



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**ESTUDO DA COMUNIDADE MICROBIANA PLANCTÔNICA EM UM  
RESERVATÓRIO DE REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA COM ÊNFASE EM  
TÉCNICAS MOLECULARES**

**LUIZ SODRÉ NETO**

**SÃO CARLOS, SP**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**ESTUDO DA COMUNIDADE MICROBIANA PLANCTÔNICA EM UM  
RESERVATÓRIO DE REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA COM ÊNFASE EM  
TÉCNICAS MOLECULARES**

**LUIZ SODRÉ NETO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mirna Helena Regali Seleglim  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Magnólia Fernandes Florêncio de Araújo

**SÃO CARLOS, SP**

**2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S679ec

Sodré Neto, Luiz.

Estudo da comunidade microbiana planctônica em um reservatório de região tropical semiárida com ênfase em técnicas moleculares / Luiz Sodré Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

88 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Ecologia aquática. 2. Bacterioplâncton. 3. Arqueoplâncton. 4. DGGE. I. Título.

CDD: 574.5263 (20<sup>a</sup>)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

## Relatório de Defesa de Tese

Candidato: Luiz Sodré Neto

Aos 17/12/2012, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, a defesa de tese de doutorado sob o título: ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS, POR MEIO DE TÉCNICAS MOLECULARES, EM RESERVATÓRIO DE REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA, apresentada pelo candidato Luiz Sodré Neto. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

### Participantes da Banca

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim  
Profa. Dra. Odete Rocha  
Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão  
Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan  
Prof. Dr. José Etham de Lucena Barbosa

Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	USP
Titular	UEPB

Conceito  
Aprovado  
Aprovado  
Aprovado  
Aprovado  
Aprovado

Resultado Final: Aprovado

### Parecer da Comissão Julgadora\*:

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, João Augusto da Silva Affonso, representante do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

Profa. Dra. Odete Rocha

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão

Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan

Representante do PPG: João Augusto da Silva Affonso

( ) Não houve alteração no título da tese  Houve. O novo título passa a ser:

ESTUDO DA COMUNIDADE MICROBIANA PLANCTÔNICA em um  
RESERVATÓRIO DE REGIÃO TROPICAL SEMIÁRIDA COM ÊNFASE EM  
TÉCNICAS MOLECULARES

\*Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Para gozar dos direitos do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, o candidato ainda precisa ter sua tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Dedico:

Aos meus pais Fernando e Lúcia, e aos meus irmãos Henrique Sodré e Fernando Sodré pela compreensão, pelo exemplo de dedicação, pelo amor da nossa família e pelo incentivo durante a minha trajetória acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar as minhas escolhas e direcionar os meus pensamentos para o bem;

Aos meus pais Fernando Albino e Lúcia Sodré e aos meus irmãos Fernando Sodré e Henrique Sodré, pela cumplicidade, pela compreensão nos momentos conturbados e pelo carinho de sempre;

À minha orientadora Dra. Mirna Helena, pela confiança depositada no meu trabalho, mesmo com a distância geográfica entre os nossos laboratórios, e pelo auxílio efetivo no que foi preciso;

À minha co-orientadora Dra. Magnólia Fernandes F. Araújo, pela indicação do PPGERN para o desenvolvimento do meu doutorado, pelo suporte financeiro do trabalho por meio do projeto CT-Hidro do CNPq sob sua coordenação, pela amizade e dedicação, e pelas orientações.

Aos colegas Msc. Abinadabe Melo, Msc. Bruno Gomes, Dra. Maria Beatriz Mesquita, Dr. Ciáxares Carvalho, Dr. Igor Santos, Dr. Carlos Blaha, Dr. Paulo Marinho, Dra. Sílvia Batistuzzo, Dra. Lucymara Fassarela, Dra. Magnólia Fernandes F. Araújo, Dra. Ivaneide A. S. Costa e Dra. Rosely Meissner, pelo acesso aos laboratórios e pelo auxílio nas análises moleculares.

Aos Professores Dr. Armando Vieira, Dra. Odete Rocha e Dra. Nelma Bossolan, pelas contribuições no exame de qualificação do doutorado.

Aos colegas e professores da UFSCar com quem tive a oportunidade de conviver e aprender, e aos professores da Universidade Federal de Campina Grande, especialmente à Dra. Flávia Lins, pelo suporte e incentivo necessários para a realização do trabalho.

À minha namorada Marcele Chacon, pelo amor, pela compreensão, cumplicidade e incentivo, e aos meus amigos que sempre estiveram apoiando, servindo como exemplos e entendendo as minhas ausências.

## RESUMO

Reservatórios da região semiárida brasileira têm papel fundamental na manutenção do abastecimento para as populações do seu entorno, e os usos múltiplos desses ecossistemas alteram a qualidade das suas águas e conseqüentemente as comunidades aquáticas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos períodos secos e chuvosos durante três anos consecutivos sobre a densidade e diversidade da comunidade procariótica da coluna de água na Barragem Armando Ribeiro Gonçalves, bem como analisar as flutuações de algumas variáveis limnológicas medidas. Oxigênio dissolvido, temperatura da água e pH foram medidos *in situ* usando-se uma sonda multiparamétrica YSI. Para as análises laboratoriais de fósforo total, estimativa de densidade de fitoplâncton, bacterioplâncton e arqueoplâncton, e extração de DNA, alíquotas das amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia Aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) foi usada para analisar variações sazonais na composição das comunidades procarióticas planctônicas de em reservatório eutrófico de região tropical semiárida, influenciadas por períodos alternados de chuva e estiagem. A abundância do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a riqueza das bandas da DGGE foram mais influenciadas pela pluviosidade, temperatura da água e concentração de fósforo total (TP). A análise de componentes principais (PCA) mostrou fortes correlações entre estes fatores. A análise de correspondência canônica (CCA) revelou diferenças temporais na composição das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* relacionadas à pluviosidade, ao volume do reservatório, à temperatura e à densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton, indicando a predominância dos fatores ligados aos eventos de precipitação na determinação da estrutura dessas comunidades, possivelmente compostas por populações permanentes e populações transitórias. Isto sugere dois momentos de estabilidade no conjunto de variáveis ambientais: um quando o volume de água armazenada é menor; e outro quando o volume é maior, sendo as estabilidades quebradas pelos eventos de chuva e pela perda de água, respectivamente.

## ABSTRACT

Reservoirs of Brazilian semiarid regions are essential to guarantee water supply to the people who live around them, and the multiple uses change the water quality and the communities of these ecosystems. This study aimed to evaluate the effects of dry and rainy periods during three consecutive years on the density and diversity of the prokaryotic community of the water column in the Armando Ribeiro Gonçalves dam, besides to analyze the fluctuations on some limnological variables. Dissolved oxygen, water temperature and pH were measured with a multiparametric probe (YSI). Sub-samples to the analysis of total phosphorus, phytoplankton density, bacterial and archaeal density determination, and DNA extraction were taken to the Laboratório de Microbiologia Aquática of the Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to elucidate temporal shifts on planktonic prokaryotic community of the reservoir influenced by rainy and dry seasons. Bacterial and archaeal abundance and the DGGE band richness were influenced by pluviosity, water temperature, and total phosphorus (TP). Principal components analysis (PCA) showed strong correlations among these variables. Canonical correspondence analysis (CCA) showed temporal shifts on Bacterial and archaeal community composition, associated with the pluviosity, reservoir volume, water temperature, and prokaryotic density. This suggests the predominance of factors associated to precipitation events on community structure determination, that is probably composed by persistent and transitory populations. Considering the set of environmental variables, the results indicated two stability moments in reservoir: one moment when the reservoir volume is smaller; and another when the reservoir volume is greater. These stabilities were broken by the rain and by the water loss, respectively.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Solo rochoso do reservatório Armando Ribeiro Gonçalves (região alagável).

**Figura 2:** Reservatório Armando Ribeiro Gonçalves.

**Figura 3:** Localização da Bacia Hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu e Barragem Armando Ribeiro Gonçalves, estado do Rio Grande do Norte. Fontes: Imagens adaptadas de Secretaria de Estado de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (SEMARH – [www.semarh.rn.gov.br](http://www.semarh.rn.gov.br)) e Google Earth.

**Figura 4:** Médias anuais das precipitações no Brasil entre os anos de 1961 e 2007. A região hidrográfica Atlântico Nordeste Oriental está representada pela letra E. Fonte: ANA (Agência Nacional das Águas), 2009.

**Figura 5:** Localização dos principais reservatórios do Nordeste e suas capacidades. A seta indica na legenda a Barragem Armando Ribeiro Gonçalves. Fonte: ANA (Agência Nacional das Águas), 2009.

**Figura 6:** Volume do reservatório (mínimo de 1,603 e máximo de  $2,4 \times 10^9$  m<sup>3</sup>) (Fonte: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS – [www.dnocs.gov.br](http://www.dnocs.gov.br)), precipitação mensal (de 0,0 a 354,1 mm), e insolação mensal (mínima de 155,3 e máxima de 304,5 h) entre abril de 2009 e março de 2012. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET – [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br))

**Figura 7:** Representação esquemática da coleta das amostras de água para extração do DNA.

**Figura 8:** Protocolo para revelação de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.

**Figura 9:** Comportamento da densidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (Prokaryotic Density x  $10^7$  Org mL<sup>-1</sup>), do fitoplâncton (Phytoplankton Density (x  $10^5$  Cell mL<sup>-1</sup>) (colunas), e flutuações no Volume do reservatório (Reservoir volume x  $10^9$  m<sup>3</sup>), Pluviosidade (Rainfall (mm)) e TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Figura 10:** Resultados dos géis de PCR e DGGE: **(a)** Géis de agarose 0,7% contendo um marcador (**M**) de 100 pb (100bp DNA Ladder Marker – Promega) e os fragmentos de DNA de 550 (Bacteria) e 600 pb (Archaea) resultados da PCR; **(b)** Géis de poliacrilamida 6% com gradiente de desnaturação 15 – 55% indicando as distribuições das bandas de Bacteria e Archaea referentes aos meses de coletas.

**Figura 11:** Biplot da PCA evidenciando as correlações entre o número de bandas da DGGE, as densidades de microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, e as demais variáveis ambientais estudadas. Os componentes 1 e 2 explicam 67,2% da variação dos conjuntos de dados dos meses de coletas.

**Figura 12:** Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades das bandas de *Archaea* em cada mês de coleta.

**Figura 13:** Dendrogramas dos padrões de distribuição das 28 bandas de *Archaea* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) das bandas no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.

**Figura 14:** Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades das bandas de *Bacteria* em cada coleta.

**Figura 15:** Dendrogramas dos padrões de distribuição das 43 bandas de *Bacteria* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) das bandas no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.

**Figura 16:** CCA evidenciando o padrão de distribuição das bandas da DGGE, indicado pelos meses de amostragem, relacionado às variáveis ambientais Pluviosidade (mm), Temperatura (°C), Densidades do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (Org mL<sup>-1</sup>), Volume do Reservatório (x 10<sup>9</sup> m<sup>3</sup>), pH, DO (mg L<sup>-1</sup>), Secchi (m) e TP (µg L<sup>-1</sup>).

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Características hidrológicas e morfométricas da bacia hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu e do reservatório Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves.

**Tabela 2:** Sequências de nucleotídeos e grupo alvo dos primers utilizados para PCR/DGGE.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

N – Nitrogênio

S – Enxofre

TP – Fósforo Total

DO – Oxigênio Dissolvido

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

DGGE – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante

ANA – Agência Nacional das Águas

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas

SEMARH – Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos

CAERN – Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte

dNTP – desoxirriboNucleotídeos trifosfato

dATP – desoxiAdenina trifosfato

dGTP – desoxiGuanina trifosfato

dCTP – desoxiCitosina trifosfato

dTTP – desoxiTimina trifosfato

Grampo GC – Sequência rica em Guanina e Citosina

bp – Pares de bases

vol/vol – volume/volume

TAE – Tris Acetato EDTA

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

NaOH – Hidróxido de Sódio

UPGMA – Método de agrupamento de pares usando médias aritméticas

CCA – Análise de Correspondência Canônica

PCA – Análise de Componentes Principais

BACC – Composição da Comunidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Caracterização da área de estudo.....	17
3.2 Local das coletas .....	18
3.3 Amostragem .....	22
3.4 Estimativa de Densidade do Bacterioplâncton e Archeoplâncton .....	23
3.5 Estimativa de Densidade do Fitoplâncton .....	23
3.6 Variáveis Limnológicas .....	23
3.7 Extração do DNA metagenômico .....	24
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) .....	25
3.9 Análises dos dados .....	27
4. RESULTADOS .....	29
5. DISCUSSÃO .....	36
6. CONCLUSÕES .....	39
7. REFERÊNCIAS .....	41
8. ANEXOS .....	52
8.1 Anexo 1: Artigo “Is <i>Archaea</i> an important component of planktonic heterotrophic prokaryotic community? A case study in a reservoir under tropical semi-arid climate” .....	53
8.2 Anexo 2: Manual de instruções do kit de extração de DNA .....	76
8.3 Anexo 3: Exemplar de relatório de gel de DGGE gerado no software LabImage .....	82

## 1. INTRODUÇÃO

As comunidades planctônicas exibem papel essencial na produção de matéria e transferência de energia dentro da teia alimentar aquática, por incluir organismos de diferentes níveis tróficos, os quais ocorrem desde a base até níveis mais elevados (ALMEIDA, 2011). Atividades microbianas são responsáveis pela maioria dos processos biogeoquímicos na coluna d'água (EILER E BERTILSSON, 2004; PERNTHALER E AMANN, 2005) e o conhecimento dos fatores que controlam a composição e diversidade microbianas é importante para o entendimento de como os microrganismos atuam nestes processos (HUMAYOUN et al., 2003; MUSHEGIAN et al., 2011).

O bacterioplâncton é um componente abundante e ecologicamente importante nos ecossistemas pelágicos (JARDILLIER et al., 2004), principalmente devido à extraordinária diversidade de suas vias metabólicas, tanto nos oceanos quanto em ambientes continentais (LINDSTROM E BERGSTROM, 2005), embora um número relativamente pequeno de grupos bacterianos pareça dominar o plâncton dos diversos ambientes de água doce mesmo com as suas diferenças físicas, químicas e biológicas (ZWART et al., 2002).

Os ecossistemas de água doce também tem sido revelados como grandes reservatórios de diversidade arqueana (AUGUET et al., 2010). Microrganismos do Domínio *Archaea* tem se mostrado amplamente distribuídos e quantitativamente abundantes nos oceanos, nos lagos, nos solos e sedimentos, bem como apresentado associações com bactérias e animais (AUGUET E CASAMAYOR, 2008; AUGUET et al., 2010; BARBERÁN et al., 2011). *Archaea* e *Bacteria* divergem principalmente por possuírem sistemas de processamento de informações distintos, incluindo estruturas de ribossomos, cromatinas e proteínas envolvidas nos processos de replicação, transcrição e tradução, embora apresentem diversidades fenotípicas comparáveis (CARDOSO et al., 2003).

Bacterioplâncton e arqueoplâncton são amplamente responsáveis pela parte oxidativa do ciclo do carbono e também pela oxidação de formas reduzidas de N e S de origem biótica (GIOVANNONI E VERGIN, 2012). *Bacteria* ou *Archaea*, a maioria dos microrganismos envolvidos nestas transformações continuam amplamente descaracterizados devido à complexidade da dinâmica dessas comunidades no ambiente (MCCARREN et al., 2010; RAES et al., 2011).

Pouco se conhece sobre a diversidade microbiana dos reservatórios tropicais, principalmente em virtude da escassez de abordagens moleculares nos estudos

desenvolvidos na região. Diversos trabalhos (COSTA et al., 1998; BOUVY et al., 2000; BARBOSA, 2002; COSTA et al., 2006; ARAÚJO E COSTA, 2007; ESKINAZI-SANT'ANNA et al., 2007; SODRÉ-NETO E ARAÚJO, 2008; CÂMARA et al., 2009; CHELLAPPA et al., 2009; COSTA et al., 2009; MOURA et al., 2011), destinados à caracterização das comunidades aquáticas em reservatórios do semiárido brasileiro, apesar da sua importância, são pesquisas que abordam a eutrofização e a ecologia destes ecossistemas, focadas nas interações entre as comunidades e as variáveis ambientais, utilizando técnicas de quantificação e identificação de organismos cultiváveis.

Com o advento da biologia molecular e da bioinformática, os estudos taxonômicos sofreram grandes mudanças principalmente no que se refere à diversidade microbiana a partir de amostras ambientais. O uso de ferramentas e metodologias independentes de cultivo ampliaram as perspectivas de conhecimento sobre diversidade de microrganismos e aproximaram a realidade das diferenças numéricas entre os organismos estudados em laboratórios e aqueles que estão em grande maioria no ambiente, mas não crescem *in vitro*. Uma das razões para a enorme discrepância entre o número de microrganismos não-cultiváveis em relação aos cultiváveis pode ser a interdependência dos diferentes organismos. Outra razão é certamente a falta de conhecimento das reais condições sob as quais as bactérias estão crescendo no seu ambiente natural (MUYZER E SMALLA, 1998). Na natureza, os microrganismos existem tipicamente em complexas comunidades, que podem ser altamente variáveis tanto em composição quanto em abundância das espécies constituintes (DEGNAN E OCHMAN, 2012).

Os estudos moleculares, independentes de cultivo, podem auxiliar numa estimativa mais concreta da composição dessas comunidades e aumentar o entendimento sobre a influência na qualidade da água, pois apesar do avanço no conhecimento sobre a diversidade procariótica, a maioria das bactérias presentes em ambientes naturais são não-cultiváveis, sua diversidade funcional é desconhecida (TORSVIK et al., 2002) e a forma como elas interferem na função ambiental é pouco entendida (BELL et al., 2005; LIU et al., 2009).

Nos últimos trinta anos, métodos de caracterização da biodiversidade procariótica baseados na sequência dos genes 16S rRNA ou em genes estruturais relevantes têm quantificado ou detectado filogeneticamente comunidades microbianas aquáticas (SEEWALDT E STACKEBRANDT, 1982; PACE et al., 1986; WARD et al., 1990; WINTZINGERODE et al., 1997; GLÖCKNER et al., 2000; BAKER et al., 2003; ALLGAIER E GROSSART, 2006; BABERÁN E CASAMAYOR, 2010; BAKKE et al.,

2011; ROY et al., 2012). Estes genes são representativos dos diferentes tipos de genomas, usados para uma avaliação mais rápida e abrangente da biodiversidade (PACE, 1997). A aplicação da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em combinação com a extração dos ácidos nucleicos de matrizes ambientais tem sido fundamental para o desenvolvimento de abordagens em ecologia microbiana (SMITH E OSBORN, 2009), facilitando a detecção de microrganismos não-cultiváveis de praticamente todos os ambientes, e sendo usadas extensivamente nos estudos de diversidade microbiana (BEN-DOV et al., 2006). Os estudos independentes de cultivo permitem uma rápida avaliação de mudanças temporais e espaciais na estrutura das comunidades (YANNARELL et al., 2003).

Técnicas de amplificação baseadas em PCR são capazes de detectar DNA/RNA em baixas concentrações (ZHANG E FANG, 2006) e parecem ideais para esse tipo de estudo porque muitos microrganismos diferentes estão presentes em pequenas quantidades nas comunidades microbianas naturais (LEE et al., 2009). Por outro lado, estes métodos não são apropriados para a obtenção de valores absolutos de abundância de filotipos (STEPANAUSKAS et al., 2003), pois apenas as populações numericamente mais abundantes são alvos dos *primers* utilizados (FORNEY et al., 2004). Além disso, um simples genótipo pode expressar uma variedade de características ou plasticidade fenotípicas, e características idênticas podem ser definidas por inúmeros genótipos (PERNTHALER E AMANN, 2005).

Associada à PCR, a técnica de DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação) (MUYZER et al., 1993) tem sido amplamente utilizada no estudo de comunidades do bacterioplâncton em ambientes lênticos (CASAMAYOR et al., 2000; LINDSTRÖM, 2001; DE WEVER et al., 2005), das quais os perfis podem ser usados para identificar diferenças espaciais ou temporais na estrutura, além de obter uma estimativa de número de espécies e abundância, baseados no número e intensidade dos fragmentos amplificados (OVREÅS et al., 1997). Esse tipo de eletroforese consiste em separar fragmentos de DNA de tamanhos similares contendo diferentes constituições de nucleotídeos (LINDSTRÖM E LESKINEN, 2002) e uma vantagem primária do método é a habilidade de processar múltiplas amostras simultaneamente de forma rápida e econômica (GREEN et al., 2009), embora as bandas que ocupam as mesmas posições nos géis nem sempre representem o mesmo taxon, ou ainda, as diferenças e similaridades nos padrões do gel podem não ser completamente correspondentes às que ocorrem na natureza. Contudo, levando em conta as limitações do método, considera-se que a DGGE



proporciona uma visão aceitável das diferenças e similaridades das populações dominantes das comunidades microbianas (MUYZER E SMALLA, 1998; LINDSTRÖM, 2001).

Nesse contexto, o presente trabalho propôs uma abordagem com estudos moleculares de caracterização das comunidades procarióticas na Bacia Hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu, com resultados de três anos de levantamento de dados das comunidades em termos de estimativas de abundância e riqueza de espécies em resposta às alterações ambientais intra-aneais e interaneais, além da avaliação das mudanças nas variáveis limnológicas influenciadas pelos períodos alternados de seca e chuva na Barragem Armando Ribeiro Gonçalves, Estado do Rio Grande do Norte. Particularmente no semiárido brasileiro, não há estudos anteriores sobre os microrganismos do domínio *Archaea* como componentes do plâncton dos reservatórios, assim como não existem trabalhos de caracterização dessas comunidades, nesses ambientes, determinada por métodos moleculares.

Os resultados constituem a primeira descrição envolvendo a composição da comunidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton em reservatórios do semiárido brasileiro, o que reforça a importância da presente pesquisa já que este tipo de estudo pode revelar dados quantitativos e de diversidade, especialmente dos microrganismos não-cultiváveis essenciais para a dinâmica dos reservatórios e que sofrem influências de alterações ambientais únicas do clima semiárido. Paralelamente, dando continuidade às investigações sobre a relação entre as variáveis bióticas e abióticas da comunidade, buscou-se relacionar a densidade das comunidades procarióticas heterotróficas planctônicas com os dados de densidade do fitoplâncton e algumas variáveis ambientais.

A intenção foi dar o primeiro passo na caracterização dessas comunidades e estimular o investimento em outros estudos com abordagens moleculares, visando uma melhor compreensão da complexa dinâmica das comunidades aquáticas de reservatórios e buscando aliar os conhecimentos às estratégias de monitoramento e manutenção da qualidade dessas águas, pois, apesar de todo o conhecimento sobre a importância dos procariotos em processos como a ciclagem de nutrientes, a composição das comunidades e a dinâmica das suas mudanças em escalas de tempo mais prolongadas não são bem entendidas (YANNARELL et al., 2003). Além disso, os estudos desenvolvidos em ecossistemas aquáticos tropicais permitem a investigação do efeito das altas temperaturas e do regime pluviométrico sobre as populações bacterianas (ARAÚJO E GODINHO, 2008).

## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipóteses**

- Os períodos de seca e de chuva promovem mudanças na densidade e na composição das comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton;
- As flutuações ocorridas nas variáveis ambientais não são suficientes para promover mudanças na estrutura das comunidades procarióticas heterotróficas de um ano para outro.

### **2.2 Objetivos geral e específicos**

O objetivo do presente estudo foi analisar as composições das comunidades de bacterioplâncton e arqueoplâncton na Barragem Armando Ribeiro Gonçalves (semiárido brasileiro) em períodos de seca e com a presença de chuva no entorno do reservatório, durante três anos consecutivos, objetivando-se especificamente:

- Estimar as densidades dos organismos procarióticos heterotróficos;
- Estimar as densidades do fitoplâncton;
- Distinguir as comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton por meio de PCR/DGGE;
- Associar as densidades e os perfis eletroforéticos das comunidades às variáveis ambientais e às influências dos períodos de estiagem e de chuva;
- Analisar as relações entre a densidade fitoplanctônica, a densidade dos procariotos heterotróficos e as demais variáveis ambientais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização da Área de Estudo

As regiões semiáridas, caracterizadas por longos períodos de estiagem e altas taxas de evaporação e transpiração, abrangem grandes áreas habitadas por milhões de pessoas em todo o Mundo. No Brasil, pela proximidade ao Equador, o clima semiárido apresenta particularidades no sistema de circulação atmosférica, influenciado por fenômenos climáticos como *El Niño* e *La Niña*, que o tornam um dos mais complexos e com algumas diferenças em relação às demais regiões semiáridas. O balanço hídrico negativo típico da região é resultado das precipitações médias anuais inferiores aos 800 mm, insolação média de 2800h, temperaturas médias de até 27°C e evaporação em torno de 2000 mm ano<sup>-1</sup>, além da predominância de solos rasos sobre rochas cristalinas que desfavorecem a troca de água entre os rios e os solos adjacentes. Sob influência destas características, cerca de 23 milhões de pessoas vivem nos 1.133 municípios do semiárido, numa área de aproximadamente 970 mil km<sup>2</sup> (ANA, 2009) onde a disponibilidade de água durante as estiagens depende do armazenamento em barragens artificiais e, na maioria dos ambientes aquáticos, os níveis da água variam de ausência total, nos períodos secos (figura 1), até grandes descargas, nas estações chuvosas (MONTENEGRO et al., 2012). O cenário é de áreas alagadas pelo barramento de rios, de onde a água é retirada para as necessidades básicas ou fins agroindustriais e onde acabam sendo depositados resíduos de atividades humanas.

Os reservatórios do semiárido brasileiro são fundamentais, pois, além do potencial hidrelétrico em alguns casos, estes ambientes são utilizados para fins de abastecimento público, atividades de aquicultura, irrigação e lazer, interferindo fortemente no desenvolvimento social e econômico das cidades abastecidas pelas suas águas. Por outro lado, tais usos múltiplos desse tipo de ecossistema também interferem na qualidade da água e conseqüentemente em toda a dinâmica das comunidades aquáticas. Muitos reservatórios são eutrofizados e apresentam elevadas concentrações de nutrientes e altas densidades de microrganismos. São comuns as florações de cianobactérias em virtude do aporte de nutrientes de origem alóctone e favorecidas pelas temperaturas médias elevadas, pH neutro a alcalino e forte incidência de luz durante o ano inteiro. O crescimento excessivo e persistente do fitoplâncton nos reservatórios do semiárido, mesmo em alguns casos não oferecendo riscos à saúde humana, pode gerar sabor e odor desagradáveis na

água, assim como causar prejuízos pelo entupimento de equipamentos das estações de tratamento de água, dentre outras perturbações.

A eutrofização artificial também proporciona o desenvolvimento das comunidades procarióticas e o aumento na produção secundária dessas comunidades promove uma diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido na água, comprometendo outras comunidades aquáticas aeróbias e refletindo negativamente na economia e na saúde das populações que usam essas águas. Os altos índices de doenças de veiculação hídrica registrados, bem como as eventuais baixas na produção pesqueira, podem estar relacionados às consequências das atividades de uma variedade de microrganismos com elevadas densidades encontradas nesses ambientes.



**Figura 1:** Solo rochoso do reservatório Armando Ribeiro Gonçalves (região alagável).

### 3.2 Local das coletas

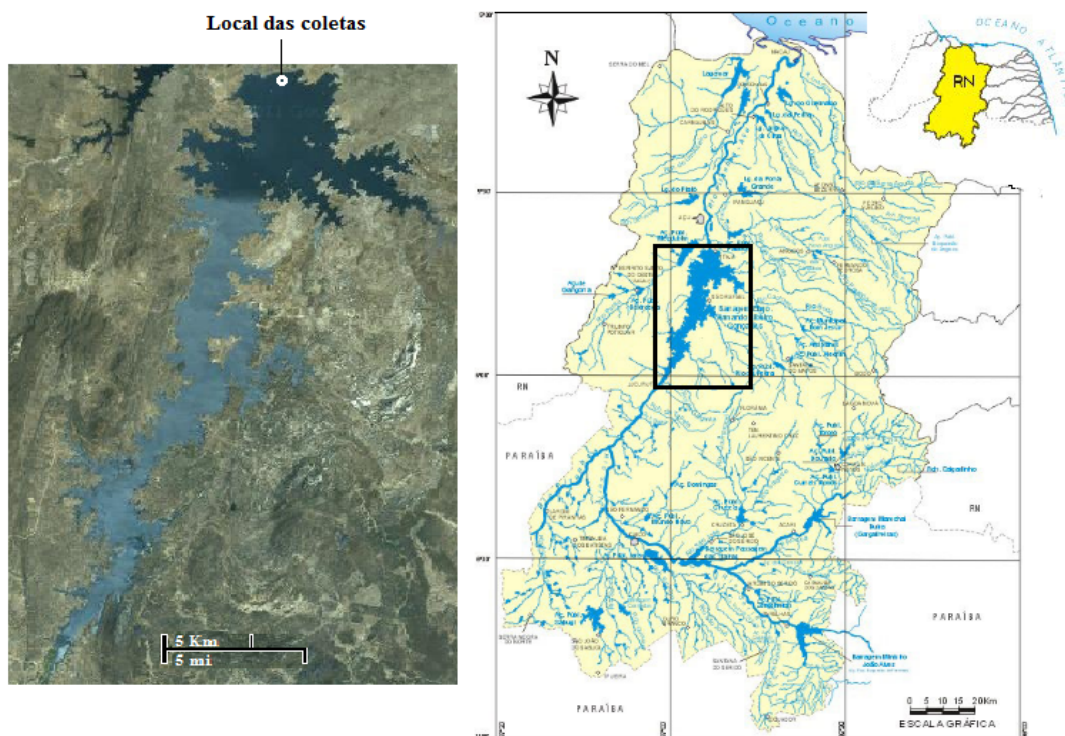
O trabalho foi realizado na Barragem Armando Ribeiro Gonçalves (05°67' S; 36°88' O) (figura 2), localizada na Bacia Hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu (Figura 3). A Bacia abrange uma área de 36.770 Km<sup>2</sup>, na parte ocidental do estado da Paraíba e no centro-norte do estado do Rio Grande do Norte, e está inserida na região hidrográfica

Atlântico Nordeste Oriental (Figura 4), onde as médias anuais de precipitação na área da bacia tem sido historicamente inferiores aos 750 mm.

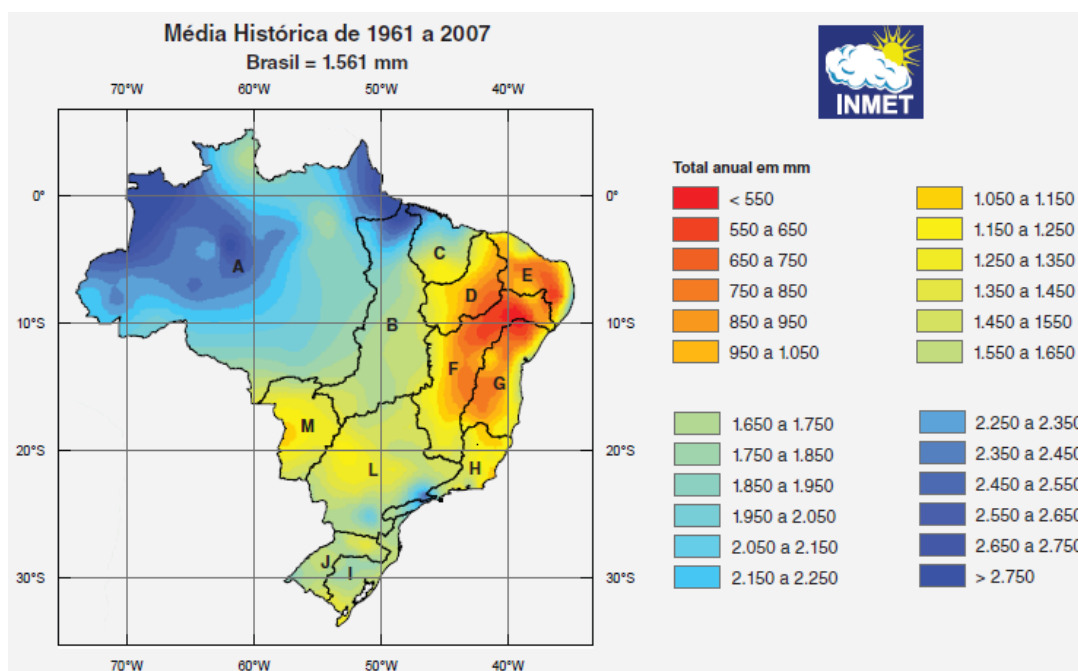
Considerou-se período chuvoso o intervalo de tempo compreendendo os meses nos quais ocorreram eventos de precipitação no entorno do reservatório.



**Figura 2:** Reservatório Armando Ribeiro Gonçalves

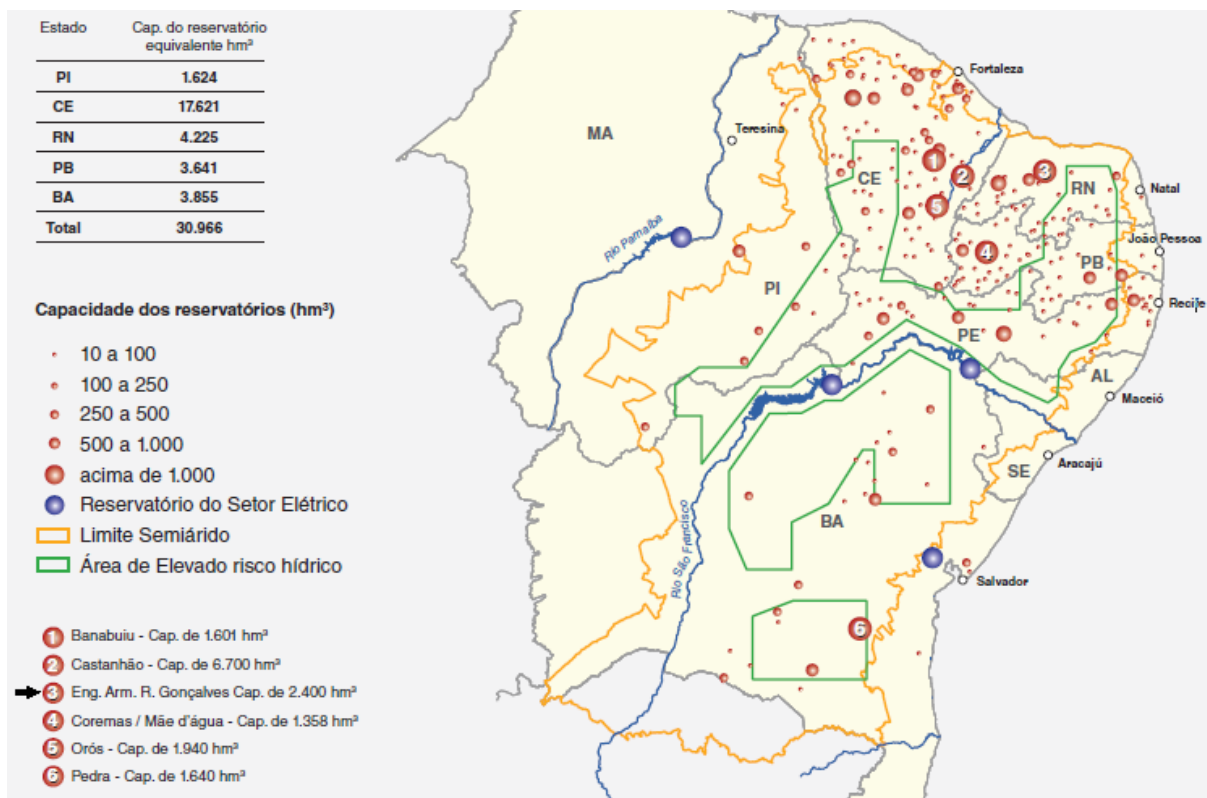


**Figura 3:** Localização da Bacia Hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu e Barragem Armando Ribeiro Gonçalves, estado do Rio Grande do Norte. Fontes: Imagens adaptadas de Secretaria de Estado de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos (SEMARH – [www.semarh.rn.gov.br](http://www.semarh.rn.gov.br)) e Google Earth.



**Figura 4:** Médias anuais das precipitações no Brasil entre os anos de 1961 e 2007. A região hidrográfica Atlântico Nordeste Oriental está representada pela letra E. Fonte: ANA (Agência Nacional das Águas), 2009.

O reservatório cobre uma área de 19.200 ha, sendo o segundo maior do Nordeste brasileiro destinado aos múltiplos usos (figura 5). Com capacidade de acumular 2,4 bilhões m<sup>3</sup> de água, comporta 68% de toda a água armazenada no estado do Rio Grande do Norte, abastecendo 400 mil pessoas em 20 municípios e dezenas de comunidades rurais do seu entorno. Partindo do reservatório, a água é transportada por um canal artificial de 9 km de extensão com destino a irrigação de 2500 ha de fruticultura, enquanto outra parcela recebe tratamento numa estação gerenciada pela Companhia de Águas e Esgotos do Rio Grande do Norte (CAERN) e alimenta 204 km de tubulações da Adutora Sertão Central Cabugi destinada ao abastecimento público. As características hidráulicas e morfométricas da bacia hidrográfica e do reservatório estão apresentadas na tabela 1. E as flutuações mensais na precipitação em um dos municípios mais próximos, no volume de água do reservatório e na insolação encontram-se na figura 6.

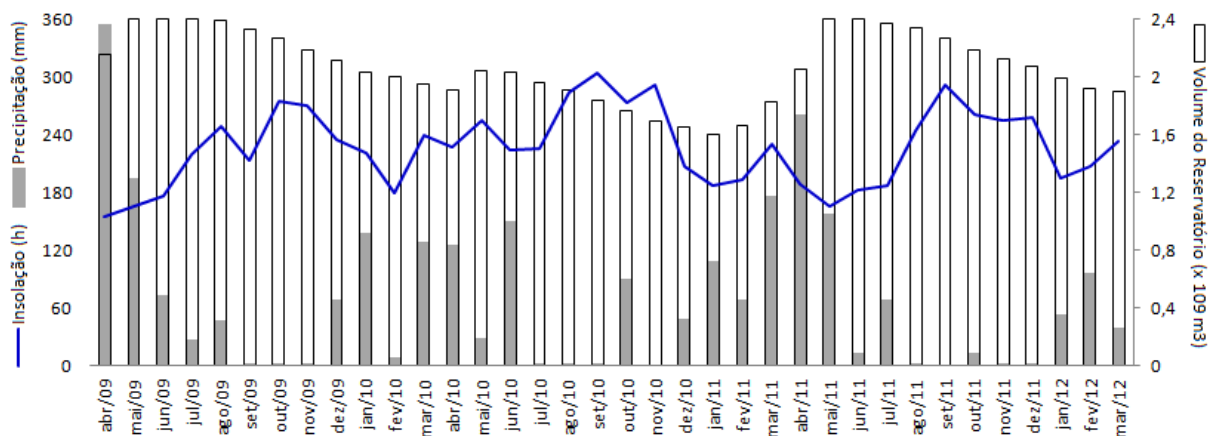


**Figura 5:** Localização dos principais reservatórios do Nordeste e suas capacidades. A seta indica na legenda a Barragem Armando Ribeiro Gonçalves. Fonte: ANA (Agência Nacional das Águas), 2009.

**Tabela 1:** Características hidrológicas e morfométricas da bacia hidrográfica Piancó-Piranhas-Assu e do reservatório Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves.

Bacia hidrográfica	36.770,00 Km <sup>2</sup>
Bacia hidráulica	19.500,00 ha
Nível máximo operacional do reservatório	35,00 m
Vazão máxima dos vertedouros	13.200,00 m <sup>3</sup> /s
Vazão máxima da tomada da água	47,50 m <sup>3</sup> /s
Volume de acumulação até a cota de 55 m	2.400,00 x 10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup>
Volume útil de acumulação entre 35 e 55 m	2.100,00 x 10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup>
Área inundável	19.200,00 ha

Fonte: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS – [www.dnocs.gov.br](http://www.dnocs.gov.br))



**Figura 6:** Volume do reservatório (mínimo de 1,603 e máximo de 2,4 x 10<sup>9</sup> m<sup>3</sup>) (Fonte: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS – [www.dnocs.gov.br](http://www.dnocs.gov.br)), precipitação mensal (de 0,0 a 354,1 mm), e insolação mensal (mínima de 155,3 e máxima de 304,5 h) entre abril de 2009 e março de 2012. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET – [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br))

### 3.3 Amostragem

As coletas de água foram realizadas mensalmente entre abril de 2009 e março/2012, totalizando um período de três anos consecutivos, em um ponto amostral localizado pelas coordenadas geográficas 05°67' S e 36°88' W, escolhido por ser próximo à barragem do reservatório e por apresentar uma profundidade de até 35 m dependendo do nível da água em cada período. Apenas um ponto para amostragem foi determinado devido à dificuldade de se coletar em vários pontos em um mesmo dia e ao custo elevado das análises. Levando em consideração estes aspectos, preferiu-se obter uma quantidade satisfatória de amostras de um único ponto para uma análise temporal significativa. Além disso, Sodr e-Neto e Ara ujo (2008) não encontraram diferenças espaciais de densidade do bacterioplâncton no reservatório.

Amostras de água foram coletadas utilizando-se uma garrafa de Van Dorn (5L) em seis diferentes profundidades. Em cada coleta, uma amostra de água da subsuperfície (0,5 m abaixo da lâmina d'água), uma do fundo (0,5 m acima do sedimento) e quatro das profundidades intermediárias formaram uma amostra integrada com um volume total de 30 litros. Da amostra integrada, alíquotas de volumes variados foram retiradas para as análises específicas e transportadas para o laboratório. As amostras para a contagem de bacterioplâncton e arqueoplâncton foram transportadas no gelo enquanto as amostras para contagem do fitoplâncton seguiram para o laboratório sob temperatura ambiente.



Para as análises moleculares, as amostras foram coletadas diretamente da superfície, em seguida foram filtradas para a retirada dos organismos maiores, e depois foram concentradas em frascos âmbar estéreis de 1 litro, como explicado no item 3.7.

### **3.4 Estimativa de Densidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton**

Amostras de 20 mL para a contagem de células procarióticas foram retiradas da amostra integrada e fixadas com formalina tamponada (concentração final de 2%; pH 7,4). Subamostras de 1 ou 2 mL foram coradas com uma solução de laranja de acridina 0,01% (HOBBIE et. al., 1977) e filtradas em membrana preta de policarbonato (Millipore, GTBP), com 0,2 µm de poro, usando um filtro suporte (Poretics) de 0,45 µm de poro para distribuir as amostras uniformemente. As soluções utilizadas foram previamente filtradas em membrana com poro de 0,2 µm. As membranas de policarbonato foram montadas entre lâmina e lamínula, cobertas com óleo de imersão não-fluorescente e contadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) com aumento de 1250x (espelho dicróico DM500, filtro de excitação BP460-490 e filtro barreira BA520IF). Pelo menos 300 células bacterianas foram contadas por filtro, em 15 a 20 campos microscópicos.

### **3.5 Estimativa de Densidade do Fitoplâncton**

Alíquotas de 300 mL para análise quantitativa e observação das variações temporais do fitoplâncton foram retiradas da amostra integrada e fixadas com lugol acético 1%. A quantificação foi realizada seguindo o método de sedimentação de Utermöhl (1958), utilizando-se um microscópio invertido Olympus IX70. O volume sedimentado variou de 2 a 10 mL, dependendo da densidade da amostra, e o tempo de sedimentação foi de pelo menos 3 h por centímetro de altura da câmara. Cada célula, colônia ou filamento foi considerado como um indivíduo e todos foram enumerados em campos aleatórios, a um coeficiente de confiança de 95% (LUND et al., 1958). Posteriormente, a contagem expressa em indivíduos mL<sup>-1</sup> foi transformada em células mL<sup>-1</sup> de acordo com Chorus e Bartram (1999).

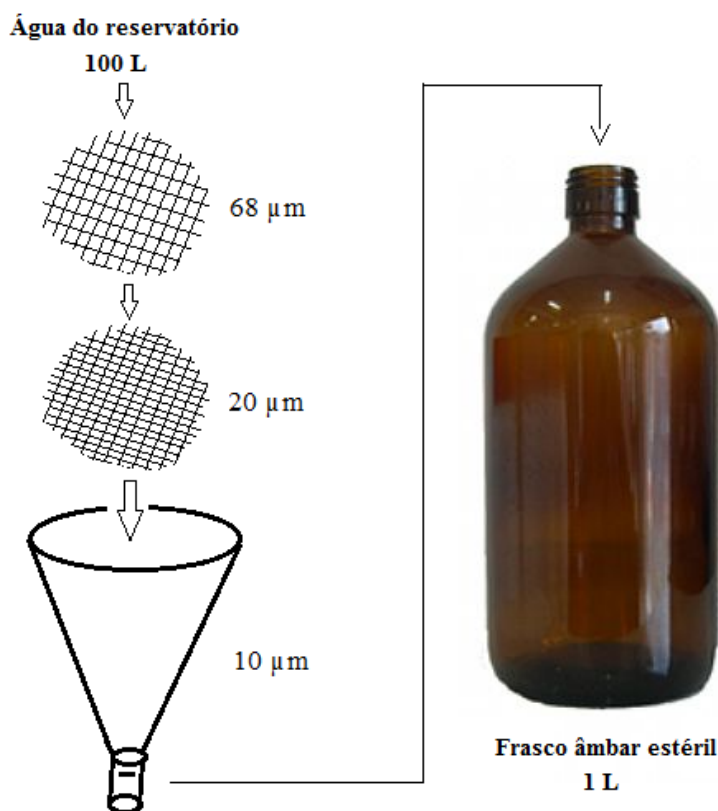
### **3.6 Variáveis limnológicas**

As variáveis limnológicas temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram medidas *in situ*, com uma sonda multiparamétrica YSI 6820 V2. A transparência da água foi medida com um disco de Secchi e as concentrações de fósforo total (TP) foram determinadas utilizando-se o ácido ascórbico após digestão das amostras em persulfato de potássio,

seguindo o método proposto por Valderrama (1981). As leituras foram feitas em espectrofotômetro segundo APHA (1998).

### 3.7 Extração do DNA metagenômico

As amostras de água para a extração de DNA foram filtradas em redes com aberturas de malha de 68  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ , para a retirada dos organismos maiores. As coletas para esse fim foram realizadas nos meses de março, junho, outubro e dezembro de 2010; março, junho, agosto, outubro e dezembro de 2011; e janeiro e março de 2012, de acordo com a disponibilidade de veículo e de material para a extração imediata após a coleta. A determinação dos meses secos e chuvosos foi feita pela ausência total ou presença de eventos de precipitação, respectivamente, detectadas pelo pluviômetro de uma estação bem próxima da barragem do reservatório. Em cada ocasião, um volume total de 100 L de água do reservatório foi filtrado nas redes supracitadas, concentrando-se os volumes acumulados no copo de uma rede com malha de 10  $\mu\text{m}$  (Figura 7). Um frasco âmbar estéril de um litro (1 L) foi utilizado para o armazenamento das alíquotas concentradas. Estas amostras foram devidamente acondicionadas no gelo até a chegada ao laboratório, e processado em até 3 horas após cada coleta.



**Figura 7:** Representação esquemática da coleta das amostras de água para extração do DNA.

A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se o Power Water® DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc. CA) de acordo com as orientações do fabricante (Anexo 2). Um volume de 100 µL de cada amostra (DNA extraído) permaneceu congelado sob uma temperatura de -20°C, do qual as alíquotas para amplificação por PCR foram retiradas. Após a extração, a presença de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com SYBR Green, sob uma tensão de 90 V durante 1 hora. A visualização e a captura das imagens dos géis foram feitas em sistema de fotodocumentação L-Pix Ex, com transiluminador UV-B (302-312 nm) e filtro EPX-15 para géis corados com SYBR Green (Loccus biotecnologia). A quantificação do DNA (ng.µL<sup>-1</sup>) foi realizada por meio de NanoVue™ Plus Spectrophotometer.

### 3.8 PCR/DGGE

As amplificações foram realizadas utilizando-se o kit PCR Master Mix 2X (Promega) contendo *Taq* DNA polymerase (50 unidades mL<sup>-1</sup>), dNTPs (400 µM de cada: dATP; dGTP; dCTP; dTTP), MgCl<sub>2</sub> (3mM) e os tampões de reação (pH 8,5) em concentrações ótimas para uma amplificação eficiente das amostras de DNA. Cada reação continha 12,5 µL de PCR Master Mix, 1 µL do primer *forward* (f), 1 µL do primer *reverse* (r), 40 ng de DNA e água livre de nuclease em quantidade suficiente para completar 25 µL de volume final. Para amplificação de DNA do domínio *Bacteria* foram usados os primers 341f<sup>GC</sup> (primer *forward* com grampo GC) e 907r (primer *reverse*). Os primers 344f<sup>GC</sup> e 958r foram usados para a amplificação de DNA do domínio *Archaea*. As sequências de nucleotídeos dos primers estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sequências de nucleotídeos e grupo alvo dos primers utilizados para PCR/DGGE.

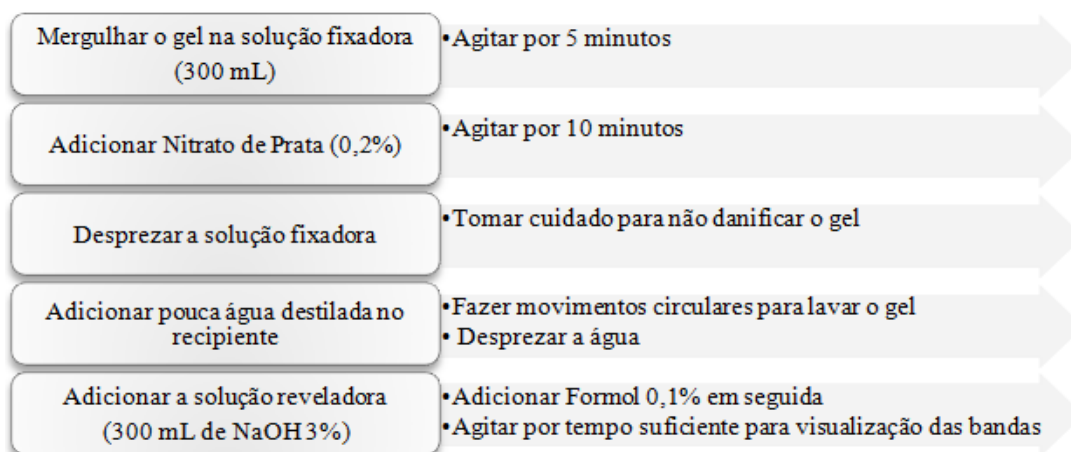
Primer	Sequência (5' – 3')	Grupo alvo	Referências
341f <sup>GC</sup>	CCTACGGGAGGCAGCAG	<i>Bacteria</i>	Muyzer et al. (1993)
907r	CCGTCAATTCCTTTR <sup>1</sup> AGTTT	<i>Bacteria</i>	Muyzer et al. (1993)
344f <sup>GC</sup>	ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA	<i>Archaea</i>	Stahl e Amann (1991)
958r	Y <sup>2</sup> CCGGCGTTGAM <sup>3</sup> TCCAATT	<i>Archaea</i>	DeLong (1992)

<sup>1</sup> Purina (A ou G); <sup>2</sup> Pirimidina (T ou C); <sup>3</sup> Amino (A ou C)

<sup>GC</sup> Contêm a seguinte sequência de 40 bases na extremidade 5' para estabilizar a migração das bandas durante o DGGE: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGGG (MUYZER et al., 1993).

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram realizadas em termociclador Techne TC-512. Cada PCR passou por uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C, com uma extensão adicional de 10 minutos a 72°C no final para que fossem completadas as eventuais polimerizações parciais. As amplificações foram confirmadas em gel de agarose 0,7%, seguindo os procedimentos de visualização descritos no item 3.6 do presente trabalho.

Fragmentos de DNA de 550 e 600 bp (pares de bases), produtos da PCR, foram submetidos à Eletroforese em Gel de com Gradiente de Desnaturação (DGGE). Um volume de 20 µL de cada amostra foi analisado em dois diferentes géis. Soluções de poliacrilamida para gel 6% (GREEN et al., 2009) foram preparadas com 30% de acrilamida/bisacrilamida (29:1), TAE 1 X (Tris Acetato EDTA = Tris 40 mM [pH 8,0], ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM) e H<sub>2</sub>O destilada. Ureia 7 M e formamida 40% vol/vol foram usados na solução 100% desnaturante (OVREÅS et al., 1997; YU E MORRISON, 2004). Um gradiente desnaturante de 15 a 55%, determinado por meio de testes com diferentes gradientes para observação da migração das bandas de DNA, foi formado com o auxílio de um agitador magnético na distribuição das soluções de diferentes concentrações. Os géis de 160 mm de comprimento e 1 mm de espessura foram feitos entre placas de vidro com espaçadores, borracha de vedação e fita adesiva apropriados para DGGE, e imersos em tampão TAE 1 X no equipamento DGGE-1001, 250 VDC/ 30 W/ 80 mA/ 70°C (C.B.S. SCIENTIFIC CO., CA). Antes da aplicação das amostras, cada gel passou por uma pré-corrída durante 1 hora. As eletroforeses ocorreram sob uma temperatura constante de 60°C e tensão de 75 V durante 16 h de corrida (MUYLAERT et al., 2002). Para a revelação e visualização dos géis, seguindo método de coloração pela prata (SANGUINETTI et al., 1994), foram utilizadas uma solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,5%), uma solução de nitrato de prata 0,2% e uma solução reveladora contendo hidróxido de sódio (NaOH) 3% e Formaldeído 0,1%, conforme volumes das soluções, sequência de aplicação e tempos de exposição apresentados na figura 8.



**Figura 8:** Protocolo para revelação de gel de poliacrilamida com nitrato de prata.

### 3.9 Análises dos dados

As imagens dos géis foram analisadas utilizando-se o software LabImage (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Germany), com algumas correções manuais feitas quando necessárias para uma identificação mais precisa das bandas (cada banda corresponde ao conjunto de fragmentos de DNA que têm o mesmo padrão de migração no gel em função dos seus tamanhos similares). Na mesma plataforma foram gerados os eletroferogramas indicando a presença de bandas por meio dos picos dos gráficos. Cada gráfico é referente a cada mês em que foram realizadas as coletas para este tipo de análise. Estes resultados, assim como quantidade de bandas, e a localização e proporção em percentual de cada banda estão apresentados no Anexo 3.

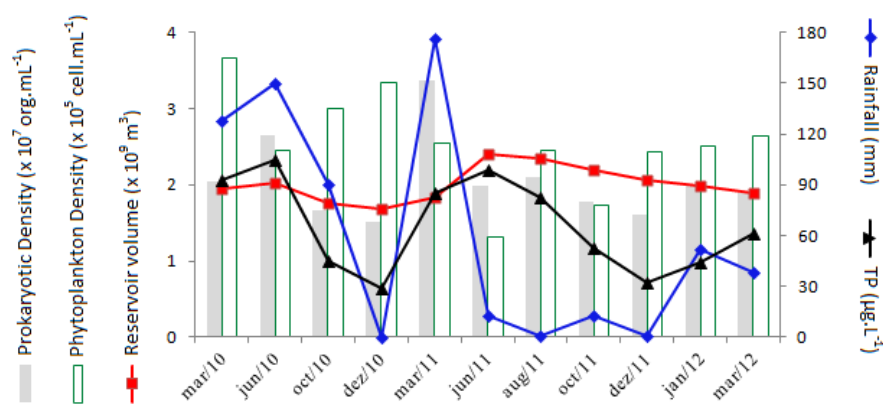
Considerando-se a presença (1) ou ausência (0) de bandas nos géis da DGGE, foram construídas matrizes binárias. As similaridades entre os padrões de bandas dos géis foram quantificadas usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis (BUESING et al., 2009) e os coeficientes de similaridades foram usados para a construção de dendogramas no algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Para revelar as correlações entre os perfis de distribuição das bandas, as densidades de organismos procariotos dos domínios *Archaea* e *Bacteria*, e as variáveis ambientais, incluindo nível do reservatório e pluviosidade, foram desenvolvidas análises de correspondência canônica (CCA).

Análises de componentes principais (PCA) foram realizadas para estimar as correlações entre as variações na densidade das comunidades de bacterioplâncton e arqueoplâncton, as flutuações na densidade do fitoplâncton e as variáveis ambientais. As

construções dos dendogramas, as análises de correlação de Pearson e análises multivariadas foram desenvolvidas no software PAST versão 1.91 (HAMMER et al., 2001).

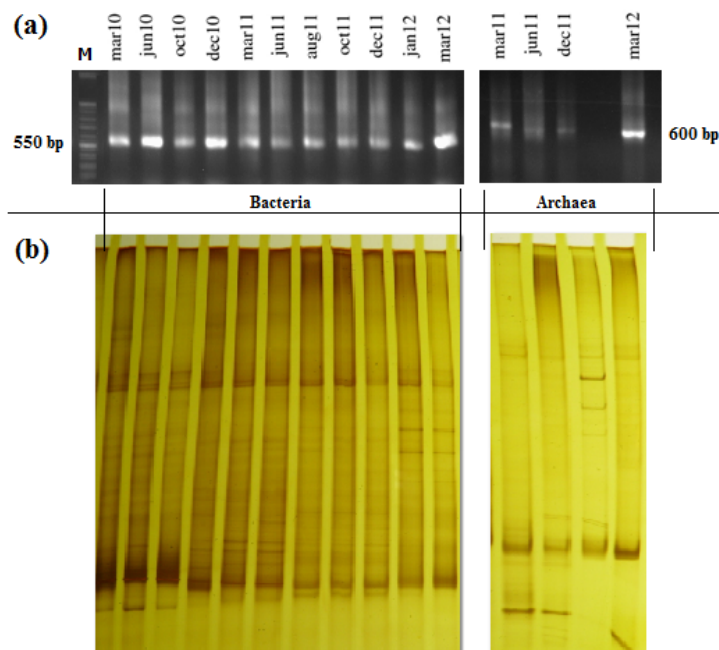
#### 4. RESULTADOS

As densidades médias do bacterioplâncton e arqueoplâncton foram mais elevadas nos períodos chuvosos do que nos períodos secos ( $p = 0,038$ ), assim como as concentrações de TP ( $p = 0,015$ ). Os demais fatores não variaram significativamente nos meses estudados. As flutuações na densidade dos procariotos heterotróficos (bacterioplâncton e arqueoplâncton), densidade do fitoplâncton, volume do reservatório, pluviosidade e TP, no período em que as amostras para as análises moleculares foram coletadas (março/2010 a março/2012), estão representadas na figura 9.



**Figura 9:** Comportamento da densidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (Prokaryotic Density  $\times 10^7$  Org  $\text{mL}^{-1}$ ), do fitoplâncton (Phytoplankton Density ( $\times 10^5$  Cell  $\text{mL}^{-1}$ )) (colunas), e flutuações no Volume do reservatório (Reservoir volume  $\times 10^9 \text{ m}^3$ ), Pluviosidade (Rainfall (mm)) e TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

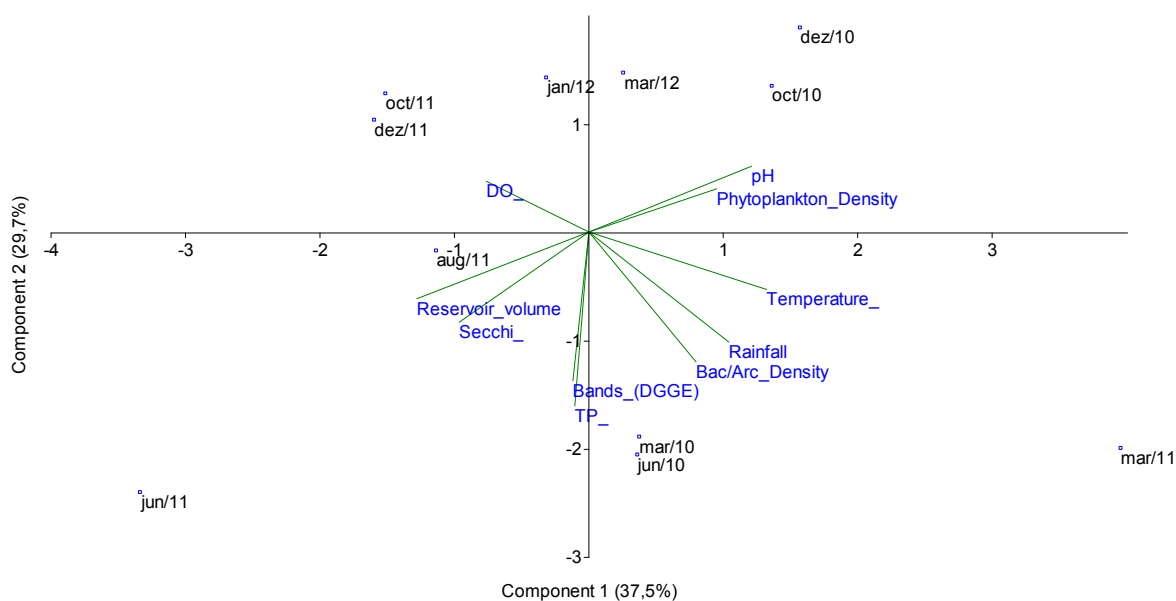
Fragmentos de DNA do gene 16S rRNA foram amplificados com sucesso em todas as amostras com o par de primers GC-341f – 907r (Bacteria), enquanto apenas 4 das 11 amostras foram amplificadas utilizando o par GC-344f – 958r (Archaea) (Figura 10a). Os produtos da PCR foram separados pelo DGGE formando os respectivos perfis de distribuição das bandas presentes na figura 10b. Os géis da DGGE revelaram 71 bandas diferentes, sendo 43 bandas distribuídas entre as onze amostras de Bacteria e 28 entre as quatro amostras de Archaea. Apenas 4 bandas de Bacteria apareceram em apenas um dos meses e 5 bandas ocorreram em todos os meses de coletas. Ocorreram 18 bandas de Archaea em apenas um dos meses, enquanto apenas 3 apareceram nos quatro meses. As demais bandas, 34 de Bacteria e 7 de Archaea foram observadas na maioria dos meses analisados.



**Figura 10:** Resultados dos géis de PCR e DGGE: **(a)** Géis de agarose 0,7% contendo um marcador (**M**) de 100 pb (100bp DNA Ladder Marker – Promega) e os fragmentos de DNA de 550 (Bacteria) e 600 pb (Archaea) resultados da PCR; **(b)** Géis de poliacrilamida 6% com gradiente de desnaturação 15 – 55% indicando as distribuições das bandas de Bacteria e Archaea referentes aos meses de coletas.

Na PCA (Figura 11), o componente 1, relacionado à temperatura da água, explicou 37,5% da variabilidade dos meses estudados e o componente 2, relacionado ao número total de bandas e ao TP, explicou 29,7%. O mês de março/2012 foi menos relacionado à pluviosidade do que março/2010 e março/2011 devido à estiagem prolongada de 2011 para 2012. Observaram-se fortes correlações entre o TP e o número de bandas da DGGE nos meses mais chuvosos, e entre a densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a pluviosidade quando a temperatura da água foi maior. A transparência da água e o volume do reservatório estiveram correlacionados nos meses em que a temperatura da água foi menor. Os resultados da PCA indicam uma provável dominância destes fatores dentre os que influenciaram as comunidades procarióticas planctônicas no reservatório em estudo. Os valores de pH foram mais elevados nos meses mais quentes, assim como a densidade do fitoplâncton, enquanto as concentrações de DO foram maiores sob menores temperaturas e precipitações.

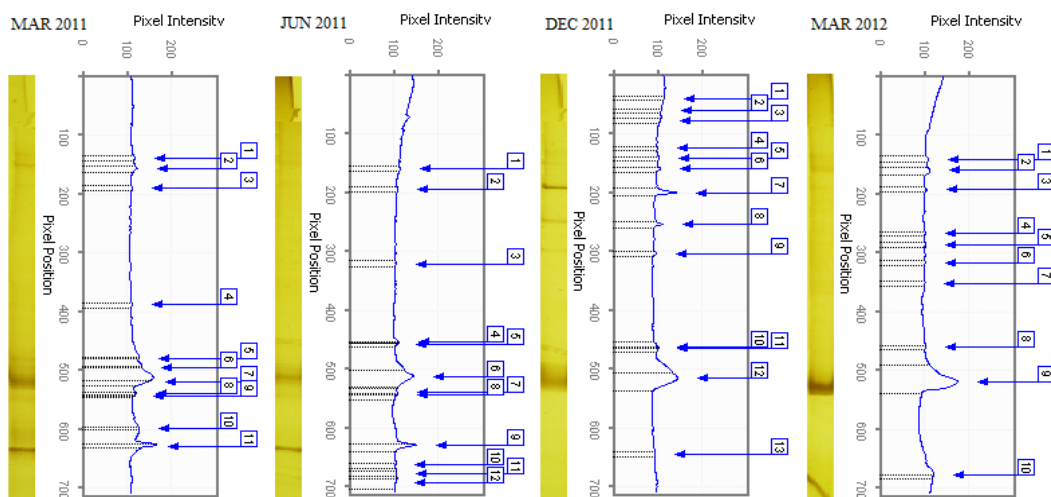




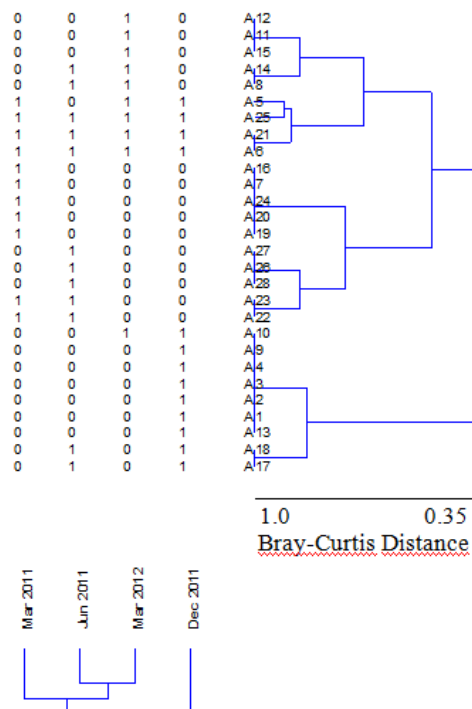
**Figura 11:** Biplot da PCA evidenciando as correlações entre o número de bandas da DGGE, as densidades de microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, e as demais variáveis ambientais estudadas. Os componentes 1 e 2 explicam 67,2% da variação dos conjuntos de dados dos meses de coletas.

Os resultados das análises dos géis da DGGE, expressos na forma de eletroferogramas (Figura 12 e Figura 14), representam a riqueza de bandas de cada amostra coletada. As bandas ocorreram em menor número nos meses de outubro/2010, dezembro/2010, outubro/2011, quando foram registrados os menores valores médios para densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton, concentração de TP e pluviosidade. Por outro lado, nos meses de março/2011 e junho/2011, somando-se os resultados da DGGE de *Bacteria* e *Archaea*, ocorreu a maior riqueza de bandas, quando as densidades dos organismos e as concentrações de TP também foram mais elevadas, e o reservatório atingiu o seu volume máximo em função do volume de chuvas concentrado no período. As similaridades entre as bandas e entre os respectivos meses, representadas na forma de dendrogramas, revelaram predominantemente composições parecidas entre os meses chuvosos e entre os meses de estiagem de cada ano. Na figura 13, os dendrogramas apresentam, de acordo com as distribuições das bandas de *Archaea* (A1 – A28), uma distância maior entre os meses de chuva e o mês de estiagem (dec/2011), e uma similaridade maior entre Jun/2011 e mar/2012, mesmo sendo meses com a presença de chuva em anos diferentes. Isto pode indicar uma sazonalidade na composição e uma forte influência das precipitações sobre as populações dominantes desse domínio. Os dendrogramas da figura 15, baseados nas distribuições das bandas de *Bacteria* (B1 – B43),

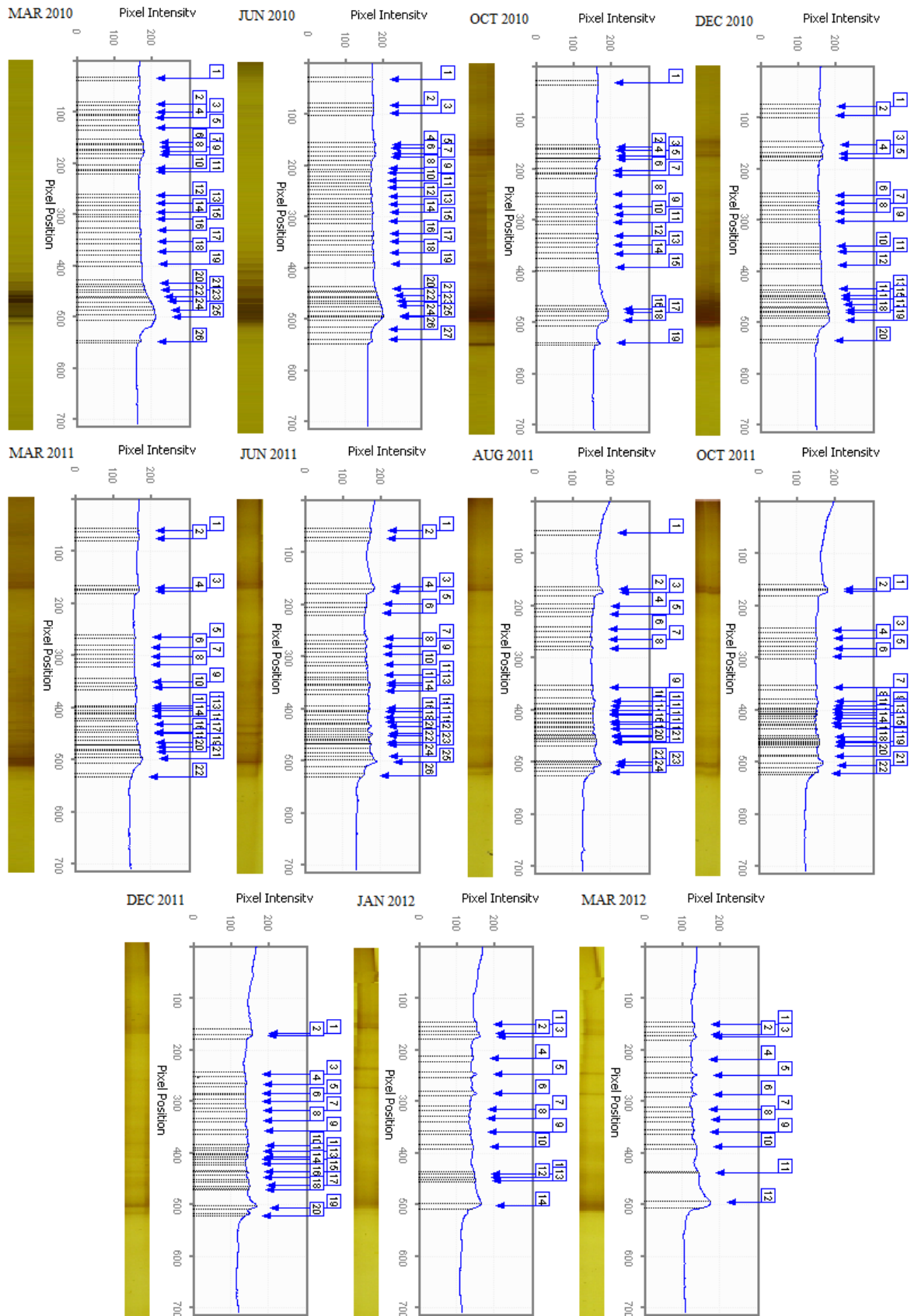
mostram uma maior similaridade entre os meses (distância máxima = 0,45) do que os do domínio *Archaea* (distância máxima = 0,65), e proximidades entre os meses chuvosos e entre os meses de estiagem em um mesmo ano, embora apresentem menores similaridades entre os períodos chuvosos e entre os períodos de estiagem de anos diferentes.



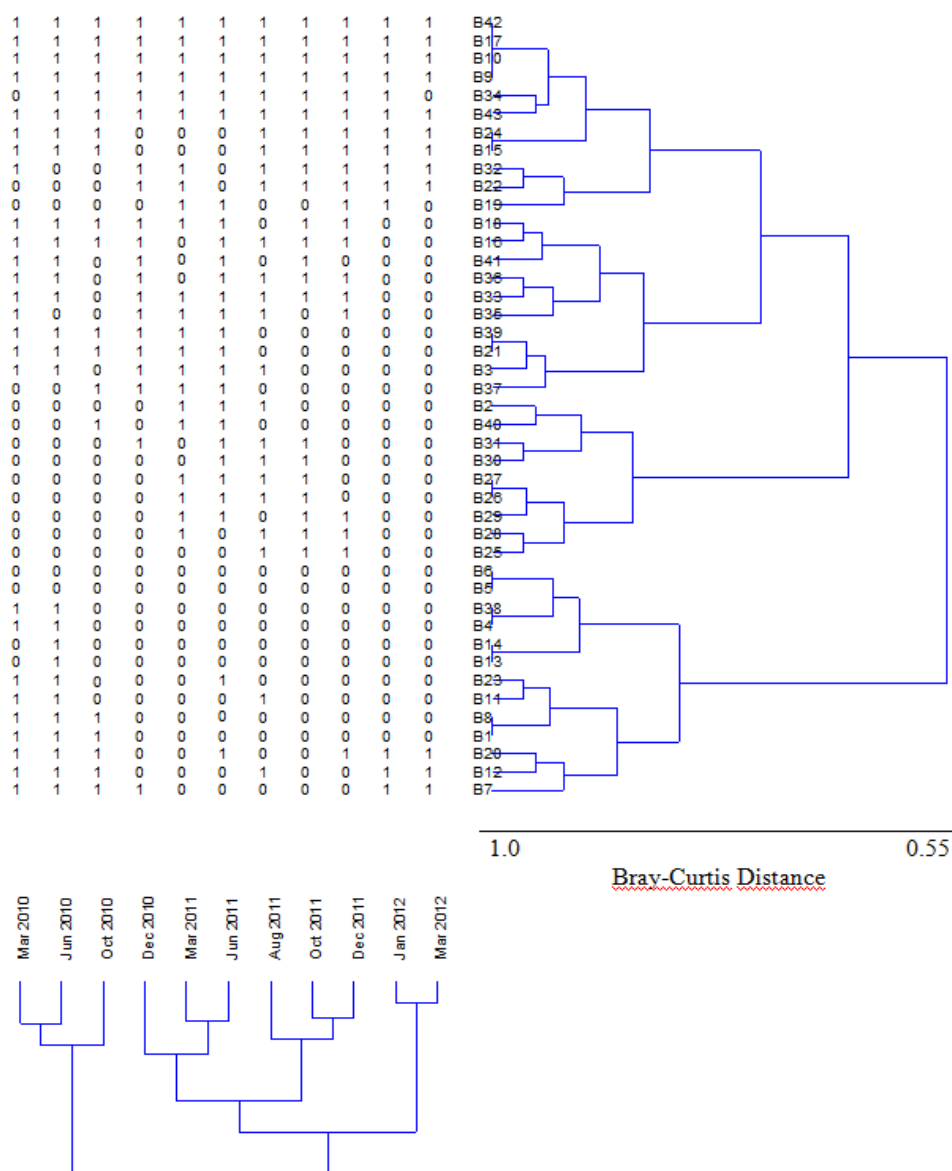
**Figura 12:** Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades das bandas de *Archaea* em cada mês de coleta.



**Figura 13:** Dendrogramas dos padrões de distribuição das 28 bandas de *Archaea* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) das bandas no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.



**Figura 14:** Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades das bandas de *Bacteria* em cada coleta.

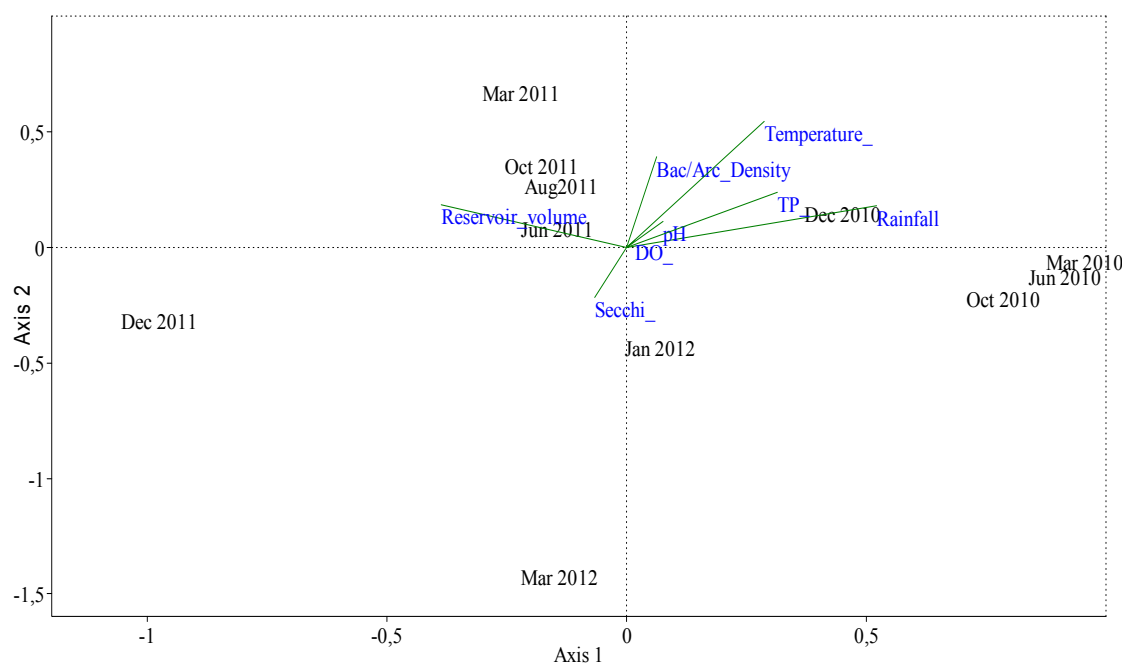


**Figura 15:** Dendrogramas dos padrões de distribuição das 43 bandas de *Bacteria* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) das bandas no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.

A CCA (Figura 16), baseada nos dados da DGGE e das variáveis ambientais, revelou diferenças temporais na composição das comunidades procarióticas mais relacionadas à pluviosidade, ao volume do reservatório, à temperatura e à densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton. Os eixos 1 e 2 apresentaram autovalores elevados em relação aos demais e explicaram 58,5% das variações observadas, sendo o primeiro eixo relacionado positivamente à pluviosidade ( $r = 0,53$ ) e negativamente ao volume do

reservatório ( $r = -0,38$ ), e o segundo, positivamente relacionado à temperatura ( $r = 0,55$ ) e à densidade dos organismos ( $0,39$ ). Os resultados evidenciaram a influência dos fatores ligados aos períodos chuvosos sobre a estrutura da comunidade e explicaram parte dos agrupamentos dos meses mais similares, em relação aos perfis de bandas, mostrados na figura 13.

De todo o conjunto das variáveis estudadas, a pluviosidade influenciou mais na similaridade entre os perfis de distribuição das bandas obtidas nos meses de março/2010, junho/2010 e outubro/2010. Nos meses de agosto/2011, outubro/2011 e dezembro/2011 os perfis foram mais influenciados pelo volume do reservatório. A distância do mês de dezembro/2011 no biplot da CCA é explicada pela presença de bandas de *Archaea* neste mês, além das bandas de *Bacteria*, similares às de agosto e outubro do mesmo ano.



**Figura 16:** CCA evidenciando o padrão de distribuição das bandas da DGGE, indicado pelos meses de amostragem, relacionado às variáveis ambientais Pluviosidade (mm), Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), Densidades do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton ( $\text{Org mL}^{-1}$ ), Volume do Reservatório ( $\times 10^9 \text{ m}^3$ ), pH, DO ( $\text{mg L}^{-1}$ ), Secchi (m) e TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Os períodos de seca e de chuva na região semiárida brasileira influenciam as mudanças nas comunidades aquáticas principalmente quando se trata de microrganismos planctônicos. No presente trabalho as densidades médias do bacterioplâncton e arqueoplâncton, considerando a presença de populações dos domínios *Archaea* e *Bacteria* nesta comunidade procariótica planctônica, ocorreram na ordem de  $10^7$  org mL<sup>-1</sup>, assim como às densidades do bacterioplâncton descritas por Sodré-Neto e Araújo (2008), no mesmo reservatório, e por Araújo e Costa (2007) em outros cinco reservatórios eutróficos da mesma bacia hidrográfica. As abundâncias foram também semelhantes às apresentadas por Bettarel et al. (2006), em sistemas aquáticos tropicais da África.

Em lagos temperados da Espanha e Alpes Su cos, Casamayor et al. (2001) encontraram densidades similares considerando também, assim como no presente trabalho, a presença de *Archaea* no plâncton. Em regiões sem influência do clima semiárido, valores de densidades procarióticas inferiores, na ordem  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, foram descritos com frequência mesmo em ambientes de água doce tropicais (ABE et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; DE WEVER et al., 2005) ou em diferentes latitudes (ZWISLER et al., 2003; NISHIMURA E NAGATA, 2007; NIU et al., 2011).

A abundância do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a riqueza das bandas foram mais influenciadas pelos eventos de precipita o, pela temperatura da água e pela concentra o de TP, sugerindo um aumento nas atividades microbianas com a chegada do TP alóctone pela chuva, sob temperaturas mais elevadas. Outra explica o seria a chegada de TP e de procariotos alóctones da bacia de drenagem, aumentando as respectivas concentra es e densidades nos períodos chuvosos e coincidindo com as temperaturas um pouco mais elevadas nestes períodos, já que a temperatura da água local sofre pouca varia o temporal e parece não influenciar isoladamente a estrutura dessas comunidades no semiárido.

Em outras regiões, a temperatura da água é considerada um fator determinante para mudanças sazonais na estrutura das comunidades procarióticas heterotróficas (CRUMP et al., 2003; LINDSTR M et al., 2005), embora não influencie sozinha as mudanças em curto prazo (MUELLER-SPITZ et al., 2009). As concentra es médias do TP, considerado fator limitante no reservatório caracteristicamente eutrófico em estudo, são frequentemente superiores a  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  (ESKINAZI-SANT'ANNA et al., 2007; SODRÉ-NETO E ARAÚJO, 2008; COSTA et al., 2009). Estes autores também encontraram valores de pH

acima de 8 no reservatório, similares ao pH de outros reservatórios do semiárido (FREIRE et al., 2009; VIEIRA et al., 2009).

As variáveis pH e DO não foram significativamente correlacionadas com a densidade e riqueza do bacterioplâncton e arqueoplâncton. Estes fatores foram menos relevantes ainda em relação à distribuição das bandas nos meses de amostragem, sugerindo uma menor influência destas variáveis sobre a abundância e a estrutura dessas comunidades. Em sistemas com curto tempo de retenção da água, como é o caso dos reservatórios, a estrutura das comunidades é influenciada substancialmente pela entrada de água das áreas de drenagem e pela importação do bacterioplâncton alóctone (LINDSTRÖM, 2001; JARDILIER et al., 2004; YANNARELL E TRIPLETT, 2005). A matéria orgânica introduzida pelo rio também contribui para as mudanças na estrutura das comunidades, além dos processos autóctones como as florações do fitoplâncton (ALLGAIER E GROSSART, 2006; NIU et al., 2011). Em estudo sobre a influência da entrada de água sobre os organismos planctônicos no semiárido espanhol, Angeler et al. (2000) não encontraram correlação significativa entre os eventos de inundação e as bactérias, mas destacaram que o seu crescimento pode ter se dado em função dos nutrientes alóctones associados à entrada de água.

As diferenças entre os perfis de distribuição das bandas da DGGE nos períodos avaliados sugerem uma forte influência dos eventos de precipitação e do volume do reservatório sobre a estrutura das comunidades. Estes primeiros dados sobre a composição de comunidade bacteriana e arqueana em reservatórios do semiárido brasileiro, obtidos por DGGE, revelaram uma riqueza de 71 bandas, sendo 43 de *Bacteria* e 28 de *Archaea*, com diferenças nas distribuições entre os períodos de chuva e de estiagem. Casamayor et al. (2001) e Laque et al. (2010), usando DGGE, também observaram alterações em escala temporal na composição de comunidades de *Archaea* e de *Bacteria*, respectivamente. Não há registros de estudos anteriores sobre a composição da comunidade de *Bacteria* e *Archaea* do plâncton, de forma simultânea, em ecossistemas de água doce de região semiárida. Esta abordagem sugere que a comunidade procariótica planctônica é constituída por populações de microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, logo, propõe-se neste trabalho a sigla BACC (Bacterial and Archaeal Community Composition).

De todas as bandas resultantes da DGGE, o fato de apenas 5 de *Bacteria* e 3 de *Archaea*, aparecerem em todas as análises, aponta para uma possível dominância de poucos grupos de procariotos heterotróficos independentemente das condições ambientais de cada período. Apesar dessa provável dominância, muitos grupos diferentes, sendo eles

representados pelas 34 bandas de *Bacteria* e pelas 7 de *Archaea* presentes na maioria dos meses, indicam uma riqueza de grupos de procariotos com a predominância de microrganismos do domínio *Bacteria* em relação ao domínio *Archaea*.

As 18 bandas de *Archaea* e as 4 de *Bacteria*, presentes apenas nos meses chuvosos, sugerem a entrada de um grupo mais diverso de *Archaea* do que de *Bacteria* do meio externo e a influência da entrada de água da bacia de drenagem na coluna d'água do reservatório sobre a estrutura da comunidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton, compostas por populações permanentes e populações transitórias que coexistem principalmente nos períodos de chuva. Pode-se inferir também uma maior sensibilidade de *Archaea* às variações ambientais pontuais, aumentando e diminuindo as densidades das populações existentes, de acordo com a combinação de fatores em cada momento. A primeira sugestão parece explicar melhor o que acontece em reservatórios, pois nestes sistemas a composição das comunidades é mais influenciada pelo efeito de massa, por meio da entrada de organismos, e menos pelos fatores ambientais locais (LOGUE E LINDSTRÖM, 2008).

Assim como a PCA indicou uma provável influência de um conjunto de variáveis ambientais sobre a densidade e a riqueza de bandas obtidas por meio de DGGE, a CCA também mostrou coinfluências de fatores sobre a maior parte da distribuição das bandas nos meses estudados. De modo geral, os tamanhos das populações microbianas são controlados por fatores como a competição por diferentes substratos, mortalidade pela incidência de radiação UV, lise viral e predação seletiva, dentre outros fatores “top down” e “bottom up” (PERNTHALER E AMANN, 2005). Entretanto, as adaptações ambientais explicam a abundância e a distribuição das assembleias bacterianas em múltiplas escalas de estudo (BARBERÁN E CASAMAYOR, 2010). Apesar de aparecerem correlações lineares entre algumas variáveis limnológicas isoladas, não houve um padrão uniforme de correlação. Isto pode indicar uma adaptação de comunidades específicas a diferentes combinações de variáveis que determinam as condições ambientais em um dado momento.

As análises dos dados permitiram inferir que há dois momentos de estabilidade no conjunto de variáveis limnológicas do reservatório, um quando o volume de água armazenada é menor e outro quando o volume é maior, e que essas estabilidades são quebradas pelos eventos de chuva e pela perda de água, respectivamente. As comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton locais, portanto, parecem ter as suas densidades determinadas pelas condições ambientais de cada período, e as suas composições direcionadas pela entrada de populações transitórias com a chuva.



As mudanças na BACC observadas neste estudo fornecem novas informações sobre as respostas dessas comunidades às variações ambientais em reservatórios do semiárido. Porém, a determinação da importância relativa dos fatores para a estrutura das comunidades em termos de funcionamento dos ecossistemas aquáticos de regiões semiáridas, onde a sazonalidade é regida por estações alternadas de chuva e de seca, é um grande desafio.

A presença de microrganismos do domínio *Archaea* no plâncton e a sua possível interferência nos valores de densidade procariótica, atribuídos até hoje exclusivamente para *Bacteria* nos reservatórios do semiárido, alertam para a necessidade de investigação da atividade desses organismos e da sua contribuição na biomassa planctônica e conseqüentemente na produção secundária dos reservatórios. Outros estudos com abordagens moleculares, incluindo sequenciamento de fragmentos de DNA do gene 16S rRNA, poderão apresentar os taxa predominantes de *Archaea* e *Bacteria* nos diferentes períodos de chuva e estiagem e esclarecer a influência da entrada de água sobre as comunidades aquáticas dos reservatórios.

## 6. CONCLUSÕES

- As variações dos perfis eletroforéticos e das densidades permitiram observar as mudanças na composição da comunidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton;
- A chegada de água da chuva promoveu mudanças significativas na composição da comunidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton com a presença de populações transitórias, enquanto a perda de água nos períodos de estiagem determinou a predominância das populações permanentes;
- Independentemente do mês ou estação do ano, as variações observadas aconteceram entre períodos de chuva e períodos de seca, sendo estes fatores climáticos, portanto, os responsáveis pelas mudanças na estrutura das comunidades procarióticas planctônicas;
- A presença de microrganismos do domínio *Archaea* alerta para a necessidade da consideração deste grupo no plâncton dos reservatórios;
- A ausência de um padrão sazonal na estrutura da comunidade microbiana corrobora outros estudos desenvolvidos em ecossistemas aquáticos do

semiárido, onde a irregularidade dos resultados das pesquisas coincide com a irregularidade temporal das chuvas.

## 7. REFERÊNCIAS

ABE, D. S.; TUNDISI, T. M.; ROCHA, O.; TUNDISI, J. G. Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hidrobiologia*, v. 504, p. 67-76, 2003.

ALLGAIER, M.; GROSSART, H. P. Seasonal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated bacterial communities in four lakes in northeastern Germany. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 45, p. 115-128, 2006.

ALMEIDA, V. L. S. Comunidades planctônicas e qualidade da água em reservatórios tropicais urbanos com diferentes graus de trofia. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2011.

ANGELER, D. G.; ALVAREZ-COBELAS, M.; ROJO, C.; SÁNCHEZ-CARRILLO, S. The significance of water inputs to plankton biomass and trophic relationships in a semi-arid freshwater wetland (central Spain). *Journal of Plankton Research*, v. 22, p. 2075-2093, 2000.

ANA - Agência Nacional de Águas. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil. 1 ed. Brasília. 204p, 2009.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater 20 ed., Washington DC, 1998.

ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, I. A. S. Comunidades microbianas (bacterioplâncton e protozooplâncton) em reservatórios do semi-árido brasileiro. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, p. 422-432, 2007.

ARAÚJO, M. F. F.; GODINHO, M. J. L. Seasonal and spatial distribution of bacterioplankton in a fluvial-lagunar system of a tropical region: density, biomass, cellular volume and morphologic variation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 203-212, 2008.

AUGUET, J. C.; BARBERÁN, A.; CASAMAYOR, E. O. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal*, v. 4, p. 182-190, 2010.

AUGUET, J. C.; CASAMAYOR, E. O. A hotspot for cold Crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environmental Microbiology*, v. 10, p. 1080-1086, 2008.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, p. 541-555, 2003.

BAKKE, I.; SCHRYVER, P. D.; BOON, N.; VADSTEIN, O. PCR-based community structure studies of bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, v. 84, p. 349-351, 2011.

BARBERÁN, A.; CASAMAYOR, E. O. Global phylogenetic community structure and  $\beta$ -diversity patterns in surface bacterioplankton meta communities. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 59, p. 1-10, 2010.

BARBERÁN, A.; FERNÁNDEZ-GUERRA, A.; AUGUET, J. C.; GALAND, P. E.; CASAMAYOR, E. O. Phylogenetic ecology of widespread uncultured clades of the kingdom Euryarchaeota. *Molecular Ecology*, v. 20, p. 1988-1996, 2011.

BARBOSA, J. E. L. Dinâmica do fitoplâncton e condicionantes limnológicos nas escalas de tempo (nictemeral/sazonal) e de espaço (horizontal/espacial) no açude Taperoá II, trópico semi-árido paraibano. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2002.

BELL, T.; NEWMAN, J. A.; SILVERMAN, B. W.; TURNER, S. L.; LILLEY, A. K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature*, v. 436, p. 1157-1160, 2005.

BEM-DOV, E.; SHAPIRO, O. H.; SIBONI, N.; KUSHMARO, A. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S r RNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6902-6906, 2006.

BETTAREL, Y.; BOUVY, M.; DUMONT, C.; SIME-NGANDO, T. Virus-bacterium interactions in water and sediment of west african inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 5274-5282, 2006.

BOUVY, M.; FALCÃO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of *Cylindropermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 23, p. 13-27, 2000.

BUESING, N.; FILIPPINI, M.; BÜRGMANN, H.; GESSNER, M. O. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 69, p. 84-97, 2009.

CÂMARA, F. R. A.; LIMA, A. K. A.; ROCHA, O.; CHELLAPPA, N. T. The role of nutrient dynamics on the phytoplankton biomass (chlorophyll-*a*) of a reservoir-channel continuum in a semi-arid tropical region. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 21, p. 431-439, 2009.

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C.; ALMEIDA, W. I. *Archaea*: Potencial biotecnológico. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30, p. 71-77, 2003.

CARVALHO, P.; THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia*, v. 510, p. 67-74, 2003.

CASAMAYOR, E. O.; SCHÄFER, H.; BAÑERAS, L.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MUYZER, G. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 499-508, 2000.

CASAMAYOR, E. O.; MUYZER, G.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments

studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 25, p. 237-246, 2001.

CHELLAPPA, N. T.; CÂMARA, F. R. A.; ROCHA, O. Phytoplankton community: indicator of water quality in the Armando Ribeiro Gonçalves Reservoir and Pataxó Channel, Rio Grande do Norte, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, p. 241-251, 2009.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic Cyanobacteria in water: a guide to the public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London. 416p, 1999.

COSTA, I. A. S.; ARAÚJO, M. F. F.; CHELLAPPA, N. T. Estudo do fitoplâncton da Barragem Armando Ribeiro Gonçalves, Assu/RN. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 10, p. 67-80, 1998.

COSTA, I. A. S.; AZEVEDO, S. M. F. O.; SENNA, P. A. C.; BERNARDO, R. R.; COSTA, S. M.; CHELLAPPA, N. T. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semi-arid reservoir. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, p. 211-219, 2006.

COSTA, I. A. S.; CUNHA, S. R. S.; PANOSSO, R.; ARAÚJO, M. F. F.; MELO, J. L. S.; SANT'ANNA, E. M. E. Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. *Oecologia Brasiliensis*, v. 13, p. 382-401, 2009.

CRUMP, B. C.; KLING, G. W.; BAHR, M.; HOBBIE, J. E. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 2253-2268, 2003.

DEGNAN, P. H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME Journal*, v. 6, p. 183-194, 2012.

DELONG, E. F. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 89, p. 5685-5689, 1992.

DE WEVER, A.; MUYLEAERT, K.; VAN DER GUCHT, K.; PIRLOT, S.; COCQUYT, C.; DESCY, J. P.; PLISNIER, P. D.; VYVERMAN, W. Bacterial Community Composition in lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 5029-5037, 2005.

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. Brasil. <[www.dnocs.gov.br](http://www.dnocs.gov.br)> Acesso em 20 de fevereiro de 2012.

EILER, A.; BERTILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology*, v. 6, p. 1228-1243, 2004.

ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; MENEZES, R.; COSTA, I. A. S.; PANOSSO, R.; ARAÚJO, M. F. F.; ATTAYDE, J. L. Composição da comunidade zooplanctônica em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, p. 410-421, 2007.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 210-220, 2004.

FREIRE, R. H. F.; CALIJURI, M. C.; SANTAELLA, S. T. Longitudinal patterns and variations in water quality in a reservoir in the semi-arid region of NE Brazil: responses to hydrological and climatic changes. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 21, p. 251-262, 2009.

GIOVANNONI, S. J.; VERGIN, K. L. Seasonality in ocean microbial communities. *Science*, v. 335, p. 671-676, 2012.

GLÖCKNER, F. O.; ZAICHIKOV, E.; BELKOVA, N.; DENISSOVA, L.; PERNTHALER, J.; PERNTHALER, A.; AMANN, R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including a abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 5053-5065, 2000.

GREEN, S. J.; LEIGH, M. B.; NEUFELD, J. D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. Pages 4137-4158 *in*: Timmis KN (Ed) Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds. Springer (Heidelberg, Germany), 2009.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, v. 4, 9pp, 2001.

HOOBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Environmental Microbiology*, v. 33, p. 1225-1228, 1977.

HUMAYOUN, S. B.; BANO, N.; HOLLIBAUGH. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromitic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* v. 69, p. 1030-1042, 2003.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Brasil. < [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br) > Acesso em 02 de agosto de 2012.

JARDILLIER, L.; BASSET, M.; DOMAIZON, I.; BELAN, A.; AMBLARD, C.; RICHARDOT, M.; DEBROAS, D. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 35, p. 259-273, 2004

LAQUE, T.; FARJALLA, V. F.; ROSADO, A. S.; ESTEVES, F. A. Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. *Microbial Ecology*, v. 59, p. 819-829, 2010.

LEE, E. H.; CHO, K. S.; RYU, H. W. Application of quantitative real-time PCR for quantification of *Rhodococcus* sp. EH831 in a polyurethane biofilter. *Jornal of Environmental Biology*, v. 30, p. 155-159, 2009.

LINDSTRÖM, E. S. Investigating influential factors on Bacterioplakton Community Composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microbial Ecology*, v. 42, p. 598-605, 2001.



LINDSTRÖM, E. S.; BERGSTROM, A. K. Community composition of bacterioplankton and cell transport in lakes in two different drainage areas. *Aquatic Sciences*, v. 67, p. 210-219, 2005.

LINDSTRÖM, E. S.; LESKINEN, E. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology*, v. 44, p. 1-9, 2002.

LIU, F. H.; LIN, G. H.; GAO, G.; QIN, B. Q.; ZHANG, J. S.; ZHAO, G. P.; ZHOU, Z. H.; SHEN, J. H. Bacterial and Archaeal assemblages in sediments of a large shallow freshwater lake, Lake Taihu, as revealed by denaturin gradient gel electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, p. 1022-1032, 2009.

LOGUE, J. B.; LINDSTRÖM, E. S. Biogeography of bacterioplankton in inland waters. *Freshwater Reviews*, v. 1, p. 99-114, 2008.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE CREN. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, v. 11, p. 143-170, 1958.

MCCARREN, J.; BECKER, J. W.; REPETA, D. J.; SHI, Y.; YOUNG, C. R.; MALMSTROM, R. R.; CHISHOLM, S. W.; DELONG, E. F. Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 107, p. 16420-16427, 2010.

MONTENEGRO, A. K. A.; TORELLI, J. E. R.; CRISPIM, M. C.; HERNÁNDEZ, M. I. M.; MEDEIROS, A. M. A. Ichthyofauna diversity of Taperoá II reservoir, semi-arid region of Paraíba, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 76, p. 113-120, 2012.

MOURA, N. A.; DANTAS, E. W.; OLIVEIRA, H. S. B.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Vertical and temporal dynamics of cyanobacteria in the Carpina potable water reservoir in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71: 451-459, 2011.

MUELLER-SPITZ, S. R.; GOETZ, G. W.; MCLELLAN, S. L. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 67, p. 511-522, 2009.

MUSHEGIAN, A. A.; PETERSON, C. N.; BAKER, C. C. M.; PRINGLE, A. Bacterial diversity across Individual Lichens. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, p. 4249-4252, 2011.

MUYLAERT, K.; VAN DER GUCHT, K.; VLOEMANS, N.; MEESTER, L. D.; GILLIS, M.; VYVERMAN, W. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 4740-4750, 2002.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 127-141, 1998.

NISHIMURA, Y.; NAGATA, T. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology*, v. 48, p. 231-240, 2007.

NIU, Y.; SHEN, H.; CHEN, J.; XIE, P.; YANG, X.; TAO, M.; MA, Z.; QI, M. Phytoplankton community succession shaping bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. *Water Research*, v. 45, p. 4169-4182, 2011.

OVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromitic lake Sælenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, v. 9, p. 1-55, 1986.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and biosphere. *Science*, v. 276, p. 734-740, 1997.

PERNTHALER, J.; AMANN, R. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, p. 440-461, 2005.

RAES, J.; LETUNIC I; YAMADA, T.; JENSEN, L. J.; BORK, P. Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Molecular Systems Biology*, v. 7, p. 1-9, 2011.

ROY, K. D.; CLEMENT, L.; THAS, O.; WANG, Y.; BOON, N. Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting. *Water Research*, v. 46, p. 907-919, 2012.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS, N. E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 17, p. 914-21, 1994.

SEEWALDT, E.; STACKEBRANDT, E. Partial sequence of 16S ribosomal RNA and the phylogeny of *Prochloron*. *Nature*, v. 295, p. 618-620, 1982.

SEMARH – Secretaria de Estado de Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos. Rio grande do Norte. <[www.semarh.rn.gov.br](http://www.semarh.rn.gov.br)> Acesso em: 22 de julho de 2012.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 67, p. 6-20, 2009.

SODRÉ-NETO, L.; ARAÚJO, M. F. F. Spatial and temporal fluctuations in bacterioplankton and correlated abiotic variables in eutrophic environments of the Brazilian semi-arid region. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 20, p. 325-331, 2008.

STAHL, D. A.; AMANN, R. I. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, p. 205-248, 1991.

STEPANAUKAS, R.; MORAN, M. A.; BERGAMASCHI, B. A.; HOLLIBAUGH, J. T. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 31, p. 85-98, 2003.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

UTERMÖHL, H. Zur vervollkommung der quantitativen phytolankton-methodik. *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, v. 9, p. 1-38, 1958.

VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, v. 10, p. 109-122, 1981.

VIEIRA, A. C. B.; RIBEIRO, L. L.; SANTOS, D. P. N.; CRISPIM, M. C. Correlations between the zooplanktonic community and environmental variables in a reservoir from the Northeastern semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 21, p. 349-358, 2009.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, v. 345, p. 63-65, 1990.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, p. 213-229, 1997.

YANNARELL, A. C.; KENT, A. D.; LAUSTER, G. H.; KRATZ, T. K.; TRIPLETT, E. W. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*, v. 46, p. 391-405, 2003.

YANNARELL, A. C.; TRIPLETT, E. W. Geographic and environmental sources of variations in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 227-239, 2005.

YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 4800-4806, 2004.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied and Microbiological Biotechnology*, v. 70, p. 281-289, 2006.

ZWART, G.; CRUMP, B. C.; AGTERVELD, M. P. K.; 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, p. 141-155, 2002.

ZWISLER, W.; SELJE, N.; SIMON, M. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 31, p. 211-225, 2003.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1

Manuscrito submetido ao periódico Hydrobiologia

Luiz Sodré Neto, Mirna Helena Regali Selegim, Magnólia Fernandes Florêncio de Araújo

## **Is *Archaea* an important component of planktonic heterotrophic prokaryotic community? A case study in a reservoir under tropical semi-arid climate**

Luiz Sodré Neto (Corresponding Author)

Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, CEP 58175-000, Cuité, Brazil.

e-mail: luizsodre@ufcg.edu.br

Mirna Helena Regali Selegim

Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, CEP 13565-905, São

Carlos, Brazil. e-mail: selegim@uol.com.br

Magnólia Fernandes Florêncio de Araújo

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, CEP 59072-

970, Natal, Brazil. e-mail: mag@cb.ufrn.br

**Abstract** Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to elucidate temporal shifts on planktonic heterotrophic prokaryotic community of a eutrophic reservoir in tropical semi-arid region influenced by rainy and drought seasons. Bacterial and archaeal abundance and the DGGE bands richness were influenced by pluviosity, water temperature, and total phosphorus (TP). Principal component analysis (PCA) showed strong correlations among these variables. Canonical correspondence analysis (CCA) evidenced temporal shifts on bacterial and archaeal community composition, associated with the pluviosity, reservoir volume, water temperature, and prokaryotic density. This suggests the predominance of factors associated to precipitation events on microbial community structure, that is probably composed by persistent and transitory populations, including archaeal populations. Considering the environmental variables set, the results indicated two stability moments in reservoir: one, when the reservoir volume is smaller; and another when the reservoir volume is greater. These stabilities are broken by the rain and by the water loss, respectively.

**Key words** Bacterioplankton, Archaeoplankton, DGGE, Multivariate analysis

## Introduction

The majority of biogeochemical processes on the water column are affected by microbial activity (Eiler & Bertilsson, 2004; Pernthaler & Amann, 2005). Thus the knowledge of microbial composition and diversity is of great importance in order to understand their role in these processes (Humayoun et al., 2003; Mushegian et al., 2011).

Among the microbial plankton components of the oceanic and continental pelagic ecosystems, bacteria are very abundant and ecologically important (Jardillier et al., 2004; Lindstrom & Bergstrom, 2005). However, a relatively small number of bacterial groups seem to dominate the freshwater plankton, even in those that differs physical, chemical and biologically (Zwart et al., 2002). Bacterioplankton and Archaeoplankton are widely involved in oxidative reactions of the carbon cycle as well as in the oxidation of the biotic N and S reductive forms (Giovannoni & Vergin, 2012). Considering this aspect, Jacob et al. (2011) used the term 'Prokaryote Net Production' (PNP) in their work. Nevertheless, most of the microorganisms involved in these transformations remain largely uncharacterized due to their complex dynamic in the environment (McCarren et al., 2010; Raes et al., 2011).

Freshwater ecosystems have been revealed as major reservoirs of archaeal diversity (Auguet et al., 2010) and, despite advances in knowledge about prokaryotic diversity and its importance in processes such as nutrient cycling, most microorganisms in natural environments are still non-cultivable and its functional diversity, how they interfere with the environment as well as their community composition changes over longer time scales are poorly known (Torsvik et al., 2002; Yannarell et al., 2003; Bell et al., 2005)

Culture independent techniques such as PCR combined to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) profiles has been widely used on bacterioplankton communities studies from lentic environments (Casamayor et al., 2000; Lindström, 2001; De Wever et al., 2005) to elucidate their spatial and temporal shifts (Yannarell et al., 2003) and to perform quantitative analysis and abundance estimations of species, based on the number and intensity of the amplified fragments (Ovreås et al., 1997). A great advantage of the method is the possibility to process multiple samples simultaneously in a rapid and affordable manner (Green et al., 2009) besides providing a good overview of the differences and similarities of the dominant populations of the microbial communities (Muyzer & Smalla, 1998; Leskinen & Lindstrom, 2002).

Prokaryotic heterotrophic densities are (in the order of  $10^7$ ) typically found in semiarid eutrophic aquatic environments (Bouvy et al., 1998; Araújo & Costa, 2007; Sodr -Neto & Ara -jo, 2008). These



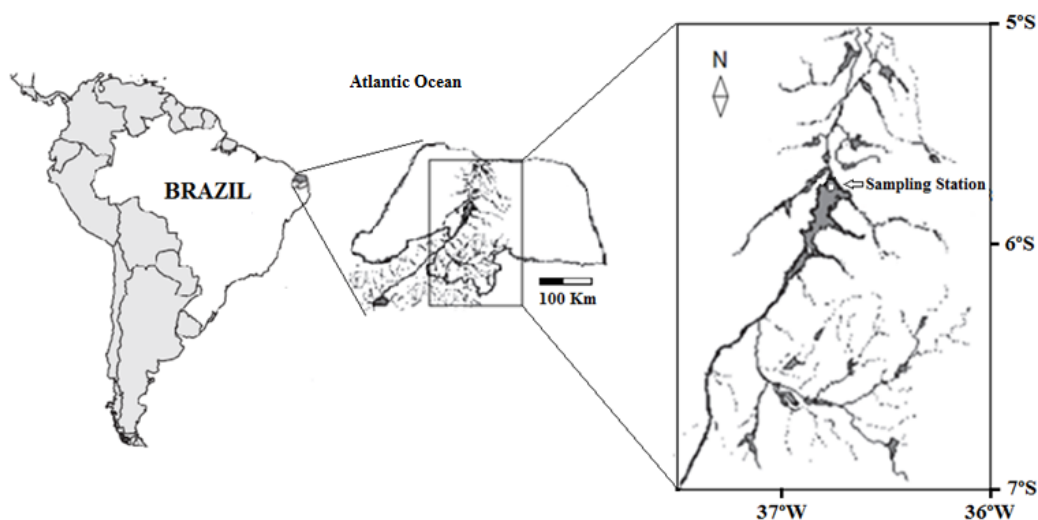
ecosystems are important to water supply, but they also often present cyanobacterial blooms influenced by the high insolation and temperature through the year.

This study was conducted in a tropical reservoir located in the semi-arid region over a period of two years, using molecular techniques such as PCR and DGGE, and multivariate analysis aiming to evaluate the influence of limnological parameters and climatic factors in seasonal patterns and in the high densities of prokaryotic heterotrophic microorganisms (bacterioplankton and archaeoplankton) found in such environments.

## Material and Methods

### Study Area and Sampling

Armando Ribeiro Gonçalves reservoir (05°67' S; 36°88' W) is an important eutrophic environment in Brazilian semi-arid region, and it is destined to multiple uses. The reservoir has a hydraulic basin area of 195 Km<sup>2</sup>, stores 2.4 billions m<sup>3</sup>, and it is responsible for water supply to about 400 thousand people and for irrigation of 2,500 ha of horticulture. The Fig 1 shows the location of reservoir sampling station and the drainage basin.



**Fig 1** Piranhas-Assu River Basin and the sampling station in the Armando Ribeiro Gonçalves reservoir.

A total of 11 samplings were carried out between march/2010 and march/2012, covering rainy and drought periods. Using a Van Dorn bottle (5 L), water samples were collected in six depths, from 0.5 m below the water surface to 0.5 m above the sediment, forming an integrated sample (30 L) of the water column. Subsamples from this integrated sample were used to estimate heterotrophic prokaryotes and

phytoplankton densities, and the total phosphorus (TP) concentrations. Samples for molecular analyzes were collected directly from the water surface, filtered, concentrated and stored under refrigeration. A multiparametric probe (YSU 6820 V2) was used *in situ* to measure the limnological variables like water temperature, dissolved oxygen (DO), and pH. A Secchi disk (30 cm) was used to measure the water transparency. The total phosphorus (TP) concentrations were determined according to Valderrama (1981) and the spectrophotometer readings were taken at specific wavelengths according to APHA (1998). The rainfall and reservoir volume data were provided by the National Institute of Meteorology (INMET) and the National Department of Works Against Droughts (DNOCS), respectively.

### **Bacterioplankton and Archaeoplankton, and Phytoplankton Densities**

Samples (20 mL) for heterotrophic prokaryotic cells counting were fixed with buffered formalin (final concentration 2%; pH 7.4). Subsamples (1 or 2 mL) were stained with acridine orange solution 0.01% (Hobbie et al., 1977) and filtered in a black polycarbonate membrane filter (Millipore®, GTBP; 0.2 µm pore size), using a support filter (Poretics®; 0.45 µm pore size). Filters were mounted in slides using a non-fluorescent immersion oil and counted at 1250 X magnification in an epifluorescence microscope (Olympus BX41; dichroic mirror DM500; excitement filter BP460-490 and barrier filter BA520IF). For each filter, at least 300 bacterial cells were counted in 15 to 20 microscopical fields.

Samples (300 mL) for phytoplankton quantitative analysis were preserved in 1% acetic lugol solution and counted according to Utermöhl (1958), using an inverted Carl Zeiss microscope, at 400 X magnification. Sedimentation time of the samples was three hours for each centimeter of height of the chamber, following the method proposed by Lund et al. (1958).

### **Metagenomic DNA Extraction**

For each sample, a total of 100 L from surface water was filtered using plankton nets (68 µm and 20 µm meshes) for the removal of larger organisms. The concentrated sample was kept in a sterile amber bottle (1 L), on ice, until arrival at the laboratory and processed within 3 hours after collection. The DNA extraction was carried out using the Power Water® DNA Isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc. CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After extraction, the DNA presence was confirmed by electrophoresis on 0.7% agarose gel, stained with SYBR Green. The photodocumentation of gels was made using the system L-

Pix Ex (Loccus Biotechnology), and the DNA quantification ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) was performed using a NanoVue™ Plus Spectrophotometer.

### **PCR/DGGE**

The DNA amplifications were performed using a PCR Master Mix 2X (Promega) containing *Taq* DNA polymerase ( $50 \text{ units mL}^{-1}$ ), dNTPs ( $400 \mu\text{M}$  of each: dATP; dGTP; dCTP; dTTP),  $\text{MgCl}_2$  ( $3\text{mM}$ ) and the reaction buffers (pH 8.5). Each reaction was composed by  $12,5 \mu\text{L}$  of PCR Master Mix,  $1 \mu\text{L}$  of primer (f),  $1 \mu\text{L}$  of primer (r),  $40 \text{ ng}$  of DNA sample and nuclease-free water in sufficient quantity to complete a final volume of  $25 \mu\text{L}$ . Bacterial DNA was amplified using the primer pair GC-341f (CCT ACG GGA GGC AGC AG) and 907r (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) (Muyzer et al., 1993). Archaeal DNA was amplified using the primer pair GC-344f (ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA) (Stahl & Amann, 1991) and 958r (YCC GGC GTT GAM TCC AAT T) (DeLong, 1992). The GC – clamp sequence CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G (Muyzer et al., 1993) was used in DGGE analyses. PCR reactions were performed with an initial denaturation step at  $94^\circ \text{C}$  for 3 minutes, followed by 30 cycles (denaturation at  $94^\circ \text{C}$  for 1 minute, annealing at  $55^\circ \text{C}$ , and extension at  $72^\circ \text{C}$  for 1 minute), with an additional extension at  $72^\circ \text{C}$  for 10 minutes in order to allow complete polymerizations.

The PCR products (DNA fragments  $550 \text{ bp}$  e  $600 \text{ bp}$ ) were subjected to DGGE in 6% polyacrylamide gels (Green et al., 2009), with denaturing gradient 15 – 55%, considering a 100% denaturing solution consisted of 7 M ureia and 40% (vol/vol) formamide (Ovreås et al., 1997; Yu & Morrison, 2004). Gel electrophoresis was performed using a DGGE-1001 (C.B.S. SCIENTIFIC CO., CA, USA), using TAE buffer 1 X (Tris  $40 \text{ mM}$  [pH 8,0], Acetic Acid  $20 \text{ mM}$  and EDTA  $1 \text{ mM}$ ), at  $75 \text{ V}$  and  $60^\circ \text{C}$  during 16 h (Muylaert et al., 2002). Gels were revealed by the silver staining method, proposed by Sanguinetti et al. (1994).

### **Data Analysis**

Correlation and significance tests were performed to analyze environmental variables in rainy and drought seasons, considering significant differences when  $p < 0.05$ . The software LabImage (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Germany) was used to assist the identification of DGGE bands. Binary matrices were constructed considering the presence (1) or absence (0) of bands in DGGE gels. Similarities among band patterns were quantified using Bray-Curtis coefficient (Buesing et al., 2009). Similarity coefficients were

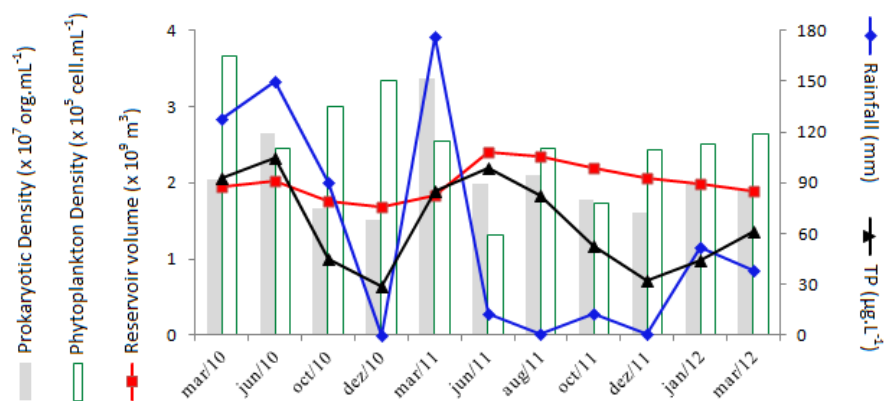
used to construct dendrogramas through UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) clustering algorithm, and Ward method. Principal Components Analysis (PCA) and Canonical Correspondence Analysis (CCA) were carried out to analyze Bacterial and Archaeal community composition during sampling months. Correlations tests, dendrograms constructions, and multivariate analyses were performed using the software PAST 1.91(Hammer et al., 2001).

## Results

Minimum, maximum and mean values of each variable are listed in Table 1. The fluctuations in reservoir volume, rainfall, TP concentrations and prokaryotic heterotrophic (bacterioplankton and archaeoplankton) and phytoplankton densities, are shown in Figure 2. Bacterioplankton and archaeoplankton densities were higher in rainy than in dry periods ( $p = 0.038$ ), as well as the concentrations of TP ( $p = 0.015$ ). The other factors did not changed significantly with the periods.

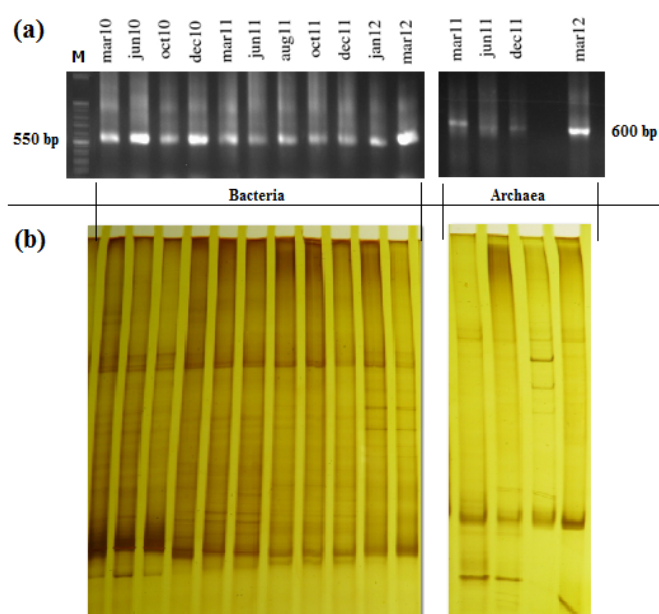
**Table 1** Environmental variables (mean, minimum and maximum values) observed between March/2010 and March/2012

Variables	Media	Minimum – Maximum
Prokaryotic Density ( $10^7$ Org mL <sup>-1</sup> )	2.06	1.52 – 3.38
Phytoplankton Density ( $10^5$ Org mL <sup>-1</sup> )	2.18	1.17 – 5.60
Total Phosphorus ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	66.27	29.00 – 105.00
Water Temperature (°C)	28.86	27.60 – 31.70
pH	8.89	8.00 – 9.64
Dissolved Oxygen ( $\text{mg L}^{-1}$ )	4.99	1.80 – 9.20
Reservoir Volume ( $\times 10^9$ m <sup>3</sup> )	2.01	1.69 – 2.40
Rainfall (mm)	60.1	0 – 176.10
Water Transparency (m)	0.82	0.60 – 1.20



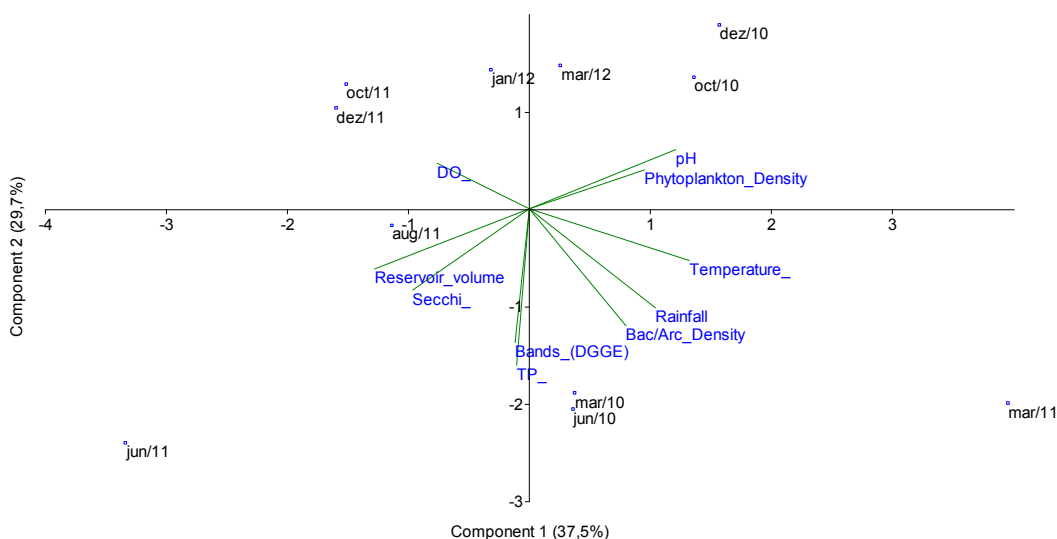
**Fig 2** Bacterioplankton/Arqueoplâncton ( $\times 10^7$  org mL $^{-1}$ ) and phytoplankton ( $\times 10^5$  cells mL $^{-1}$ ) densities; and reservoir volume ( $\times 10^9$  m $^3$ ), rainfall (mm) and TP ( $\mu$ g L $^{-1}$ ) fluctuations during sampling period in Armando Ribeiro Gonçalves reservoir.

DNA fragments of the 16S rRNA gene were successfully amplified for all samples using the primer pair GC-341f - 907r (*Bacteria*), whereas only 4 of 11 samples were successfully amplified using the pair GC-344f - 958r (*Archaea*) (Figure 3a). DGGE gels (Figure 3b) revealed 71 different DNA bands, with 43 distributed among eleven samples of *Bacteria* and 28 among the four samples of *Archaea*. Only 4 bands from *Bacteria* appeared in only one of the months and 5 bands occurred in all months. There were 18 *Archaea* bands in only one of the months, while only three bands appeared in the four months. The other bands, 34 from *Bacteria* and 7 from *Archaea*, were observed in most of the months.



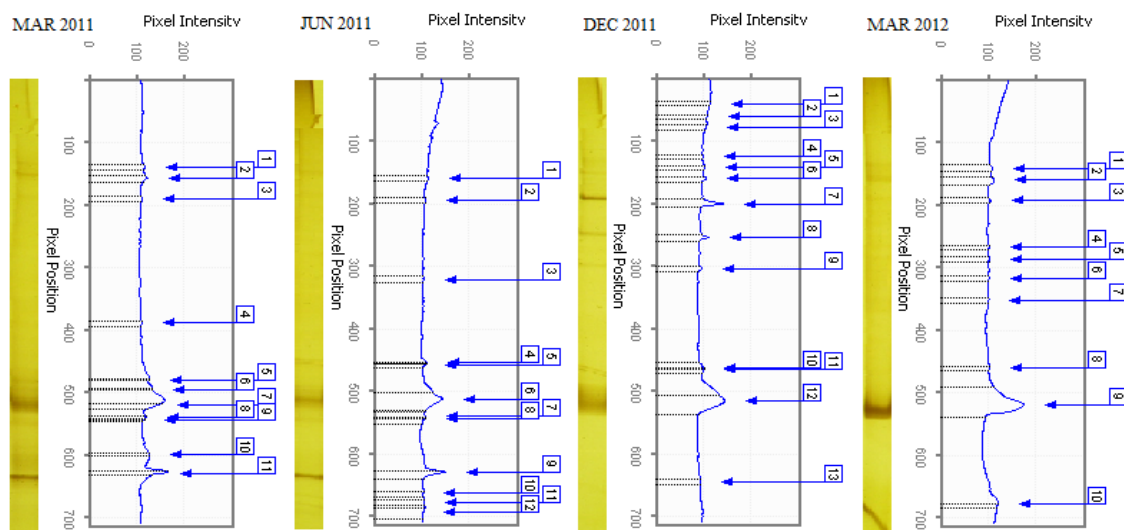
**Figure 3** PCR and DGGE gels: **(a)** 0.7% agarose gels containing a marker (M) of 100 bp (100bp DNA Ladder Marker - Promega) and DNA fragments of 550 bp (*Bacteria*) and 600 bp (*Archaea*); **(b)** 6% polyacrylamide gels with denaturing gradient 15-55% indicating the distributions of *Bacteria* and *Archaea* bands in the sampling period.

PCA results (Fig 4) indicated that the component 1 which was related to the water temperature explained 37.5% of the data variability. Component 2, concerning the total number of bands and TP, explained 29.7%. March/2012 was less related to rainfall than March/2010 and March/2011, probably due to the prolonged drought occurred from 2011 to 2012. There were strong correlations between TP and the number of DGGE bands in rainiest months; among bacterioplankton and archaeoplankton density and rainfall; and among phytoplankton density and pH when the water temperature was higher. Water transparency and reservoir volume were correlated in the months when temperature water was lower. The PCA results indicated a probable dominance of factors linked to rainfall events on bacterial and archaeal community composition in the reservoir. The pH values were higher in the warmer months, while DO concentrations were higher under lower temperatures and precipitation.

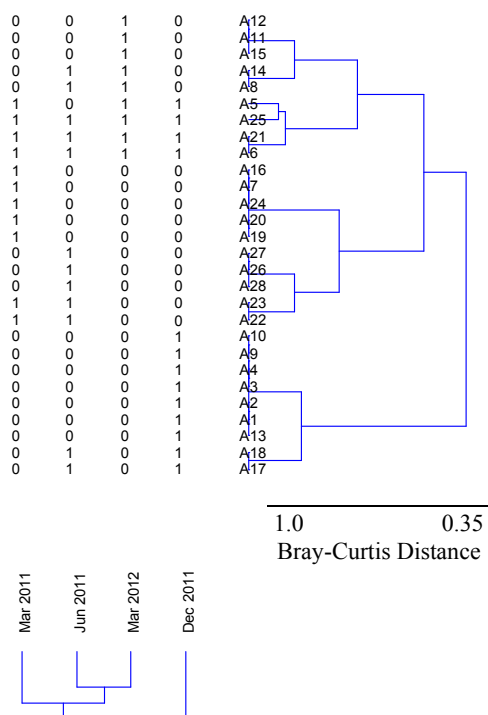


**Fig 4** PCA biplot showing correlations among the number of DGGE bands; bacterioplankton and archaeoplankton density; and the other environmental variables. Components 1 and 2 explain 67,2% of the variation in the data set.

Results of DGGE analysis are shown as electropherograms (Figure 5 and Figure 7), representing the richness of samples. A low number of DNA bands were observed for samples collected in October/2010/2011 and December/2010, months that had the lowest mean values registered for bacterioplankton/ archaeoplankton densities, TP concentration and pluviosity. On the other hand, on March and June/2011, when the maximum water volume in the reservoir was recorded, higher microbial densities and TP concentrations were observed as well as a higher number of *Bacteria* and *Archaea* amplified DNA bands on the DGGE. Dendrograms constructed from DGGE profiles showed DNA bands similarities within the studied months and predominance of some bands according to the rainy or drought periods of each year. In the Figure 6, concerning archaeal DGGE profile and constructed dendrograms, it can be seen major differences between rainy months and the dry month of Dec/2011, and similarities between June (2011) and March (2012). DGGE Bands distributions for bacterial samples (Figure 8) showed greater similarity between months (maximum distance =0.45) when compared to *Archaea* samples (maximum distance=0.65), and similarities between rainy months and between drought months in the same year than those months for different years.

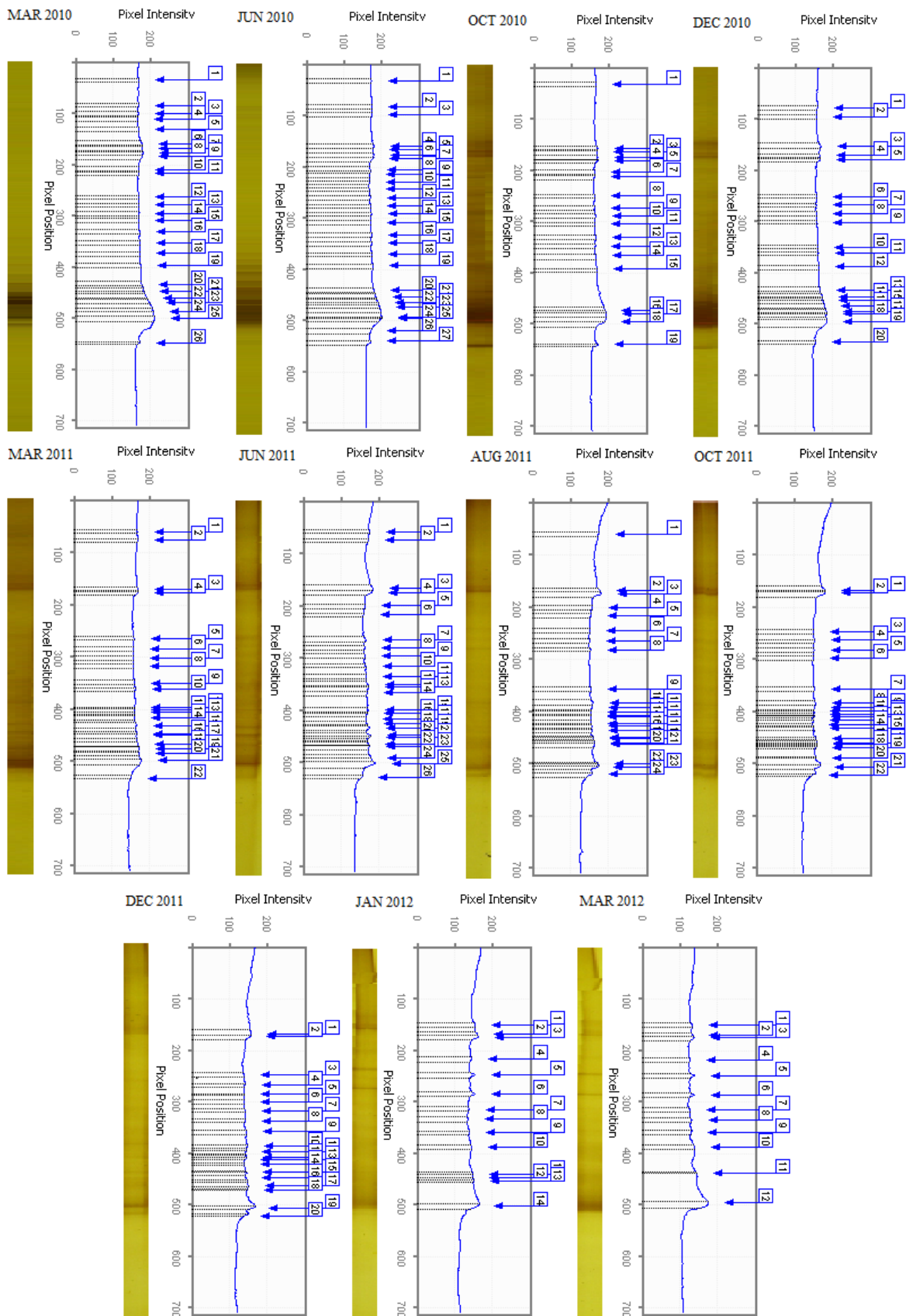


**Fig 5** Electropherograms with pixel intensity related to presence of the *Archaea* DGGE bands.

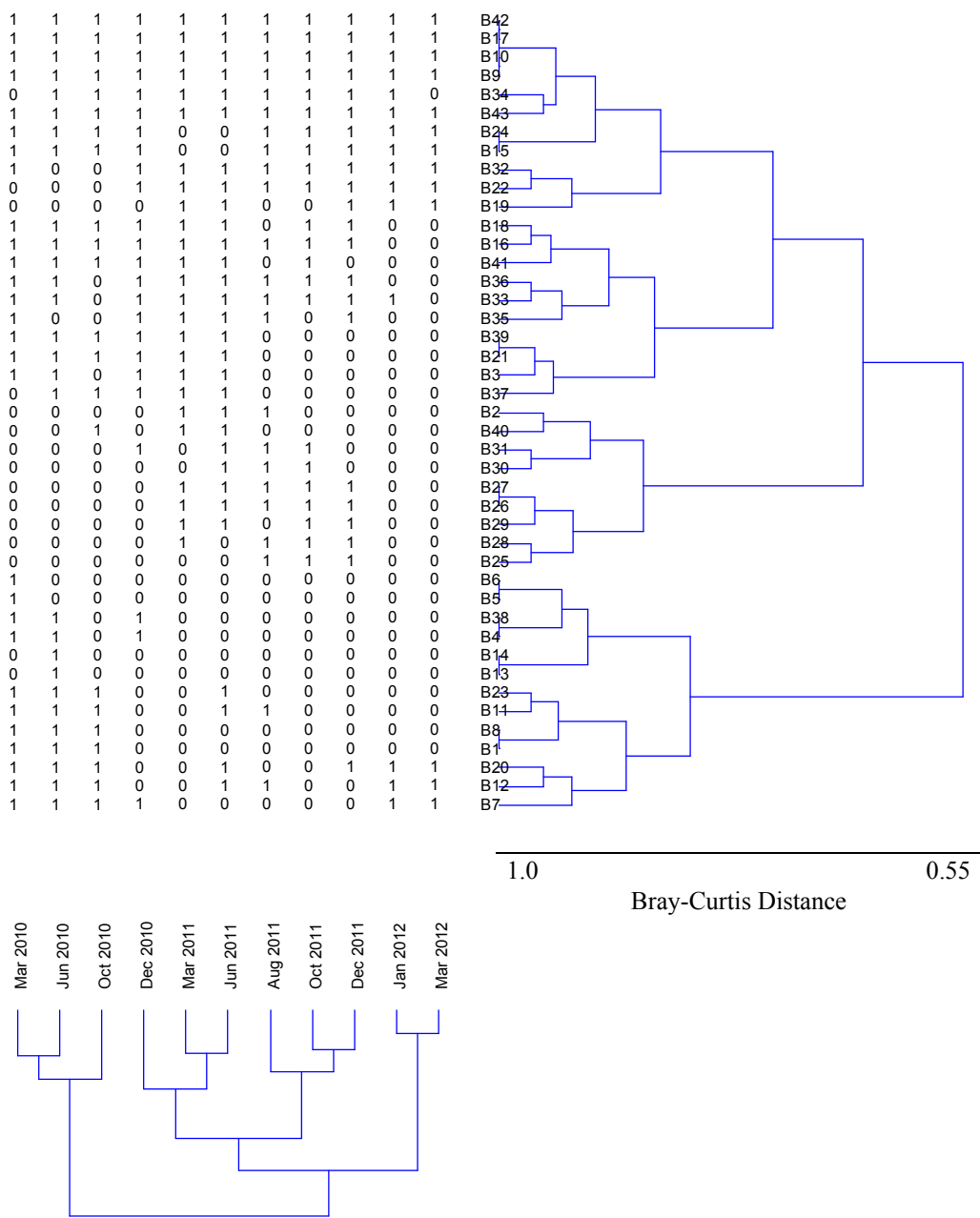


**Fig 6** Dendrograms showing *Archaea* DGGE profile (28 DNA bands). Hierarchical groups were defined based on DNA bands presence (1) or absence (0) at UPGMA algorithm, using Ward method and Bray-Curtis distance.



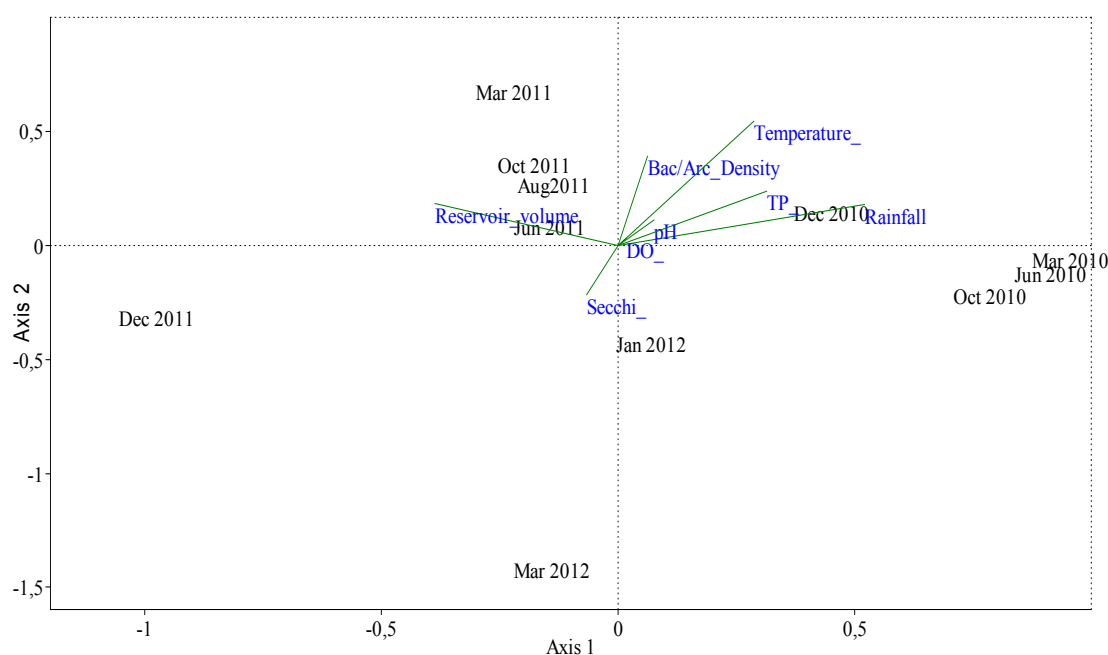


**Fig 7** Electropherograms with pixel intensity related to presence of the *Bacteria* DGGE bands.



**Fig 8** Dendrograms showing *Bacteria* DGGE profile (43 DNA bands). Hierarchical groups were defined based on DNA bands presence (1) or absence (0) at UPGMA algorithm, using Ward method and Bray-Curtis distance.

CCA based on DGGE data and environmental variables revealed temporal differences in the bacterial and archaeal community composition more related to pluviosity, reservoir volume, temperature, and bacterioplankton/archaeoplankton density. Axis 1 and 2 showed greater autovalues, explaining 58.5% of observed variability, being the first positively related to pluviosity ( $r = 0.53$ ) and negatively with reservoir volume ( $r = -0.38$ ), and the second axis showed a positive correlation with temperature ( $r = 0.55$ ) and bacterioplankton and archaeoplankton density ( $r = 0.39$ ). The results indicated factors regarding rainfall periods influencing microbial communities and corroborates with the group relationships found using UPGMA algorithm (Fig 7). Considering all variables in this study, pluviosity influenced more in the DGGE bands profiles similarities obtained for March, June and October/2010. On August, October and December/2011, the profiles were more influenced by the reservoir volume.



**Fig 9** CCA indicating the distribution of the months based on DGGE bands profiles related to the environmental variables: Rainfall(mm), Water Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), Bacterioplankton/Archaeoplankton Density ( $\text{Org mL}^{-1}$ ), Reservoir Volume ( $\times 10^9 \text{ m}^3$ ), pH, DO ( $\text{mg L}^{-1}$ ), Secchi (m), and TP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

## Discussion

Prokaryotic heterotrophic densities in this study, in the order to  $10^7 \text{ org mL}^{-1}$ , were similar to those described by Sodr -Neto & Araújo (2008) in the same reservoir, and the densities described by Araújo & Costa (2007) in other five eutrophic reservoirs of the same drainage basin. The abundances were also similar

to those presented by Bettarel et al. (2006) in African tropical aquatic systems. In temperate lakes of Spain and Swiss Alps, Casamayor et al. (2001) found similar densities also considering, as in the present study, the presence of *Archaea* in plankton. Lower densities (in the order to  $10^6$  org mL<sup>-1</sup>) have been described frequently in freshwater even in tropical environments (Abe et al., 2003; Carvalho et al., 2003; De Wever et al., 2005) or in other latitudes (Zwisler et al., 2003; Nishimura & Nagata, 2007; Niu et al., 2011), all in regions without influence of the semi-arid climate.

Bacterial/Archaeal abundances and DNA bands richness were strongly influenced by rainfall, water temperature and TP concentration indicating a probably higher microbial activity with the inlet of allochthonous TP, under higher temperatures. Another explanation would be the inlet of allochthonous TP and prokaryotes from the drainage basin, increasing their concentrations and densities in the rainy seasons, and coinciding with slightly temperatures higher in these periods. So, the water temperature suffers little temporal variation and seems do not influence alone the microbial community structure in semi-arid. In other regions, the water temperature is considered a determining factor for seasonal changes in the structure of prokaryotic heterotrophic communities (Crump et al., 2003; Lindström et al., 2005), although alone does not influences short-term changes (Mueller-Spitz et al., 2009). TP concentrations, considered a limiting factor in the characteristically eutrophic reservoir under study, are often above 60 µg L<sup>-1</sup> (Eskinazi-Sant'Anna et al., 2007; Sodr -Neto & Araújo, 2008; Costa et al., 2009). These authors also found pH values above 8 in reservoir, similar to those found in other semi-arid reservoirs (Freire et al., 2009; Vieira et al., 2009). Values of pH and DO were neither correlated significantly to the bacterioplankton/archaeoplankton density nor to the DNA bands richness.

In systems with short water retention time, such as reservoirs, community structure is influenced substantially by the water entering from the drainage areas and the import of allochthonous bacterioplankton (Lindström, 2001; Jardilier et al., 2004; Yannarell & Triplett, 2005). The organic matter introduced by river also contributes to make changes in community structure, as well as in indigenous processes like phytoplanktonic blooms (Allgaier & Grossart, 2006; Niu et al., 2011). In a study about the influence of the water entrance on planktonic organisms conducted in a Spanish semi-arid system, Angeler et al. (2000) found no significant correlation between flood events and bacterial density, but affirmed that its increasing was due to the allochthonous nutrients associated with water entrance from the catchment area.

Differences obtained among DGGE bands profiles suggested a great influence of the precipitation events and the reservoir volume on prokaryotic community structure. DGGE data of bacterial and archaeal

community composition in reservoirs of Brazilian semi-arid revealed a richness of 71 DNA bands, 43 of *Bacteria* and 28 of *Archaea*, with different profiles among rainy and drought periods. Casamayor et al. (2001) in temperate region, and Laque et al. (2010) in tropical lagoons, using DGGE, also observed changes in temporal scale in the composition of communities of *Archaea* and *Bacteria*, respectively. There are no records of previous studies on the community composition of planktonic *Bacteria* and *Archaea*, simultaneously, in freshwater ecosystems in semi-arid region. This approach suggests that planktonic heterotrophic prokaryotic community in freshwater ecosystems consists of microbial populations of *Bacteria* and *Archaea* domains, so it is proposed in this work the acronym BACC (Bacterial and Archaeal Community Composition).

From all DGGE bands, only 5 of *Bacteria* and 3 of *Archaea*, were observed in all samples, indicating a dominance of a few groups of heterotrophic prokaryotes regardless of the environmental conditions of each period. 34 DGGE bands of *Bacteria* and 7 of *Archaea* were observed in most of months, indicating the predominance of bacterial populations. On the other hand, the 18 bands of *Archaea* and 4 of *Bacteria* observed in rainy months indicated the inlet of a more diverse group of *Archaea* than *Bacteria* from the external environment. This suggests the influence of the water from the drainage basin on bacterioplankton and archaeoplankton community, that is composed by permanent and transitory populations that coexist in rainy periods. Moreover, it can be inferred that archaeal populations are more sensitive to punctual environmental changes once they increase and decrease according to a combination of factors in each time. The first suggestion seems to explain better what happens in reservoirs because in these systems the community composition is more influenced by the mass effect, by the input of organisms, and less by the environmental local factors (Logue & Lindström, 2008).

PCA (Fig 4) and CCA (Fig 9) indicated a probable influence of a set of environmental variables on prokaryotic heterotrophic density and DNA bands richness. In general, the size of microbial populations are controlled by factors such as competition for different substrates, mortality by UV radiation, viral lysis and selective predation, among other factors as 'top down' and 'bottom up' ones (Pernthaler & Amann, 2005). However, environmental adaptations explain the abundance and distribution of bacterial groups at multiple scales of study (Barberán & Casamayor, 2010). Although linear correlations appear between some limnological variables, there was no uniform pattern of correlation. This may indicate an adaptation of specific communities to different combinations of variables that determine the environmental conditions at a given time.

Data analysis indicated two stability moments in the reservoir: one moment when the reservoir volume is smaller; and another when the reservoir volume is greater. These stabilities were broken by the rain and by the water loss, respectively. Local bacterioplankton and archaeoplankton community, thus, seem to have their densities determined by the environmental conditions of each period, and their compositions influenced by the input of transient populations by the rain. The changes in BACC observed in this study provide new information on the responses of these communities to environmental variations in reservoirs under tropical semi-arid climate. However, determining the relative importance of each factor for community structure in aquatic ecosystems functioning at semiarid regions, where seasonality is governed by alternation of dry and rainy periods, is a great challenge

The important presence of microorganisms from the *Archaea* domain in plankton and its possible interference in prokaryotic density values attributed, until today, exclusively for *Bacteria* in the semi-arid reservoirs, highlight the need to investigate the activity of these organisms and their contribution in planktonic biomass, and consequently the secondary production in reservoirs. Other studies using molecular approaches, including DNA sequencing, may show the prevailing *Archaea* and *Bacteria* taxa in different rainy and drought periods and clarify the influence of water input on aquatic communities of these reservoirs.

### **Acknowledgements**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support, and the colleagues Maria Beatriz Mesquita, Bruno Gomes, Carlos Blaha, Paulo Marinho, Silvia Batistuzzo, Lucymara Fassarela, and Rosely Meissner for access to the equipments and help in molecular analyses.

## References

Abe, D. S., T. M. Tundisi, O. Rocha & J. G. Tundisi, 2003. Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hydrobiologia* 504: 67-76.

Allgaier, M. & H. P. Grossart, 2006. Seasonal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated bacterial communities in four lakes in northeastern Germany. *Aquatic Microbial Ecology* 45: 115-128.

Angeler, D. G., M. Alvarez-Cobelas, C. Rojo & S. Sánchez-Carrillo, 2000. The significance of water inputs to plankton biomass and trophic relationships in a semi-arid freshwater wetland (central Spain). *Journal of Plankton Research* 22: 2075-2093.

APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater 20 ed. American Public Health Association, Washington DC.

Araújo, M. F. F. & I. A. S. Costa, 2007. Comunidades microbianas (bacterioplâncton e protozooplâncton) em reservatórios do semi-árido brasileiro. *Oecologia Brasiliensis* 11: 422-432.

Auguet, J. C., A. Barberán & E. O. Casamayor, 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal* 4: 182-190.

Barberán, A. & E. O. Casamayor, 2010. Global phylogenetic community structure and  $\beta$ -diversity patterns in surface bacterioplankton meta communities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.

Bell, T., J. A. Newman, B. W. Silverman, S. L. Turner & A. K. Lilley, 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436: 1157-1160.

Bettarel, Y., M. Bouvy, C. Dumont & T. Sime-Ngando, 2006. Virus-bacterium interactions in water and sediment of west african inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5274-5282.

Bouvy, M., L. M. Barros-França & J. P. Carmouze, 1998. Compartimento microbiano no meio pelágico de 7 açudes do estado de Pernambuco. *Acta Limnologica Brasiliensia* 10: 93-101.

Buesing, N., M. Filippini, H. Bürgmann & M. O. Gessner, 2009. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology* 69: 84-97.

Carvalho, P., S. M. Thomaz, L. M. Bini, 2003. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia* 510: 67-74.

Casamayor, E. O., H. Schäfer, L. Bañeras, C. Pedrós-Alió & G. Muyzer, 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 499-508.

Casamayor, E. O., G. Muyzer & C. Pedrós-Alió, 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microbial Ecology* 25: 237-246.

Costa, I. A. S., S. R. S. Cunha, R. Panosso, M. F. F. Araújo, J. L. S. Melo & E. M. E. Sant'Anna, 2009. Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. *Oecologia Brasiliensis* 13: 382-401.

Crump, B. C., G. W. Kling, M. Bahr & J. E. Hobbie, 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2253-2268.

DeLong, E. F., 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 5685-5689.



De Wever, A., K. Muylaert, K. Van der Gucht, S. Pirlot, C. Cocquyt, J. P. Descy, P. D. Plisnier & W. Vyverman, 2005. Bacterial Community Composition in lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5029-5037.

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. Brasil. <[www.dnocs.gov.br](http://www.dnocs.gov.br)> Acesso em 20 de fevereiro de 2012.

Eiler, A. & S. Bertilsson, 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* 6: 1228-1243.

Eskinazi-Sant'Anna, E. M., R. Menezes, I. A. S. Costa, R. Panosso, M. F. F. Araújo & J. L. Attayde, 2007. Composição da comunidade zooplancônica em reservatórios eutróficos do semiárido do Rio Grande do Norte. *Oecologia Brasiliensis* 11: 410-421.

Freire, R. H. F., M. C. Calijuri & S. T. Santaella, 2009. Longitudinal patterns and variations in water quality in a reservoir in the semi-arid region of NE Brazil: responses to hydrological and climatic changes. *Acta Limnologica Brasiliensia* 21: 251-262.

Giovannoni, S. J. & K. L. Vergin, 2012. Seasonality in ocean microbial communities. *Science* 335: 671-676.

Green, S. J., M. B. Leigh & J. D. Neufeld, 2009. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. Pages 4137-4158 in: Timmis KN (Ed) *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*. Springer (Heidelberg, Germany).

Hammer, Ø., D. A. T. Harper & P. D. Ryan, 2001. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 9pp.

Hoobie, J. E., R. J. Daley & S. Jasper, 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Environmental Microbiology* 33: 1225-1228.

Humayoun, S. B., N. Bano & J. T. Hollibaugh, 2003. Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromitic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1030-1042.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Brasil. < [www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br) > Acesso em 02 de agosto de 2012.

Jacob, B., G. Daneri, R. A. Quiñones & M. Sobarzo, 2011. Community metabolism, phytoplankton size structure and heterotrophic prokaryote production in a highly productive upwelling zone off northern Chile. *Marine Ecology Progress Series* 430: 23-34.

Jardillier, L., M. Basset, I. Domaizon, A. Belan, C. Amblard, M. Richardot & D. Debroas, 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquatic Microbial Ecology* 35: 259-273.

Laque, T., V. F. Farjalla, A. S. Rosado & F. A. Esteves, 2010. Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. *Microbial Ecology* 59: 819-829.

Lindström, E. S., 2001. Investigating influential factors on Bacterioplankton Community Composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microbial Ecology* 42: 598-605.

Lindström, E. S., M. P. K. V. Agterveld & G. Zwart, 2005. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8201-8206.

Lindström, E. S. & A. K. Bergstrom, 2005. Community composition of bacterioplankton and cell transport in lakes in two different drainage areas. *Aquatic Sciences* 67: 210-219.

Lindström, E. S. & E. Leskinen, 2002. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology* 44: 1-9.

- Logue, J.B. & E. S. Lindström, 2008. Biogeography of bacterioplankton in inland waters. *Freshwater Reviews* 1: 99-114.
- McCarren, J., J. W. Becker, D. J. Repeta, Y. Shi, C. R. Young, R. R. Malmstrom, S. W. Chisholm & E. F. DeLong, 2010. Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 107: 16420-16427.
- Mueller-Spitz, S. R., G. W. Goetz & S. L. McLellan, 2009. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 511-522.
- Mushegian, A. A., C. N. Peterson, C. C. M. Baker & A. Pringle, 2011. Bacterial diversity across Individual Lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4249-4252.
- Muylaert, K., K. Van der Gucht, N. Vloemans, L. D. Meester, M. Gillis & W. Vyverman, 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4740-4750.
- Muyzer, G., E. C. De Waal & A. G. Uitterlinden, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G. & K. Smalla, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nishimura, Y. & T. Nagata, 2007. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology* 48: 231-240.

Ovreås, L., L. Forney, F. L. Daae & V. Torsvik, 1997. Distribution of bacterioplankton in meromitic lake Sælenvannet, as determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3367-3373.

Niu, Y., H. Shen, J. Chen, P. Xie, X. Yang, M. Tao, Z. Ma & M. Qi, 2011. Phytoplankton community succession shaping bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. *Water Research* 45: 4169-4182.

Pernthaler, J. & R. Amann, 2005. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 440-461.

Raes, J., I. Letunic, T. Yamada, L. J. Jensen & P. Bork, 2011. Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. *Molecular Systems Biology* 7: 1-9.

Sanguinetti, C. J., N. E. Dias & A. J. Simpson, 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 914-21.

Sodré-Neto, L. & M. F. F. Araújo, 2008. Spatial and temporal fluctuations in bacterioplankton and correlated abiotic variables in eutrophic environments of the Brazilian semi-arid region. *Acta Limnologica Brasiliensia* 20: 325-331.

Stahl, D. A. & R. I. Amann, 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York, 205-248.

Torsvik, V., L. Øvreås & T. F. Thingstad, 2002. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.

Valderrama, J. C., 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122.

Vieira, A. C. B., L. L. Ribeiro, D. P. N. Santos & M. C. Crispim, 2009. Correlations between the zooplanktonic community and environmental variables in a reservoir from the Northeastern semi-arid. *Acta Limnologica Brasiliensia* 21: 349-358.

Yannarell, A. C., A. D. Kent, G. H. Lauster, T. K. Kratz & E. W. Triplett, 2003. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology* 46: 391-405.

Yannarell, A. C. & E. W. Triplett, 2005. Geographic and environmental sources of variations in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 227-239.

Yu, Z. & M. Morrison, 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4800-4806.

Zwart, G., B. C. Crump, M. P. K. Agterveld, F. Hagen & S. K. Han, 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 141-155.

Zwisler, W., N. Selje & M. Simon, 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* 31: 211-225.

## **ANEXO 2**

### **PowerWater® DNA Isolation Kit**

(For isolation of genomic DNA from membrane filtered water samples)

#### **Introduction**

The PowerWater® DNA Isolation Kit can isolate genomic DNA from a variety of filtered water samples. Utilizing our patented Inhibitor Removal Technology® (IRT), even water containing heavy amounts of contaminants can be processed to provide DNA of high quality and yield. The kit can isolate DNA equally as well from any commonly used filter membrane type. This kit differs from our UltraClean® Water DNA Isolation Kit by the addition of a novel bead tube with an optimized bead mix, a reformulated lysis buffer, IRT technology, and the reduction in sample volume so that nearly all processing occurs in a microcentrifuge. Purified DNA is ready to use in a final 100 µl elution volume.

#### **Protocol Overview**

The PowerWater® DNA Isolation Kit starts with the filtration of a water sample onto a filter membrane. Filter membranes can be purchased separately from MO BIO or can be user supplied. MO BIO filter membranes are sterile, disposable, and easy to use. The membrane is then added to our special 5 ml bead beating tube containing a unique bead mix. Rapid and thorough lysis occurs through vortex mixing in a reformulated lysis buffer that enhances the isolation of microorganisms from filter membranes. After the protein and inhibitor removal steps, total genomic DNA is captured on the MO BIO Laboratories silica spin column. High quality DNA is then washed and eluted from the spin column membrane for use in downstream applications including PCR and qPCR.

#### **Detailed Protocol (Please wear gloves at all times)**

Warm Solution PW1 prior to use at 55°C for 5-10 minutes. Use Solution PW1 while still warm.

Check Solution PW3 and warm at 55°C for 5-10 minutes if necessary. Solution PW3 can be used while still warm.

1. Filter water samples using a reusable or disposable filter funnel attached to a vacuum source. Disposable filter funnels, containing 0.22 µm or 0.45 µm filter membranes, can be ordered from MO BIO Laboratories (see page 3). The volume of water filtered will depend on the microbial load and turbidity of the water sample. **(Please see Types of Water Samples in the “Hints and Troubleshooting Guide” section of Instruction Manual).**

*What’s happening: A reusable or disposable filter funnel is attached to a vacuum filtration system. Microorganisms are trapped on top of and within the filter membrane.*

2. If using a reusable filter funnel, remove the upper portion of the apparatus. If using a MO BIO Laboratories filter funnel, remove the 100 ml upper portion of the filter cup from the catch reservoir by snapping it off.

3. Using two sets of sterile forceps, pick up the white filter membrane at opposite edges and roll the filter into a cylinder with the top side facing inward.

**Note:** Do not tightly roll or fold the filter membrane. To see a video of this technique, please visit the PowerWater® DNA Isolation Kit product page on [www.mobio.com](http://www.mobio.com).

4. Insert the filter into the 5 ml PowerWater® Bead Tube.

*What’s happening: Loosely rolling and inserting the filter membrane into the PowerWater® Bead Tube allows for efficient bead beating and homogenization in proceeding steps.*

5. Add **1 ml of Solution PW1** to the PowerWater® Bead Tube.

**Note:** Solution PW1 must be warmed to dissolve precipitates prior to use. Solution PW1 should be used while still warm. For samples containing organisms that are difficult to lyse (fungi, algae) an additional heating step can be included. See **Alternate Lysis Method in the “Hints and Troubleshooting Guide”**.

*What's happening: Solution PW1 is a strong lysing reagent that includes a detergent to help break cell walls and will remove non-DNA organic and inorganic material. It is also part of the patented Inhibitor Removal Technology® (IRT). When cold, this solution will form a white precipitate in the bottle. Heating to 55°C will dissolve the components without harm. Solution PW1 should be used while it is still warm.*

6. Secure the PowerWater® Bead Tube horizontally to a MO BIO Vortex Adapter, catalog number 13000-V1-15 or 13000-V1-5.

7. Vortex at maximum speed for 5 minutes

*What's happening: The mechanical action of bead beating will break apart the surface of the filter membrane that contains trapped cells and aids in cell lysis. Use of the vortex adapter will maximize homogenization by holding the tubes equal distance and angle from the center of rotation. Avoid using tape, which can become loose and result in reduced homogenization efficiency.*

8. Centrifuge the tubes  $\leq 4000 \times g$  for 1 minute at room temperature. The speed will depend on the capability of your centrifuge. **(This step is optional if a centrifuge with a 15 ml tube rotor is not available, but will result in minor loss of supernatant).**

9. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided). Draw up the supernatant using a 1 ml pipette tip by placing it down into the beads.

**Note:** Placing the pipette tip down into the beads is required. Pipette more than once to ensure removal of all supernatant. Any carryover of beads will not affect subsequent steps. Expect to recover between 600-650  $\mu\text{l}$  of supernatant depending on the type of filter membrane used.

*What's happening: The supernatant is separated and removed from the filter membrane and beads at this step.*

10. Centrifuge at 13,000  $\times g$  for 1 minute.



*What's happening: Any remaining beads, proteins, and cell debris are removed at this step. This step is important for removal of any remaining contaminating non-DNA organic and inorganic matter that may reduce the DNA purity and inhibit downstream DNA applications.*

11. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

12. Add **200 µl of Solution PW2** and vortex briefly to mix. Incubate at 4°C for 5 minutes.

*What's happening: Solution PW2 is another part of the patented Inhibitor Removal Technology® (IRT) and is a second reagent to remove additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.*

13. Centrifuge the tubes at 13,000 x g for 1 minute.

14. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).

*What's happening: The pellet at this point contains additional non-DNA organic and inorganic material. For best DNA yields and quality, avoid transferring any of the pellet.*

15. Add **650 µl of Solution PW3** and vortex briefly to mix.

**Note:** Check Solution PW3 for precipitation prior to use. Warm if necessary. Solution PW3 can be used while still warm.

*What's happening: Solution PW3 is a high concentration salt solution. Since DNA binds tightly to silica at high salt concentrations this will adjust the DNA solution salt concentration to allow binding of the DNA, but not non-DNA organic and inorganic material that may still be present at low levels, to the spin filter.*

16. Load 650  $\mu$ l of supernatant onto a Spin Filter and centrifuge at 13,000 x g for 1 minute. Discard the flow through and repeat until all the supernatant has been loaded onto the Spin Filter.

**Note:** A total of two loads for each sample processed are required.

*What's happening: The DNA is selectively bound to the silica membrane in the Spin Filter basket and the flow through containing non-DNA components is discarded.*

17. Place the Spin Filter basket into a clean 2 ml Collection Tube (provided).

*What's happening: Due to the high concentration of salt in solution PW3, it is important to place the Spin Filter basket into a clean 2 ml Collection Tube to aid in the subsequent wash steps and improve the DNA purity and yield.*

18. Shake to mix Solution PW4 before use. Add **650  $\mu$ l of Solution PW4** and centrifuge at 13,000 x g for 1 minute.

*What's happening: Solution PW4 is an alcohol based wash solution used to further clean the DNA that is bound to the silica filter membrane in the Spin Filter. This wash solution removes residual salt and other contaminants while allowing the DNA to stay bound to the silica membrane.*

19. Discard the flow through and add **650  $\mu$ l of Solution PW5** and centrifuge at 13,000 x g for 1 minute.

*What's happening: Solution PW5 ensures complete removal of Solution PW4 which will result in higher DNA purity and yield.*

20. Discard the flow through and centrifuge again at 13,000 x g for 2 minutes to remove residual wash.

*What's happening: The second spin removes residual Solution PW5. It is critical to remove all traces of wash solution because the ethanol in Solution PW5 can interfere with many downstream DNA applications such as PCR, restriction digests, and gel electrophoresis.*

21. Place the Spin Filter basket into a clean 2 ml Collection Tube (provided).

22. Add **100 µl of Solution PW6** to the center of the white filter membrane.

*What's happening: Placing Solution PW6 (sterile elution buffer) in the center of the small white membrane will make sure the entire membrane is wetted. This will result in a more efficient and complete release of the DNA from the silica Spin Filter membrane. As Solution PW6 passes through the silica membrane, the DNA that was bound in the presence of high salt is selectively released by Solution PW6 (10 mM Tris) which lacks salt.*

*Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for DNA elution from the silica Spin Filter membrane at this step. Solution PW6 contains no EDTA. If DNA degradation is a concern, sterile TE may also be used instead of PW6 for elution of DNA from the Spin Filter.*

23. Centrifuge at 13,000 x g for 1 minute.

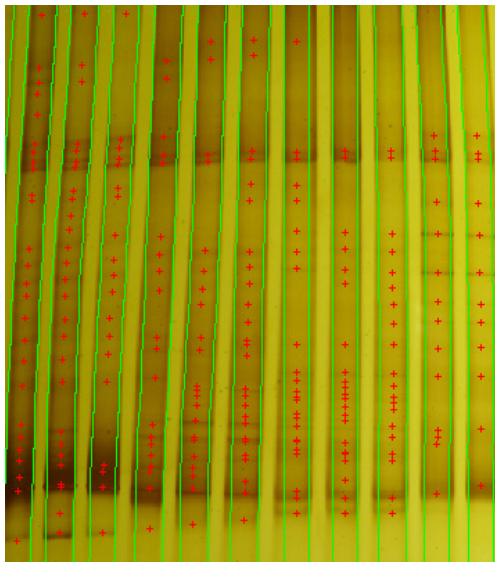
24. Discard the Spin Filter basket. The DNA is now ready for any downstream application. No further steps are required.

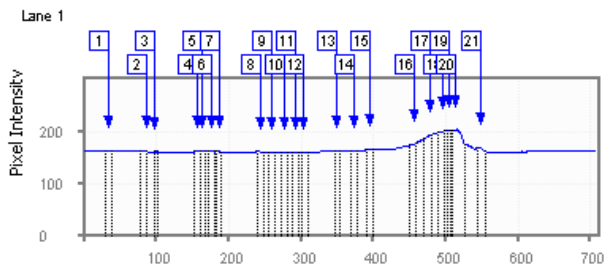
We recommend storing the DNA frozen (-20°C to -80°C). Solution PW6 contains no EDTA. To concentrate the DNA, see the Hints and Troubleshooting Guide.

## ANEXO 3

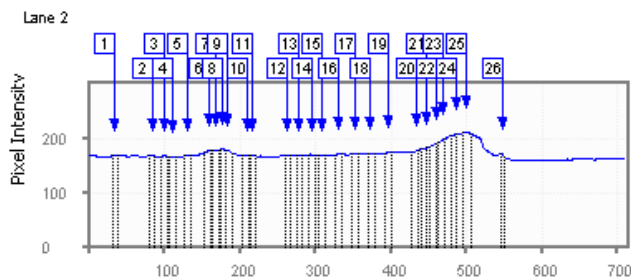
**Gel Report created by LabImage 1D 2006 Professional Trial**  
(Single Lane Report with Profile Project DGGE)

Gel Image:





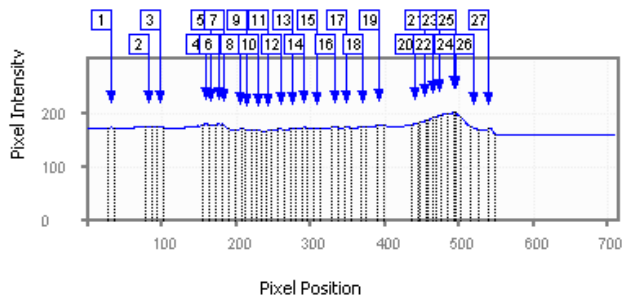
Pixel Position				
Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	45 , 120	120	35,444.000	4.417
Band 2	41 , 171	171	34,429.000	4.290
Band 3	40 , 183	183	21,384.000	2.665
Band 4	36 , 242	242	36,230.000	4.515
Band 5	36 , 249	249	36,572.000	4.557
Band 6	35 , 261	261	36,744.000	4.579
Band 7	34 , 271	271	36,091.000	4.497
Band 8	36 , 328	328	33,843.000	4.217
Band 9	31 , 344	344	34,389.000	4.285
Band 10	30 , 361	361	34,404.000	4.287
Band 11	29 , 376	376	34,772.000	4.333
Band 12	29 , 388	388	34,630.000	4.315
Band 13	27 , 434	434	35,565.000	4.432
Band 14	26 , 457	457	35,828.000	4.464
Band 15	26 , 479	479	36,552.000	4.555
Band 16	25 , 540	540	44,939.000	5.600
Band 17	24 , 561	561	52,597.000	6.554
Band 18	24 , 579	579	42,866.000	5.341
Band 19	24 , 587	587	15,651.000	1.950
Band 20	24 , 597	597	87,312.000	10.880
Band 21	24 , 632	632	42,281.000	5.269



Pixel Position				
Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	85 , 118	118	38,598.000	4.012
Band 2	81 , 169	169	38,610.000	4.014
Band 3	80 , 183	183	38,227.000	3.974
Band 4	79 , 194	194	37,126.000	3.859
Band 5	78 , 214	214	37,053.000	3.852
Band 6	76 , 243	243	42,390.000	4.407
Band 7	75 , 251	251	37,262.000	3.874
Band 8	74 , 260	260	37,505.000	3.899
Band 9	74 , 267	267	36,952.000	3.841
Band 10	72 , 292	292	34,911.000	3.629
Band 11	71 , 298	298	34,748.000	3.612
Band 12	69 , 345	345	34,911.000	3.629
Band 13	68 , 361	361	35,332.000	3.673

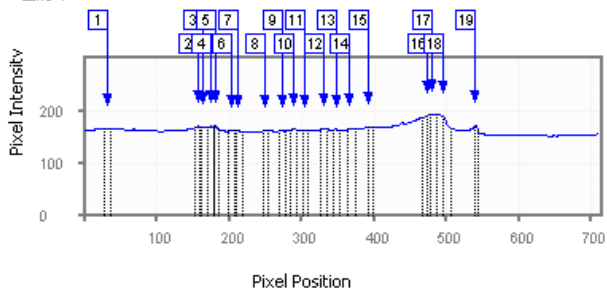
Band 14	67 , 378	378	35,622.000	3.703
Band 15	66 , 390	390	35,485.000	3.689
Band 16	65 , 412	412	35,956.000	3.738
Band 17	65 , 434	434	35,868.000	3.729
Band 18	64 , 454	454	35,978.000	3.740
Band 19	63 , 478	478	36,794.000	3.825
Band 20	62 , 515	515	36,552.000	3.800
Band 21	61 , 528	528	37,238.000	3.871
Band 22	61 , 540	540	43,329.000	4.504
Band 23	61 , 550	550	39,454.000	4.101
Band 24	60 , 567	567	40,983.000	4.260
Band 25	60 , 580	580	48,228.000	5.014
Band 26	60 , 628	628	16,839.000	1.751

Lane 3

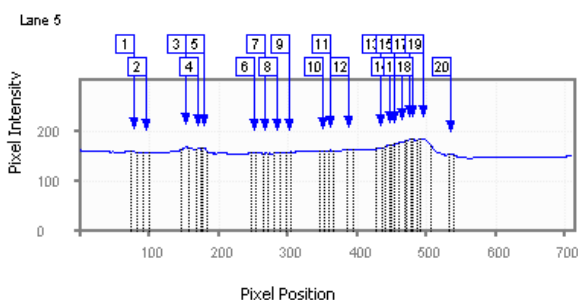


Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	126 , 116	116	36,969.000	3.781
Band 2	122 , 166	166	35,673.000	3.648
Band 3	121 , 182	182	39,341.000	4.023
Band 4	114 , 242	242	36,468.000	3.729
Band 5	113 , 249	249	36,013.000	3.683
Band 6	112 , 260	260	36,326.000	3.715
Band 7	111 , 266	266	35,780.000	3.659
Band 8	110 , 289	289	34,133.000	3.490
Band 9	109 , 297	297	33,931.000	3.470
Band 10	109 , 313	313	33,476.000	3.423
Band 11	108 , 326	326	33,423.000	3.418
Band 12	107 , 343	343	33,683.000	3.444
Band 13	107 , 358	358	33,727.000	3.449
Band 14	106 , 374	374	34,410.000	3.519
Band 15	106 , 391	391	34,044.000	3.481
Band 16	105 , 414	414	34,381.000	3.516
Band 17	105 , 430	430	34,164.000	3.494
Band 18	104 , 452	452	34,228.000	3.500
Band 19	104 , 474	474	35,023.000	3.582
Band 20	103 , 522	522	36,331.000	3.715
Band 21	103 , 535	535	37,488.000	3.834
Band 22	103 , 545	545	38,548.000	3.942
Band 23	102 , 554	554	39,432.000	4.032
Band 24	102 , 573	573	39,691.000	4.059
Band 25	102 , 576	576	39,303.000	4.019
Band 26	102 , 601	601	40,708.000	4.163
Band 27	102 , 620	620	41,191.000	4.212

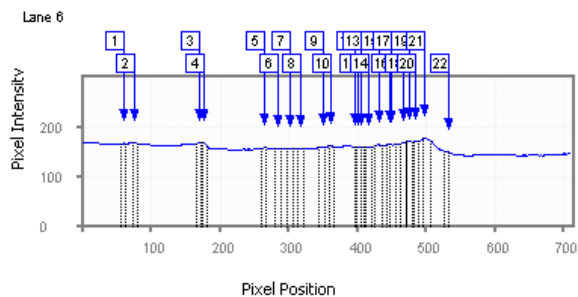
Lane 4



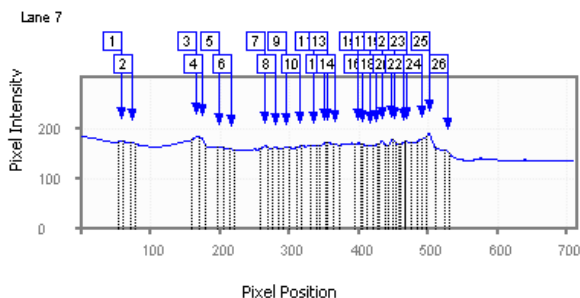
Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	167 , 116	116	34,630.000	5.336
Band 2	159 , 239	239	35,931.000	5.536
Band 3	158 , 247	247	34,939.000	5.384
Band 4	157 , 257	257	34,994.000	5.392
Band 5	157 , 263	263	34,982.000	5.390
Band 6	156 , 286	286	32,626.000	5.027
Band 7	155 , 294	294	32,325.000	4.981
Band 8	152 , 331	331	32,131.000	4.951
Band 9	150 , 355	355	31,555.000	4.862
Band 10	149 , 371	371	31,920.000	4.918
Band 11	148 , 387	387	32,130.000	4.951
Band 12	147 , 412	412	32,613.000	5.025
Band 13	146 , 430	430	32,803.000	5.054
Band 14	145 , 447	447	37,042.000	5.708
Band 15	145 , 474	474	33,629.000	5.182
Band 16	143 , 554	554	36,858.000	5.679
Band 17	143 , 561	561	37,093.000	5.715
Band 18	143 , 576	576	51,589.000	7.949
Band 19	143 , 620	620	19,205.000	2.959



Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	206 , 162	162	38,611.000	5.461
Band 2	205 , 179	179	37,715.000	5.334
Band 3	203 , 236	236	42,299.000	5.983
Band 4	202 , 254	254	38,199.000	5.403
Band 5	201 , 261	261	37,504.000	5.304
Band 6	198 , 333	333	33,166.000	4.691
Band 7	197 , 350	350	33,359.000	4.718
Band 8	196 , 366	366	32,658.000	4.619
Band 9	194 , 385	385	32,676.000	4.622
Band 10	191 , 431	431	32,638.000	4.616
Band 11	191 , 442	442	32,959.000	4.662
Band 12	190 , 470	470	32,945.000	4.660
Band 13	190 , 515	515	33,395.000	4.723
Band 14	190 , 527	527	33,926.000	4.798
Band 15	190 , 534	534	21,089.000	2.983
Band 16	189 , 545	545	34,321.000	4.854
Band 17	189 , 556	556	35,054.000	4.958
Band 18	189 , 561	561	34,863.000	4.931
Band 19	189 , 577	577	66,841.000	9.454
Band 20	189 , 616	616	22,817.000	3.227



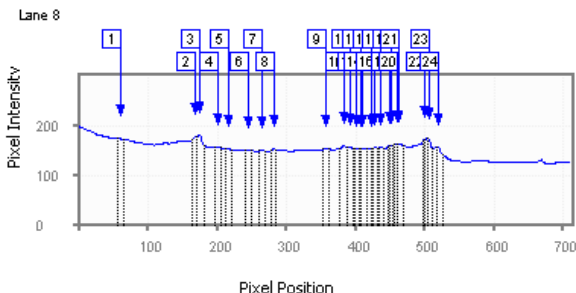
Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	250 , 143	143	37,635.000	5.366
Band 2	249 , 160	160	36,949.000	5.268
Band 3	245 , 253	253	38,160.000	5.441
Band 4	245 , 260	260	36,775.000	5.243
Band 5	239 , 346	346	33,364.000	4.757
Band 6	237 , 366	366	32,707.000	4.663
Band 7	236 , 384	384	32,379.000	4.616
Band 8	235 , 399	399	32,489.000	4.632
Band 9	234 , 431	431	37,122.000	5.293
Band 10	234 , 443	443	32,982.000	4.702
Band 11	234 , 478	478	8,075.000	1.151
Band 12	234 , 482	482	32,461.000	4.628
Band 13	234 , 487	487	20,142.000	2.872
Band 14	234 , 497	497	32,141.000	4.582
Band 15	234 , 512	512	45,350.000	6.466
Band 16	234 , 527	527	20,462.000	2.917
Band 17	234 , 530	530	32,758.000	4.670
Band 18	234 , 547	547	32,848.000	4.683
Band 19	234 , 557	557	32,814.000	4.678
Band 20	234 , 565	565	33,139.000	4.725
Band 21	234 , 578	578	38,435.000	5.480
Band 22	234 , 612	612	22,208.000	3.166



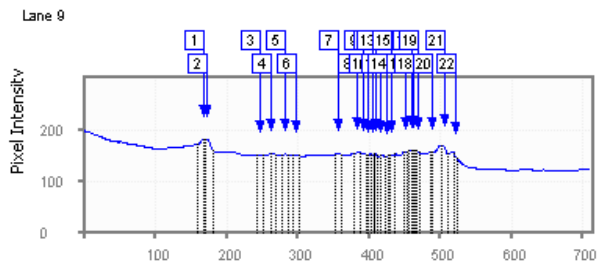
Pixel Position

Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	292 , 142	142	36,175.000	3.850
Band 2	292 , 156	156	35,481.000	3.776
Band 3	289 , 249	249	51,410.000	5.472
Band 4	288 , 257	257	41,081.000	4.372
Band 5	288 , 282	282	33,556.000	3.571
Band 6	287 , 298	298	32,651.000	3.475
Band 7	286 , 347	347	49,878.000	5.309
Band 8	285 , 362	362	32,944.000	3.506
Band 9	285 , 378	378	32,979.000	3.510
Band 10	285 , 398	398	33,225.000	3.536
Band 11	284 , 416	416	33,659.000	3.582
Band 12	284 , 433	433	38,508.000	4.099
Band 13	284 , 437	437	34,319.000	3.653
Band 14	284 , 448	448	33,862.000	3.604
Band 15	283 , 481	481	33,740.000	3.591
Band 16	283 , 487	487	33,431.000	3.558
Band 17	283 , 497	497	33,030.000	3.515
Band 18	283 , 507	507	33,168.000	3.530
Band 19	283 , 514	514	42,227.000	4.494
Band 20	283 , 529	529	46,811.000	4.982
Band 21	283 , 532	532	34,280.000	3.649
Band 22	283 , 545	545	20,922.000	2.227
Band 23	283 , 549	549	33,564.000	3.572
Band 24	283 , 571	571	34,114.000	3.631
Band 25	283 , 582	582	51,913.000	5.525
Band 26	283 , 608	608	22,628.000	2.408



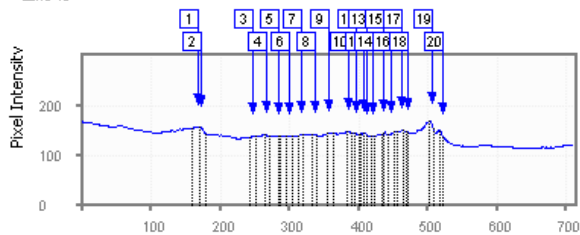


Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	334 , 143	143	35,920.000	5.013
Band 2	334 , 251	251	36,470.000	5.090
Band 3	334 , 257	257	41,173.000	5.747
Band 4	334 , 283	283	32,576.000	4.547
Band 5	334 , 298	298	31,938.000	4.458
Band 6	334 , 327	327	31,289.000	4.367
Band 7	334 , 347	347	31,118.000	4.343
Band 8	334 , 364	364	31,531.000	4.401
Band 9	334 , 438	438	31,665.000	4.420
Band 10	334 , 464	464	36,647.000	5.115
Band 11	334 , 473	473	32,253.000	4.502
Band 12	334 , 483	483	32,051.000	4.473
Band 13	334 , 488	488	8,017.000	1.119
Band 14	334 , 491	491	31,904.000	4.453
Band 15	334 , 505	505	31,966.000	4.462
Band 16	334 , 509	509	36,190.000	5.051
Band 17	334 , 517	517	32,300.000	4.508
Band 18	334 , 530	530	16,394.000	2.288
Band 19	334 , 532	532	20,674.000	2.886
Band 20	334 , 540	540	25,206.000	3.518
Band 21	334 , 544	544	33,568.000	4.685
Band 22	334 , 580	580	13,296.000	1.856
Band 23	334 , 587	587	30,380.000	4.240
Band 24	334 , 601	601	31,946.000	4.459



Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	380 , 250	250	37,237.000	6.154
Band 2	380 , 256	256	50,731.000	8.384
Band 3	380 , 329	329	31,285.000	5.171
Band 4	380 , 345	345	31,744.000	5.246
Band 5	380 , 365	365	31,491.000	5.205
Band 6	380 , 379	379	31,285.000	5.171
Band 7	380 , 438	438	31,647.000	5.230
Band 8	380 , 465	465	32,274.000	5.334
Band 9	380 , 474	474	31,758.000	5.249
Band 10	380 , 479	479	11,772.000	1.946
Band 11	380 , 486	486	11,802.000	1.951
Band 12	380 , 498	498	38,705.000	6.397
Band 13	380 , 490	490	31,377.000	5.186
Band 14	380 , 506	506	23,113.000	3.820
Band 15	380 , 512	512	35,055.000	5.794
Band 16	380 , 533	533	16,356.000	2.703
Band 17	380 , 542	542	24,790.000	4.097
Band 18	380 , 544	544	16,499.000	2.727
Band 19	380 , 550	550	16,305.000	2.695
Band 20	380 , 569	569	12,147.000	2.008
Band 21	380 , 587	587	42,149.000	6.966
Band 22	380 , 602	602	15,540.000	2.568

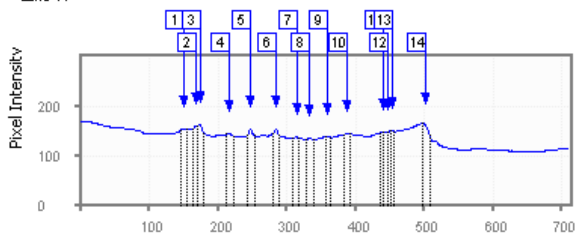
Lane 10



Pixel Position

Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	426 , 250	250	40,186.000	7.422
Band 2	427 , 256	256	31,691.000	5.853
Band 3	426 , 330	330	28,350.000	5.236
Band 4	426 , 348	348	29,125.000	5.379
Band 5	426 , 367	367	7,159.000	1.322
Band 6	426 , 382	382	28,661.000	5.294
Band 7	426 , 399	399	29,176.000	5.389
Band 8	426 , 418	418	29,053.000	5.366
Band 9	425 , 438	438	29,697.000	5.485
Band 10	425 , 466	466	30,433.000	5.621
Band 11	425 , 478	478	29,537.000	5.455
Band 12	425 , 488	488	44,312.000	8.184
Band 13	425 , 494	494	36,329.000	6.710
Band 14	425 , 501	501	10,828.000	2.000
Band 15	425 , 517	517	11,223.000	2.073
Band 16	425 , 528	528	36,781.000	6.793
Band 17	425 , 544	544	30,850.000	5.698
Band 18	425 , 551	551	15,155.000	2.799
Band 19	425 , 587	587	24,953.000	4.609
Band 20	425 , 602	602	17,934.000	3.312

Lane 11



Pixel Position

Band Nr.	Coordinates	Band Pos.	Band Vol. +	Perc. Band [%]
Band 1	470 , 234	234	40,736.000	9.412
Band 2	470 , 250	250	33,393.000	7.716
Band 3	470 , 257	257	38,148.000	8.814
Band 4	470 , 299	299	37,540.000	8.674
Band 5	470 , 330	330	34,369.000	7.941
Band 6	469 , 367	367	30,845.000	7.127
Band 7	469 , 396	396	28,467.000	6.578
Band 8	469 , 415	415	31,331.000	7.239
Band 9	469 , 441	441	28,807.000	6.656
Band 10	469 , 468	468	29,934.000	6.917
Band 11	469 , 521	521	23,067.000	5.330
Band 12	469 , 528	528	19,241.000	4.446
Band 13	469 , 535	535	15,565.000	3.596
Band 14	469 , 583	583	41,344.000	9.553