda, R. Conselheiro Cotegeipe, 685, São Paulo, SP - Brasil

⁵Petróleo Brasileiro S.A – Petrobras, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. Miguez de Melo – CENPES, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Av. Horácio Macedo, 950, Rio de Janeiro, RJ – Brasil.

* Corresponding authors

The first two authors should be considered joint first authors.

Table S1: Sample parameters

Sample Collection Depth (m)	8
Total Depth (m)	15
River Width(m)	2100
Temperature (°C)	29.8
pH	7.09
Oxygen (mg L ⁻¹)	5.05
Turbidity (NTU)	18.20
Suspended material (mg L ⁻¹)	45.67
Biological Oxygen Demand (mg L ⁻¹)	-2.90
Transparency (m)	0.2
Conductivity (μS cm ⁻¹)	109.7
Latitude and Longitude	03°56'11.08" S 63°10'14.45" W
Collection date	17 September 2008
Collection time	2:00 pm

Table S2: Phylogenetic Profile of reads common between Amazon and Lake Gatun

AMAZON READS COMMON WITH LAKE GATUN		LAKE GATUN READS COMMON WITH AMAZON	
NAME	# HITS	NAME	# HITS
Nitrosopumilus maritimus SCM1	11676	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062	12033
Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062	11613	Acidothermus cellulolyticus 11B	8584
Acidothermus cellulolyticus 11B	3712	Nitrosopumilus maritimus SCM1	7191
Streptomyces scabiei str. 87.22	2903	Streptomyces avermitilis MA-4680	6696
Janibacter sp. HTCC2649	2828	Streptomyces scabiei str. 87.22	6168
Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1	2806	Janibacter sp. HTCC2649	5891
Methylobacillus flagellatus KT	2767	Thermobifida fusca YX	5885
Thermobifida fusca YX	2667	Streptomyces coelicolor A3(2)	5691
Streptomyces avermitilis MA-4680	2612	Frankia sp. EAN1pec	4729
Streptomyces coelicolor A3(2)	2386	Kineococcus radiotolerans SRS30216	4422
Kineococcus radiotolerans SRS30216	2142	Frankia sp. Ccl3	3303
Frankia sp. EAN1pec	2028	Salinispora arenicola CNS-205	3134
Salinispora tropica CNB-440	1516	Salinispora tropica CNB-440	2899
Frankia sp. Ccl3	1405	Methylobacillus flagellatus KT	2551
Salinispora arenicola CNS-205	1258	Solibacter usitatus Ellin6076	2465
Nocardia farcinica IFM 10152	1071	Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	2439
marine actinobacterium PHSC20C1	924	Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1	2352
Brevibacterium linens BL2	874	Nocardia farcinica IFM 10152	2244
Mycobacterium smegmatis str. MC2 155	823	marine actinobacterium PHSC20C1	1997
Parvibaculum lavamentivorans DS-1	786	Blastopirellula marina DSM 3645	1913
Mycobacterium vanbaalenii vanbaalenii PYR-1	741	Rubrobacter xylanophilus DSM 9941	1876

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB 382	633	Mycobacterium smegmatis str. MC2 155	1693
Propionibacterium acnes KPA171202	613	Mycobacterium vanbaalenii vanbaalenii PYR-1	1629
Rubrobacter xylanophilus DSM 9941	591	Acidobacteria bacterium Ellin345	1617
Polaromonas sp. JS666	578	Brevibacterium linens BL2	1498
Magnetospirillum magnetotacticum	547	Parvibaculum lavamentivorans DS-1	1474
Mycobacterium sp. MCS	505	Polaromonas sp. JS666	1440
Leifsonia xyli subsp. xyli str. CTCB07	490	Sorangium cellulosum So ce 56	1343
Solibacter usitatus Ellin6076	477	Roseiflexus sp. RS-1	1315
Mycobacterium marinum M	422	Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779	1270

Supplementary Table S3 : Phylogenetic profile of Lake Gatun dataset using the MG-RAST server.

Domain		Organism Name	# Hits
Bacteria	Proteobacteria	Candidatus Pelagibacter ubique HTCC1062	12033
Viruses	dsDNA viruses, no RNA stage	Cyanophage P-SSM2.	8620
Bacteria	Actinobacteria	Acidothermus cellulolyticus 11B	8584
Archaea	Crenarchaeota	Nitrosopumilus maritimus SCM1	7148
Bacteria	Actinobacteria	Streptomyces avermitilis MA-4680	6696
Bacteria	Actinobacteria	Streptomyces scabiei str. 87.22	6168
Bacteria	Actinobacteria	Janibacter sp. HTCC2649	5891
Bacteria	Actinobacteria	Thermobifida fusca YX	5885
Bacteria	Actinobacteria	Streptomyces coelicolor A3(2)	5691
Bacteria	Actinobacteria	Frankia sp. EAN1pec	4729
Bacteria	Actinobacteria	Kineococcus radiotolerans SRS30216	4422
Bacteria	Actinobacteria	Frankia sp. Ccl3	3303
Bacteria	Actinobacteria	Salinispora arenicola CNS-205	3134
Bacteria	Actinobacteria	Salinispora tropica CNB-440	2899
Viruses	dsDNA viruses, no RNA stage	Bacteriophage S-PM2.	2871
Bacteria	Proteobacteria	Methylobacillus flagellatus KT	2551
Bacteria	Fibrobacteres/Acidobacteria group	Solibacter usitatus Ellin6076	2465
Bacteria	Bacteroidetes/Chlorobi group	Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	2439
Bacteria	Proteobacteria	Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1	2352
Bacteria	Actinobacteria	Nocardia farcinica IFM 10152	2244

Supplementary Table S4: Top 25 protein domains overrepresented in Amazon versus Lake Gatun. Column 1 shows the name of the protein domain, columns 2,3 show the number of hits to domain in each dataset. %Ratio= % of domain in Amazon / % of domain in Lake Gatun.

NAMES	# AMAZON	# GATUN	% Ratio	Comment
ERF	203	3	50.80	DNA Binding/Recombination
P22_CoatProtein	225	5	33.79	Phage
Phage_portal_2	235	6	29.41	Phage
Tannase	109	3	27.28	Degradation of aromatics
RecT	148	6	18.52	DNA Binding/Recombination
Terminase_3	208	12	13.01	Phage
Head-tail_con	237	16	11.12	Phage
MCPsignal	190	13	10.97	Signalling via Histidine Kinases
Terminase_GpA	231	18	9.64	Phage
PQQ_N	175	15	8.76	Coenzyme pyrrolo-quinoline quinone
Laminin_G_1	100	9	8.34	Extracellular Domain (usually Metazoan)
VRR_NUC	115	11	7.85	Type III restriction modification enzymes associated
DUF3458	91	9	7.59	Domain of unknown function
HSP90	202	20	7.58	Heat Shock Protein
HDOD	147	16	6.90	Phosphohydrolases in nucleic acid metabolism
Bug	5644	645	6.57	<u>Extracytoplasmic tricarboxylate-binding receptor</u>
CheW	113	13	6.53	Signalling via Histidine Kinases
HemolysinCabind	333	41	6.10	Hemolysin-type calcium-binding repeat
Transposase_mut	137	18	5.71	Transposase
FHIPEP	185	25	5.56	Type III Secretion Apparatus
DUF847	111	15	5.56	Lysozyme related enzyme
ACR_tran	2567	363	5.31	<u>Integral Membrane proteins/Drug Efflux</u>
Terminase_1	284	43	4.96	Phage
DUF404	99	15	4.96	Domain of unknown function
RusA	131	20	4.92	Endonuclease

Supplementary Table S5: Top 25 protein domains overrepresented in Lake Gatun versus Amazon. Column 1 shows the name of the protein domain, columns 2,3 show the number of hits to domain in each dataset. %Ratio= % of domain in Lake Gatun / % of domain in Amazon.

NAMES	# AMAZON	# GATUN	% Ratio	Comment
DUF3110	5	99	26.37	Domain of unknown function
PduV-EutP	29	124	5.70	Ethanolamine Utilization
Glyco_transf_11	45	189	5.59	Glycosyltransferase
Glyco_transf_25	52	182	4.66	Glycosyltransferase
Ras	43	148	4.58	GTPase
Actin	39	126	4.30	Structural Polymer
Sulfotransfer_2	27	82	4.05	Sulfotransferase
TnsA_N	35	98	3.73	Transposase
ATP-grasp_3	53	147	3.69	Ligation of carboxylate-containing molecule to
2OG-Fell_Oxy	74	200	3.60	Oxygenase
Glyco_hydro_2	30	80	3.55	Glycosyl Hydrolase
DUF2596	33	80	3.23	Domain of unknown function
Arf	32	77	3.20	GTPase
DnaJ_CXXCXGXG	72	172	3.18	DnaJ Chaperone
YhjQ	68	159	3.11	Probable Bacterial cellulose synthase related
MraY_sig1	44	102	3.09	Peptidoglycan Biosynthesis
PcrB	68	155	3.04	Probable Helicase
Sulfotransfer_1	42	95	3.01	Sulfotransferase
DUF1731	33	73	2.95	Domain of unknown function
zf-C3HC4	32	70	2.91	Zinc finger proteins
Phage_T4_gp19	150	328	2.91	Phage
GPW_gp25	96	209	2.90	Lysozyme related phage protein
SNase	93	197	2.82	Nuclease
Arg_repressor	35	73	2.78	Arginine Breakdown
DUF836	35	73	2.78	Domain of unknown function

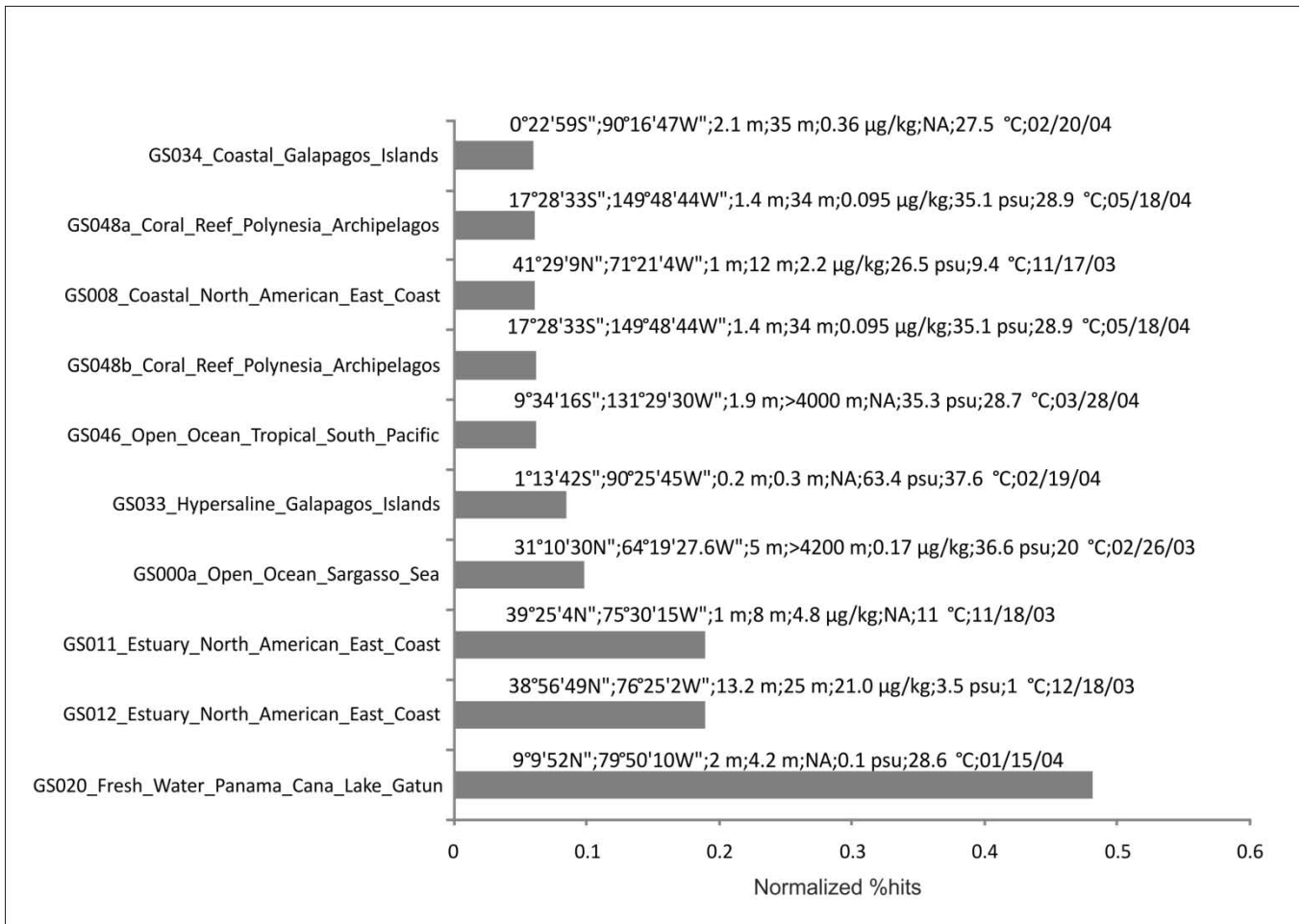
Supplementary Figure S1.

Location where the sample was taken. The red arrow in the magnified view (right panel) marks the location of the site.



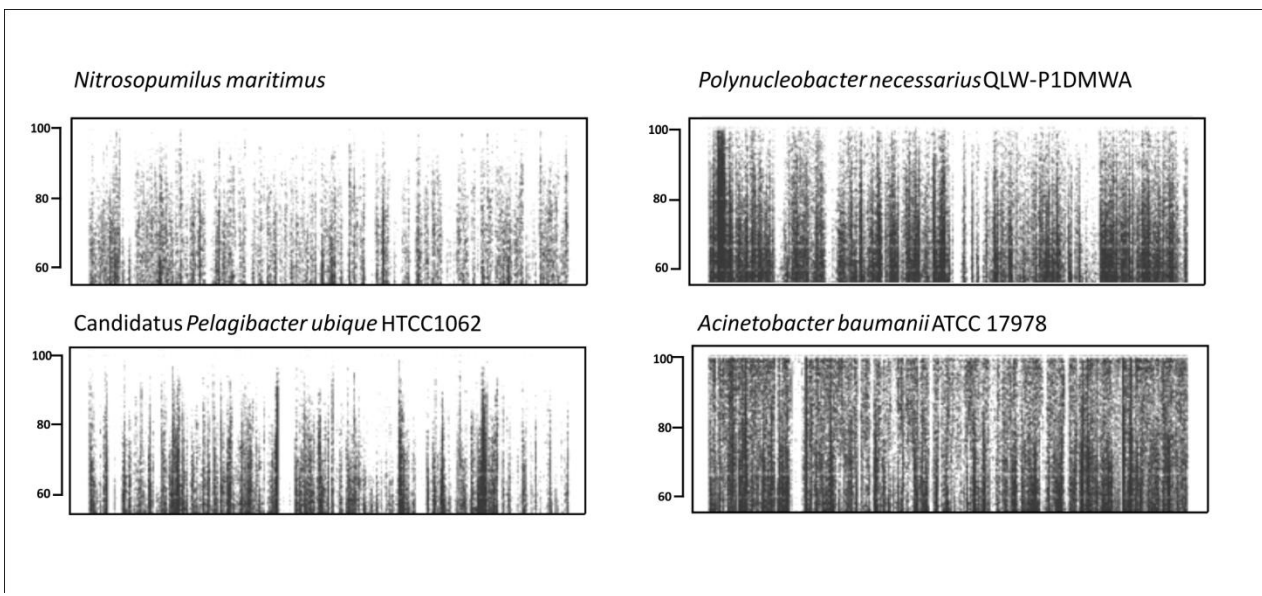
Supplementary Figure S2.

Comparison of Amazon dataset to the entire GOS dataset. Comparison done using BLASTN. Minimum criteria for counting a hit were %identity >= 90%, and minimum alignment length of 50 bases. Data shown are hits to each dataset (using Amazon metagenome as query) normalized by the total number of sequences in each GOS sample. Only the top 10 samples are represented here. Shown above each bar are the Latitude, Longitude, Sample Depth, Chlorophyll Content, Salinity, Temperature and Date of Collection. (NA: data not available)



Supplementary Figure S3.

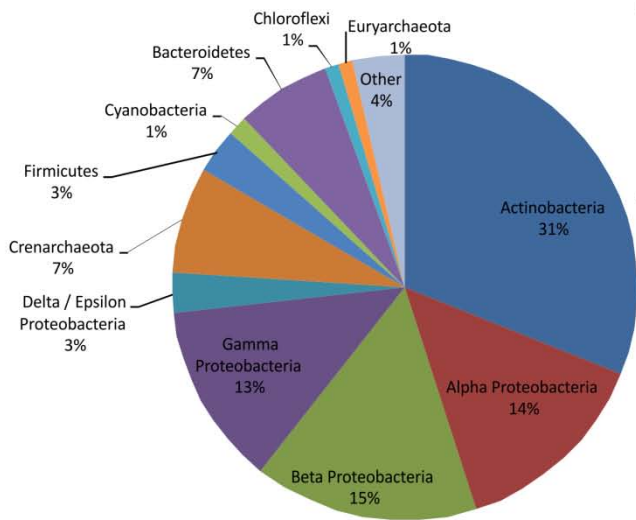
Recruitment of Amazon metagenome reads by microbial genomes (*Nitrosopumilus maritimus*, *Polynucleobacter necessarius* QLW-P1DMWA, *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978). The vertical axis represents the %identity of the metagenomic read to the genome. The comparison was made using TBLASTX.



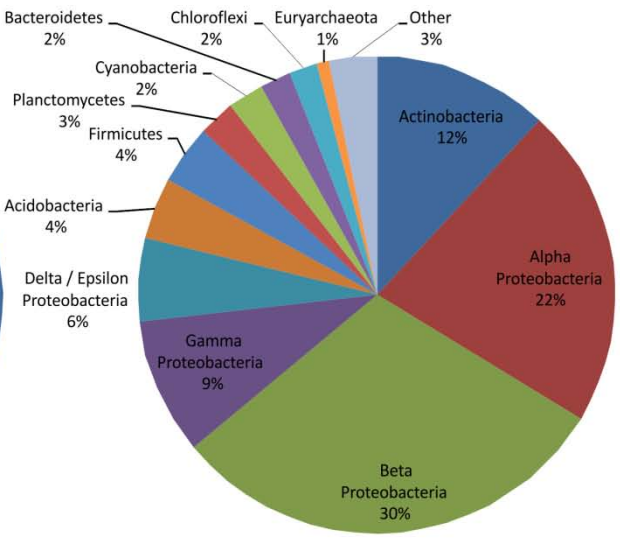
Supplementary Figure S4.

Phylogenetic profile of the Low GC (<50% GC) and the High GC (>50% GC) reads of the amazon metagenome. Total low GC reads (including unclassified) = 594257, Total high GC reads (including unclassified) = 559245

A. Low GC reads (233898)



B. High GC reads (305829)



Supplementary Figure S5.

Archaeal reads in diverse metagenomes

A) Archaeal vs Bacterial Reads across several metagenomic datasets (shown as a % of all reads with a hit at evalue < 1e-5 and alignment length 50).

B) Comparison of Archaeal taxonomic groups across several metagenomic datasets (shown as a % of all archaeal reads). Nanoarchaeota not shown as they comprised less than 1% reads in all datasets)

