

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE BACTERIANA EM PISCICULTURA
NEOTROPICAL

Aylan Kener Meneghine
Tecnólogo em Biocombustíveis

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DIVERSIDADE BACTERIANA EM PISCICULTURA
NEOTROPICAL

Aylan Kener Meneghine

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2013

Meneghine, Aylan Kener
M541d Diversidade bacteriana em piscicultura neotropical / Aylan Kener
Meneghine. -- Jaboticabal, 2013
vii, 52 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Lucia Helena Sipaubá-Tavares, Rodrigo
Matheus Pereira
Bibliografia

1. *16S rDNA*. 2. Metagenoma. 3. Sistema Sequencial. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.68

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIVERSIDADE BACTERIANA EM PISCICULTURA NEOTROPICAL

AUTOR: AYLAN KENER MENEGHINE

ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. LUCIA HELENA SIPAUBA TAVARES

Centro de Aquicultura da UNESP / Jaboticabal/SP

Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA

Universidade Federal da Grande Dourados / Dourados/MS

Data da realização: 22 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES

AYLAN KENER MENECHINE – nascido em 4 de março de 1990, no município de Taquaritinga – SP, é Tecnólogo em Biocombustíveis, formado pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC – Centro Estadual de Educação Tecnológica “Paula Souza”) em dezembro de 2010, fazendo parte da primeira turma de formandos do curso. Em março de 2011 iniciou o curso de mestrado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP, onde defendeu sua dissertação de mestrado em fevereiro de 2013.

“(...)É um peixe, é um gesto, é uma prata brilhando
É a luz da manhã, é o tijolo chegando
É a lenha, é o dia, é o fim da picada
É a garrafa de cana, o estilhaço na estrada

É o projeto da casa, é o corpo na cama
É o carro enguiçado, é a lama, é a lama
É um passo, é uma ponte, é um sapo, é uma rã
É um resto de mato, na luz da manhã

São as águas de março fechando o verão
É a promessa de vida no teu coração(...)”

(Tom Jobim)

*À Neideli e Chandler, minha família.
Às minhas irmãs de sintonia, que sempre estiveram
presentes em todas as minhas conquistas
Geisa e Milene.
Aos amigos que são como irmãos, uma família a
parte, Adauto e Gabriel.*

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, e por todos os momentos bons e inclusive ruins, que me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente.

À Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves pela orientação, paciência, confiança, grandes ensinamentos e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos pela oportunidade de crescimento profissional e confiança.

À Profa. Dra. Lucia H. Sipaúba-Tavares pela oportunidade de conhecer um pouco da limnologia, e pela grande contribuição neste projeto desenvolvido assim como na elaboração final desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira pela disponibilidade de participar da minha banca e também grande contribuição neste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Ney Millan pela ajuda nas coletas e análises limnológicas realizadas, assim como pela ajuda nas análises estatísticas deste trabalho.

A todos os funcionários, professores, companheiros e amigos de trabalho do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP) e também do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton – CAUNESP que me ajudaram muito no decorrer desses 2 anos com suas experiências e me dando apoio.

A Daniele Berlarmino, em especial, por todo apoio, companheirismo, paciência, risadas, estudos. E também pela grande pessoa e amiga que é: realmente especial. Sempre do meu lado em todos os momentos, dos excelentes até os ruins. Muito obrigado Dani, adoro vc!!!

À Profa. Dra. Maria Benincasa pela amizade, conselhos e oportunidades.

À minha família por todo apoio incondicional, sem eles essa dissertação não existiria.

Aos amigos de longa data que sempre torceram, me apoiaram e por mais da distância nunca se esqueceram de mim. Muito obrigado!

Aos amigos de graduação Marcio, Priscila, Chrystian, Edson, Guilherme que sempre mantiveram contato, e estiveram ao meu lado mesmo quando eu permaneci distante.

Aos grandes amigos de disciplina e saideiras Ju Roviero, Laís, Elisa, Camila e Claudio, que tornaram os momentos mais difíceis também os mais divertidos. Obrigado pelo companheirismo e amizade, vocês são demais!

Aos novos amigos Carlos, Luiz Flávio (Pudendo) e Paulo (Pancho) pelos conselhos, altas risadas, saideiras e amizade.

A Adriano pela amizade, companheirismo, conselhos e apoio incondicional durante essa jornada do mestrado.

À Rosana, professora de francês e acima de tudo amiga, por todos os conselhos e aulas dadas, assim como incentivo para correr atrás dos meus objetivos, sem desanimar.

À Camila e Zé Forlini, amigos de república em Araraquara, por todos os bons momentos proporcionados no decorrer desses 2 anos.

Aos amigos de “tabuleiros” Marina, Alex, Fernando, Sâmara, Raphael, Gabriel, Bruna pelas risadas nos momentos de descontração, no qual eu esquecia por uns instantes de todos os problemas das análises. Obrigado galera!

Enfim a TODOS que participaram de mais essa conquista da minha vida, meu MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	página
RESUMO -	ii
ABSTRACT –	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A água na aquicultura	2
2.2 Importância dos microrganismos na água.....	5
2.3 Análise da diversidade microbiana por abordagem metagenômica	11
3. Material e Métodos.....	14
3.1 Coleta de amostras de água	14
3.2 Análise das variáveis limnológicas	15
3.3 Extração de DNA metagenômico e amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	16
3.4 Eluição dos produtos de PCR	18
3.5 Clonagem em vetor pJET 1.2/blunt.....	19
3.6 Transformação das células competentes.....	20
3.7 Coleta de Clones Transformantes.....	21
3.8 PCR de validação dos clones	21
3.9 Cultivo dos Clones Bacterianos e Extração do DNA Plasmidial	22
3.10 Sequenciamento dos Clones	23
3.11 Análise das Sequências.....	24
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS.....	43

DIVERSIDADE BACTERIANA EM PISCICULTURA NEOTROPICAL

RESUMO - A aquicultura é uma atividade que está em contínuo crescimento, desta forma os ecossistemas aquáticos utilizados para tal atividade acabam sofrendo alterações nas condições da água e na comunidade microbiana do local. No presente trabalho, compararam-se as comunidades bacterianas presentes em águas de dois viveiros de piscicultura, um utilizado como reservatório de água (V1) e o outro com condições de elevada carga de nutrientes (V4), os quais estão inseridos em um sistema sequencial com fluxo contínuo de água (seis viveiros). A escolha dos viveiros V1 e V4, foi baseada em estudos anteriores no qual foi evidenciado um alto grau de eutrofização neste local. As coletas de água foram realizadas em dois períodos distintos um na seca (Julho e Agosto/2012) e outro na chuva (Janeiro e Fevereiro/2012). A comunidade bacteriana foi avaliada através do sequenciamento do gene *16S rRNA*. A população bacteriana variou significativamente entre os dois viveiros e segundo a estação anual, seca ou chuva. No viveiro 1 observou-se uma grande proporção de Proteobacterias, em ambos os períodos, entretanto houve mudanças nas classes deste grupo, a maioria β -Proteobacterias (chuvas) e uma proporção equivalente de β e α -Proteobacterias (seca). No viveiro 4, foi observada uma alta frequência de Cyanobacterias principalmente na estação de seca, aproximadamente 80% da população bacteriana do local, enquanto no período de chuvas este grupo foi menor. A comparação da população bacteriana dos dois viveiros estudados em épocas distintas mostrou que as bactérias nestes locais variam de acordo com o período hidrológico e estão intimamente ligadas com a concentração de nutrientes do local. Estas diferenças são importantes na participação dos ciclos biogeoquímicos, principalmente envolvendo os ciclos do nitrogênio e fósforo e a sanidade do sistema aquático.

Palavras-chave: *16S rDNA*, metagenoma, sistema sequencial

BACTERIAL DIVERSITY IN FISH FARMING NEOTROPICAL

ABSTRACT – The aquaculture is an activity that is continuous growing, in this way aquatic ecosystems used for such activity end up suffer changes in water conditions and microbial community local. In this study, we compared the bacterial communities present in waters of two fish farm ponds, a used as water reservoir (V1) and the other with conditions of high nutrient load (V4), which are inserted in a sequential system with continuous water flow (six ponds). The choice of nurseries V1 and V4 was based on previous studies in which evidenced a high degree of eutrophication in this location. The water sampling were conducted in two distinct periods one in dry season (July and August/2012) and another in the rain (January and February/2012). The bacterial community was assessed by sequencing the 16S rRNA. The bacterial population varied significantly between the two ponds and according to season annual, dry or rain. In the pond 1 there was a large proportion of proteobacteria, in both periods, however there were changes in the classes of this group, most β -Proteobacteria (rain) and an equivalent proportion of β and α -proteobacteria (dry). In pond 4, we observed a high frequency of cyanobacteria mainly during the dry season, approximately 80% of the bacterial population of the place, while in the rainy season this group was lower. A comparison of the bacterial population of the two ponds studied at different times showed that the bacteria at these sites varies according to the period hydrological and are closely linked with nutrient concentration local. These differences are important in the participation in biogeochemical cycles, especially involving the cycles of nitrogen and phosphorus and health of the aquatic system.

Keywords: 16S rDNA, metagenome, sequential system

LISTA DE ABREVIATURAS

LB – Luria Bertani

ng – Nanograma, unidade de medida de concentração (1×10^{-9} g)

μL – Microlitro, unidade de medida de volume (1×10^{-6} L)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Luz UV – Luz Ultra Violeta

RPM – Rotação por minuto

DO – Densidade Óptica

OD – Oxigênio Dissolvido

Cond – Condutividade

Temp – Temperatura

OP – Ortofosfato

PT – Fósforo Total

NO₂ – Nitrito

NO₃ – Nitrato

NH₄ – amônia

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Análises físicas e químicas das amostras de água dos viveiros V1 e V4 coletadas nos períodos de chuva (C) e seca (S).....	26
Tabela 2. Distribuição das Proteobacterias encontradas em cada biblioteca do viveiro 1 nos períodos distintos, seca (S) e chuva (C).....	29
Tabela 3. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das sequências de <i>16S rDNA</i> das bibliotecas de águas de aquicultura (V1-C: viveiro 1 período de chuvas; V1-S: viveiro 1 período de seca; V4-C: viveiro 4 período de chuvas; V4-S: viveiro 4 período de seca).....	42

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Esquema ilustrativo sobre o fluxo da alça microbiana, descrito por Azam (1983) e Fenchel (2008).....	7
FIGURA 2. Esquema ilustrando em resumo o ciclo do nitrogênio na água.....	9
FIGURA 3. Esquema ilustrando em resumo o ciclo do fósforo na água.....	10
FIGURA 4. Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 à V9).....	13
FIGURA 5. Sistema sequencial de viveiros de fluxo contínuo de água. A= nascentes; B= ranicultura; C= Tanques de peixes; D= Carcinicultura; F= Água subterrânea para abastecimento do Colégio Técnico Agrícola (CTA); G= <i>wetland</i> ; V1-V6= viveiros.....	15
FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA metagenômico da água de viveiros de piscicultura. 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) amostra de V1, (2) amostra de V4.....	17
FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene 16S <i>rRNA</i> . 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) controle positivo, (2) controle negativo, (3, 4, 5) repetições do amplicon de V1, (6, 7, 8) repetições do amplicon de V4.....	17
FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 1,0 % da purificação dos <i>amplicons</i> . 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) amplicon purificado das amostras de V1, (2) amplicon purificado das amostras de V4....	18
FIGURA 9. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pJET1.2/blunt (Fermentas).....	19
FIGURA 10. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.....	28
FIGURA 11. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.....	28

FIGURA 12. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do viveiro 1. <i>Library 1</i> corresponde ao período de chuvas e <i>Library 2</i> ao período de seca.....	29
FIGURA 13. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.....	36
FIGURA 14. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.....	36
FIGURA 15. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do Viveiro 4. <i>Library 1</i> correspondente ao período de chuvas e <i>Library 2</i> ao período de seca.....	37
FIGURA 16. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1-C (viveiro 1 período chuvoso) e V4-C (Viveiro 4 período chuvoso).....	40
FIGURA 17. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1-S (viveiro 1 período chuvoso) e V4-S (Viveiro 4 período seca).....	40
FIGURA 18. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das sequências de 16S rDNA das bibliotecas de águas de aquicultura (V1-C: viveiro 1 período de chuvas; V1-S: viveiro 1 período de seca; V4-C: viveiro 4 período de chuvas; V4-S: viveiro 4 período de seca).....	41

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é um nome genérico de uma atividade que cobre uma ampla variedade de técnicas de produção de espécies aquáticas, criadas em diferentes condições e localidades geográficas (SIPAÚBA-TAVARES, 2005). Do ponto de vista mundial a aquicultura é uma atividade pequena, porém de grande contribuição no suplemento alimentar afetando de forma direta os recursos ambientais, necessitando de uma nova revisão, principalmente nos lugares onde há rápida e concentrada expansão devido ao efeito acumulativo que apresentam estes sistemas de criação (SIPAÚBA-TAVARES, 2012). Deste modo, se não houver um manejo adequado nos viveiros utilizados para aquicultura, a água local poderá se deteriorar prejudicando todo o sistema aquático e também de criação dos organismos aquáticos.

Um aumento na concentração dos nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, acarreta na eutrofização da água do ecossistema (ESTEVES, 1998). Com a alteração do estado trófico do sistema além das características físicas e químicas da água ser alteradas, as microbiológicas também, e irão variar de acordo com a concentração de nutrientes do local.

Em se tratando de microrganismos, a quantidade de informações sobre a população bacteriana de águas de viveiros de aquicultura no Brasil, é escassa, devido a poucos estudos na área e também a grande dificuldade de se isolar esses microrganismos.

Estratégias da metagenômica podem ser dirigidas para examinar a composição microbiana ou a questão mais ampla de análise à diversidade filogenômica de populações microbianas altamente complexas. Uma abordagem básica é identificar os micróbios de uma comunidade complexa por exploração de sondas universais e conservadas, tais como genes de rRNA (PETROSINO et al., 2009). No caso de bactérias, fazer o estudo através da sequência do 16S rDNA.

Considerando-se a facilidade no uso de técnica de sequenciamento do gene *16SrRNA* e sua importância no estudo de populações bacterianas, juntamente com a escassez de informações sobre a população microbiana em sistemas de aquicultura, o objetivo do presente trabalho é a comparação das comunidades bacterianas presentes em águas de dois viveiros de aquicultura. Um dos viveiros a

serem estudados é utilizado o como reservatório de água e o outro apresenta condições de elevada carga nutrientes. Os dois viveiros estão inseridos em um sistema sequencial com fluxo contínuo de água, e serão analisados em dois períodos climáticos característicos (seca e chuva), por meio de sequenciamento da região V3 do gene *16SrRNA*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A água na aquicultura

A água é a base da vida, sua importância à vida está no fato de que nenhum processo metabólico ocorre sem a sua ação direta ou indireta. Possui papel fundamental na sociedade moderna, tem uma importância única na vida de todos os organismos, sendo procarióticos ou eucarióticos.

A água na biosfera faz parte de um ciclo denominado ciclo hidrológico. O ciclo hidrológico constitui-se basicamente, em um processo contínuo de transporte de massas d'água do oceano para a atmosfera e desta, através de precipitações, escoamento (superficial e subterrâneo) novamente ao oceano. É através do ciclo hidrológico, nos fenômenos de evaporação e precipitação, que ocorre a circulação contínua da água no globo (ESTEVES, 1998).

Quase toda a água do planeta, está concentrada nos oceanos. Apenas uma pequena fração (aproximadamente 3%) está em terra e a maior parte desta está sob a forma de gelo, neve ou águas subterrâneas. Somente cerca de 1% de toda a água terrestre está diretamente disponível ao homem e aos outros organismos, sob a forma de lagos e rios, na atmosfera e como componente dos mais diversos organismos.

Os corpos artificiais de água, são dinâmicos e complexos, dependem primariamente da nascente como fonte de água, sendo que seu o estoque é refletido pelas condições hidrológicas e geológicas do local. A maioria dos parâmetros limnológicos varia ciclicamente no período de 24 horas, influenciando os fatores bióticos (vivos) e abióticos (não vivos) do meio (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Segundo Esteves (1998), o ambiente aquático apresenta certas características que lhe conferem peculiaridades, tais como:

- a) *Alta capacidade para solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos, possibilitando que os organismos, especialmente os autotróficos, possam absorver nutrientes por toda superfície do corpo.*
- b) *Gradientes verticais e, em certos casos, gradientes horizontais, que se tornam evidentes através da distribuição desigual de luz, nutrientes, temperatura e gases (e.g., oxigênio dissolvido e gás carbônico). A distribuição desigual destas variáveis no ambiente aquático tem grandes consequências na distribuição dos organismos.*
- c) *O baixo teor de sais dissolvidos típicos de ambientes de água doce faz com que a maioria dos organismos que habitam estes ambientes seja hipertônica em relação ao meio, sendo necessárias, portanto, adaptações no sentido de manter o equilíbrio osmótico entre os líquidos internos e o meio.*
- d) *Alta densidade e viscosidade da água tem grande significado para a locomoção dos organismos no meio aquático, uma vez que a água é 775 vezes mais densa do que o ar. Para reduzir o efeito resistência do meio à locomoção, os organismos aquáticos apresentam profundas adaptações morfológicas e fisiológicas.*

Na aquicultura o grau e a intensidade com que as técnicas de cultivo perturbam o ambiente são diretamente proporcionais a extensão da exploração dos recursos e desenvolvimento do meio e, suas consequências dependerão da localização, tipo de cultivo e técnica empregada. Nem todas as técnicas de cultivo têm consequências ambientais negativas, uma vez que muitas delas são altamente benéficas quando o manejo ambiental é efetivo e sócio econômico sustentável (SIPAÚBA-TAVARES, 2005).

A aquicultura de águas interiores tem efeito na hidrologia local maior do que outros tipos de cultivo, visto que, remove ou desvia corpos de águas naturais para enchimento ou manutenção dos níveis de água nos viveiros (SIPAÚBA-TAVARES, 2012). Os viveiros e represas utilizados na aquicultura comportam-se como sistemas intermediários, podendo ser lênticos ou lóticos. A constante entrada e saída de água tem efeito pronunciado na dinâmica dos mesmos, influenciando a distribuição dos

organismos e as propriedades físicas e químicas. A entrada de água em um viveiro pode ocorrer por escoamento direto, entrada regulada, afloramento do lençol freático e precipitação; já a saída de água ocorre por infiltração, descarga do vertedouro e descarga regulada, evaporação e evapotranspiração (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Vários fatores como fonte de abastecimento, tipo de solo, vegetação circundante, manejo, forma e tamanho do viveiro influenciam a qualidade da água de um sistema de criação de peixes. Esse conjunto de fatores irá afetar diretamente as variáveis bióticas e abióticas do viveiro e, conseqüentemente, seu grau de trofia. Em um sistema de abastecimento para viveiros e tanques de criação de organismos aquáticos é de fundamental importância o controle do estado trófico pois ele influencia diretamente nos processos biológicos que ocorrem nos viveiros e tanques, levando a resultados negativos no sistema de produção (DIAS, 2012; SIPAÚBA-TAVARES, 2006). Vários fatores interferem nos sistemas de piscicultura, especialmente manejo, morfometria e climatologia. A precipitação, afeta a dinâmica dos ambientes, promovendo o transporte de nutrientes e materiais alóctones, alterações no visual da água e também nas características físicas e químicas (SIPAÚBA-TAVARES; GUARIGLIA; BRAGA, 2007). O aumento da concentração de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, causa eutrofização nos ecossistemas aquáticos, que tem como consequência o aumento da produtividade. Como decorrência desse processo, o ecossistema aquático passa da condição de oligotrófico e mesotrófico para eutrófico ou mesmo hipereutrófico (ESTEVES, 1998).

A eutrofização pode ser natural ou artificial. A natural ocorre de maneira lenta e de forma contínua. Já a eutrofização artificial (cultural ou antrópica) é induzida pelo homem e pode ter diferentes origens, como: efluentes domésticos, industriais, agrícolas, incluindo ainda os efluentes de sistemas de criação de organismos aquáticos. A expansão da aquicultura, associada à produção de biomassa e ao aumento de nutrientes no meio aquático, pode provocar aceleração da produtividade de algas, alterando a ecologia do sistema aquático (MACEDO; SIPAÚBA-TAVARES, 2010).

Ecossistemas aquáticos considerados oligotróficos, são caracterizados por baixas concentrações de nutrientes e também produção primária, refletindo na baixa abundância de fitoplâncton (LEFF, 2009). Em ambientes considerados oligotróficos

(ou mesotróficos) o crescimento de macrófitas submersas é predominante. Seu desenvolvimento é influenciado por vários fatores, como profundidade, declividade e velocidade da água (MACEDO, 2004).

Em função dos fatores que afetam a piscicultura alterando ou não a qualidade da água a participação dos microrganismos é muito importante, já que participam da cadeia alimentar e influenciam na qualidade da água.

2.2 Importância dos microrganismos na água

Comunidades microbianas sustentam o legado ecológico governando os ciclos biogeoquímicos, a produtividade das plantas e a saúde ambiental dos ecossistemas (DESAI et al., 2009). A atividade bioquímica das comunidades microbianas, juntamente com a degradação de compostos prejudiciais, é essencial para minimizar a poluição do ambiente, tanto local como globalmente. A atividade microbiana é, portanto, a chave para remoção e transformação da matéria orgânica. A degradação da matéria orgânica ocorre por meio do processo de oxidação (a dióxido de carbono, principalmente) ou incorporação de biomassa celular (FORSTER et. al., 2003).

Os microrganismos em água possuem importante interação na cadeia alimentar, envolvidos diretamente com o processo chamado alça microbiana (*microbial loop*). Esse processo foi descrito pela primeira vez por Azam et al. (1983) em um estudo sobre o papel ecológico dos microrganismos em coluna d'água nos mares.

De acordo com a hipótese proposta por Azam, uma importante consequência da alça microbiana, decorre da habilidade das bactérias absorverem os nutrientes contidos na água, ocorrendo uma rápida reciclagem de nutrientes no meio. O seu pequeno tamanho em relação à superfície-volume permite a absorção de nutrientes em concentrações muito baixas, dando-lhes uma vantagem competitiva sobre o fitoplâncton. A dinâmica do comportamento da alça microbiana é resultado de muitas relações de interações ecológicas como o comensalismo, competição e predação. A matéria orgânica dissolvida, influenciada pela disponibilidade de nutrientes minerais, produzida pelo fitoplâncton, é utilizada pelas bactérias, ocorrendo competição pelos nutrientes minerais entre o fitoplâncton e as bactérias. Este último, influenciado pelas

condições de crescimento de algas como também disponibilidade de substratos orgânicos para crescimento bacteriano. Por fim, a predação envolvendo microflagelados sobre as bactérias, influencia o resultado da competição já citada. A regeneração de nutrientes minerais resultantes dessa predação fornecerá um *feedback* de alguns fluxos de materiais dentro da alça microbiana.

Segundo afirmações de Stone e Berman (1993), a descrição da alça microbiana, levou algumas mudanças significativas com relação à compreensão da ciclagem de nutrientes nos ecossistemas aquáticos. Como resultado dessa descrição, parece que em muitos ambientes, cerca de 50% da carga de nutrientes é desviado para as vias microbianas ao invés de passar-se para níveis tróficos superiores. Como resultado, a alça microbiana é responsável pela maior e rápida ciclagem de nutrientes na própria base da cadeia alimentar.

Fenchel (2008) em sua revisão deixa claro que o papel relativo da alça microbiana não é invariável ao longo do tempo e do espaço (Figura 1). Ao contrário, o processo domina em águas oligotróficas, enquanto que a cadeia alimentar clássica do plâncton predomina, por exemplo, quando há um novo suprimento de nutrientes minerais, como durante o *florescimento* de primavera em águas temperadas e em áreas de afloramento. A alça microbiana inclui vários níveis tróficos e assim uma grande fração do carbono orgânico é dissipada na forma de CO₂ ao longo do processo. Sendo assim, o principal efeito da alça microbiana sobre a ciclagem dos elementos na coluna de água é que ele acelera a mineralização e então regenera a produção em sistemas limitados de nutrientes.

Os elementos químicos, incluindo todos os elementos essenciais para a vida, tendem a circular na biosfera em caminhos característicos, que vão do ambiente para o organismo e de volta para o ambiente, esses caminhos mais ou menos circulares são conhecidos como ciclos biogeoquímicos. E o movimento dos elementos e compostos inorgânicos essenciais para a vida pode ser convenientemente designado de ciclagem dos nutrientes (ODUM; BARRETT, 2008).

Dentre os nutrientes encontrados dissolvidos na água, principalmente em viveiros, os mais importantes para definir padrões de qualidade de água são os compostos fosfatados e nitrogenados (SIPAÚBA-TAVARES; DONADON; MILLAN, 2011). A renovação diária da água do viveiro ocasiona o lançamento constante de nitrogênio e fósforo nos ecossistemas aquáticos (HENARES, 2012).

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos. Esta importância deve-se principalmente à sua participação na formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. Quando presente em baixas concentrações pode atuar como fator limitante na produção primária desses ecossistemas (ESTEVES, 1998).

A chuva, material orgânico e inorgânico de origem alóctone e a fixação de nitrogênio molecular dentro do próprio viveiro, são as principais fontes naturais de nitrogênio (ESTEVES, 1998; SIPAÚBA-TAVARES; GUARIGLIA; BRAGA, 2007; MILLAN, 2012).

O nitrogênio está continuamente entrando na atmosfera pela ação de bactérias denitrificantes, e sempre voltando ao ciclo biológico por meio da ação de

microrganismos fixadores de nitrogênio (*biofixação*), bem como pela ação de faíscas e outras fixações físicas (ODUM; BARRETT, 2008).

Nos ambientes aquáticos, o nitrogênio está presente em diversas formas: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3), íon amônio (NH_4^+), óxido nitroso (N_2O), nitrogênio molecular (N_2), nitrogênio orgânico dissolvido (peptídeos, purinas, aminas, aminoácidos, etc.), nitrogênio orgânico particulado (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton e detritos), etc. (ESTEVES, 1998).

O nitrato é a forma de nitrogênio com maior prevalência em águas com concentração elevada de oxigênio dissolvido, sendo dependente da atividade biológica e o elemento final da nitrificação (NEOFITOU; KLAOUDATOS, 2008; MILLAN, 2012).

A concentração de nitrato está diretamente relacionada com a quantidade de fitoplâncton (produtor primário), sendo que o mesmo é o maior responsável pela produção de matéria orgânica nos viveiros e lagos de pesca (QUEIROZ; BOEIRA, 2007). O nitrato pode funcionar como um terminal acceptor de elétrons durante a oxidação da matéria orgânica e conseqüentemente, fornecer energia para o crescimento microbiano. A respiração do nitrato resulta na redução do nitrato a dinitrogênio (denitrificação) ou amônia (HARGREAVES, 1998).

Como principal fonte de amônia em tanques e viveiros de piscicultura, tem-se os peixes, que excretam o nutriente por suas brânquias (MILLAN, 2012). Outra fonte de amônia para os tanques de piscicultura é a difusão através do sedimento, caracterizada pela presença de matéria orgânica, com o acúmulo de algas mortas e material fecal produzido pelos peixes. A decomposição deste material decantado produz amônia, que se difunde do sedimento para a coluna de água (EL-SAYED; EL FOULY; ABDEL-MAGUID, 2010).

Em limnologia, quando se encontra referências sobre a concentração de “amônia”, na maioria dos casos, estão englobadas as concentrações das duas formas de nitrogênio amoniacal, NH_3 e NH_4^+ (ESTEVES, 1998).

O ciclo de nitrogênio (Figura 2) nos viveiros de aquicultura é regulado principalmente pela atividade biológica, e a amônia que é liberada na água dos viveiros pela decomposição da matéria orgânica pode ser usada novamente pelas plantas, ou pode ser nitrificada para nitrato pelas bactérias quimioautotróficas. A

oxidação da amônia a nitrito pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas* é o primeiro passo da nitrificação, em seguida, o nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias do gênero *Nitrobacter*. A nitrificação é um processo muito importante para reduzir a concentração de amônia da água dos viveiros de aquicultura, o que é extremamente positivo, porque a amônia é potencialmente tóxica às células (QUEIROZ; BOEIRA, 2007).

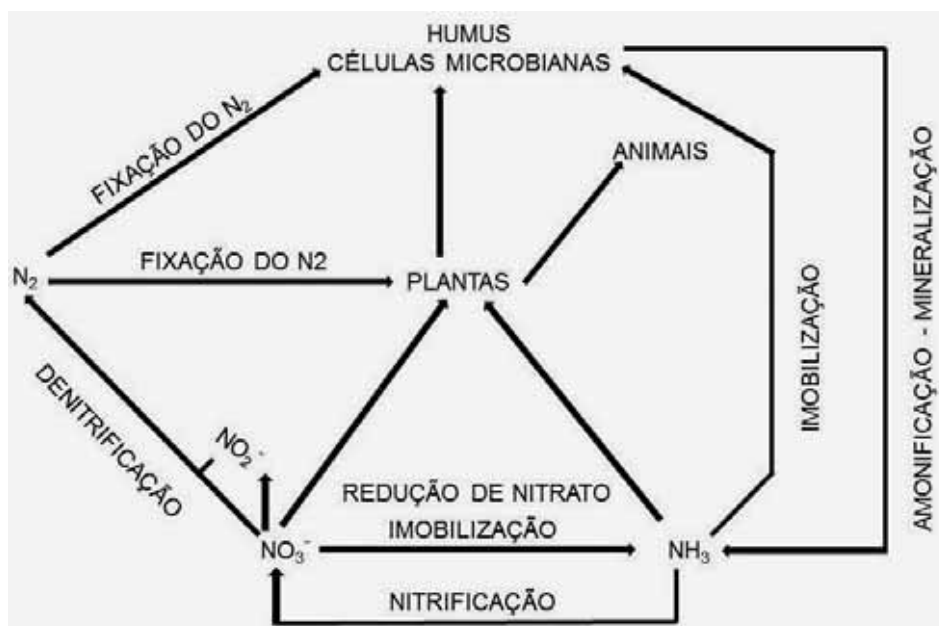


FIGURA 2. Esquema ilustrando em resumo o ciclo do nitrogênio na água. (Fonte: adaptada de Sipaúba-Tavares, 1995).

A nitrificação é sequencial e ocorre em duas fases da oxidação da amônia para nitrato. O processo é mediado predominantemente por dois gêneros de bactérias. A oxidação da amônia é mediada por bactérias do gênero *Nitrosomonas* e a do nitrito é mediada por *Nitrobacter*. Esse processo é afetado pela concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, concentração do substrato, pH, número de bactérias nitrificantes, e disponibilidade e superfícies. Muitos desses fatores estão inter-relacionados e seu efeito na nitrificação é complexo (HARGREAVES, 1998).

O nitrito está relacionado à atividade biológica na decomposição de proteínas contidas na matéria orgânica, e provém da oxidação do amônio NH_4^+ pelas bactérias *Nitrosomonas* e redução anaeróbica da amônia não ionizada (NH_3). A toxidez do nitrito depende do pH e da concentração de cálcio e de cloretos na água dos viveiros

de aquicultura. Nos viveiros onde a concentração de oxigênio dissolvido é baixa, a concentração de nitrito normalmente é alta (QUEIROZ; BOEIRA, 2007).

Outro elemento importante nos sistemas de aquicultura é o fósforo. O fósforo, na maioria das águas continentais, é o principal fator limitante de sua produtividade. Juntamente com o nitrogênio, é responsável pela eutrofização artificial de ecossistemas aquáticos (ESTEVES, 1998).

De acordo com Sipaúba-Tavares (1995), o fósforo é considerado um fator limitante nos viveiros de cultivo, pois ao entrar em contato com o sistema aquático, o mesmo é imediatamente incorporado à cadeia alimentar, via fitoplâncton e zooplâncton, já que é um nutriente essencial para estes organismos.

Toda forma de fósforo presentes em águas naturais, quer na forma iônica ou complexada, encontra-se sob a forma de fosfato (ESTEVES, 1998). O ortofosfato é o mais comum e a principal forma utilizada pelos vegetais (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

Juntamente com o fitoplâncton, as macrófitas aquáticas podem ser capazes de absorver as formas de fósforo no ecossistema aquático. O principal papel das macrófitas aquáticas no ciclo do fosfato (Figura 3) reside no fato de que suas raízes (no caso das macrófitas submersas, emersas e com folhas flutuantes) se localizarem na zona reduzida do sedimento (ESTEVES, 1998).

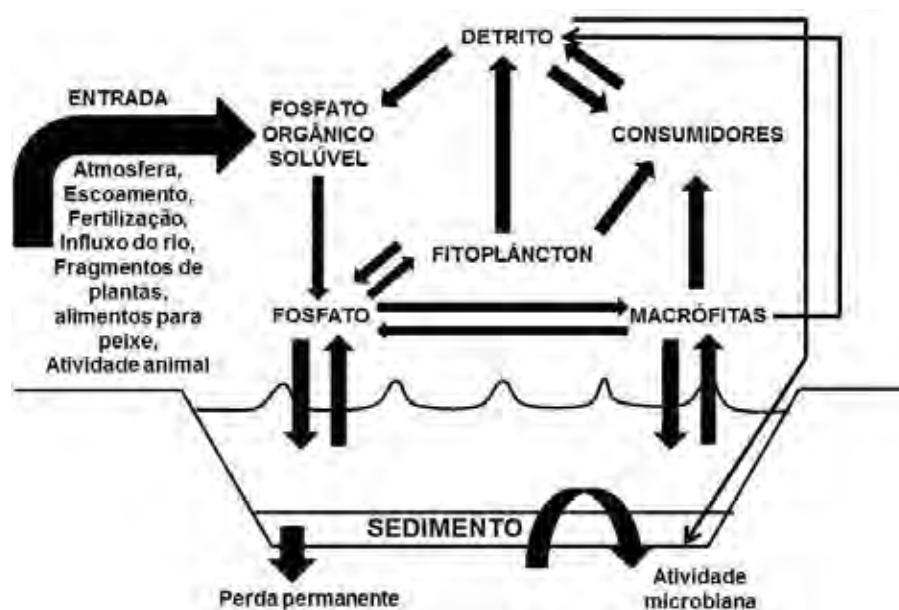


FIGURA 3. Esquema ilustrando em resumo o ciclo do fósforo na água. (Fonte: adaptada de Sipaúba-Tavares, 1995).

Este processo todo envolve a ação dos microrganismos presentes na coluna d'água e também no sedimento. A população microbiana no ciclo do fósforo assimila o nutriente dentro das moléculas biológicas e contribuem para transformações químicas do fósforo para o meio ambiente. A transformação do fósforo a partir dessa ação aumenta a biodisponibilidade do fósforo para o ecossistema, através da solubilização, desagregação e mineralização, assim como pode diminuir sua biodisponibilidade através da assimilação e formação mineral (MACKEY; PAYTAN, 2009).

A dinâmica dos nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) tem efeito direto na biota aquática, interferindo no crescimento e desenvolvimento dos organismos planctônicos e macrófitas (MILLAN, 2009).

2.3 Análise da diversidade microbiana por abordagem metagenômica

Metagenoma é o estudo dos genomas coletivos da microbiota total encontrada nos diversos ambientes da natureza (água, solo, sedimento), onde com essa estratégia consegue-se acessar muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo (HANDELSMAN et al., 1998).

Um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana foi dado com o advento de técnicas moleculares baseadas na análise do DNA de microrganismos retirado diretamente dos ambientes naturais sem a necessidade de multiplicação prévia das células (PACE et al., 1986). O emprego dessas técnicas (conhecidas como técnicas Metagenômicas) tornou-se possível a partir dos estudos de pioneiros nas análises de estruturas de comunidades microbianas, utilizando as informações da sequência de nucleotídeos do DNA ribossômico a partir de um DNA extraído de amostras de água e sedimentos de lagoas costeiras (BENLLOCH; RODRÍGUES-VALERA; MARTÍNEZ-MURCIA, 1995).

Esta técnica destaca-se por ser um importante campo de pesquisa desenvolvido ao longo das últimas décadas para elucidar os genomas de organismos não cultiváveis, tendo como objetivo compreender melhor a ecologia

microbiana global, além de impulsionar processos biotecnológicos para demandas de novos aditivos, enzimas e biomoléculas (SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007).

De acordo com Staley (1998), estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos. A abordagem do cultivo limitou, seriamente, a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997).

Várias técnicas de biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente têm contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais. Para contornar as limitações oferecidas pelo método padrão de cultivo, métodos moleculares baseados no isolamento e análise de ácidos nucleicos sem a necessidade do cultivo dos microrganismos têm sido desenvolvidos. Estes métodos tendem a complementar dados obtidos por métodos tradicionais de isolamento e cultivo, em ensaios de levantamentos e comparação da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (HUGENHOLTZ, et al. 1996).

Estratégias da metagenômica podem ser dirigidas para examinar a composição microbiana ou a questão mais ampla de combate à diversidade filogenômica de populações microbianas altamente complexas. Uma abordagem básica é identificar os micróbios de uma comunidade complexa por exploração de sondas universais e conservadas, tais como genes de *rRNA*, como por exemplo, *16S rRNA*, que é composto por regiões variadas e conservadas, conforme ilustra a figura 4 (PETROSINO et al., 2009). Muitos métodos diferentes, baseados na amplificação e comparação da sequência do *rRNA*, tem sido aplicados em amostras de diversos meio ambientes, incluindo água e sistema de águas residuárias (GILBRIDE; LEE; BEAUDETTE, 2006). Macedo (2012) utilizando o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* investigou as comunidades bacterianas em solos de mata nativa e outros cultivados com cana-de-açúcar. Paixão et al. (2010) analisaram a diversidade de microrganismos, também utilizando o gene *16S rRNA*, em um consórcio degradador de óleo diesel.

Perfis da comunidade microbiana utilizando cultivo independente usando genes *rRNA* são conduzidos; essas pesquisas moleculares são uma etapa preliminar antes da análise metagenômica. Para além da filogenética “o padrão ouro” dos genes *16S rRNA* (bactérias) e *18S rRNA* (eucariotos), outros genes catabólicos específicos têm também sido utilizadas para detectar as capacidades funcionais das comunidades microbianas na biodegradação dos poluentes. Um censo de comunidades microbianas em locais contaminados tem possibilitado aos pesquisadores ganhar vistas de grupos de microrganismos específicos que são sensíveis ou mais afetados, resiliente e pré-dominante, ou ativamente envolvidos em biorremediação (DESAI; PATHAK; MADAMWAR, 2010).

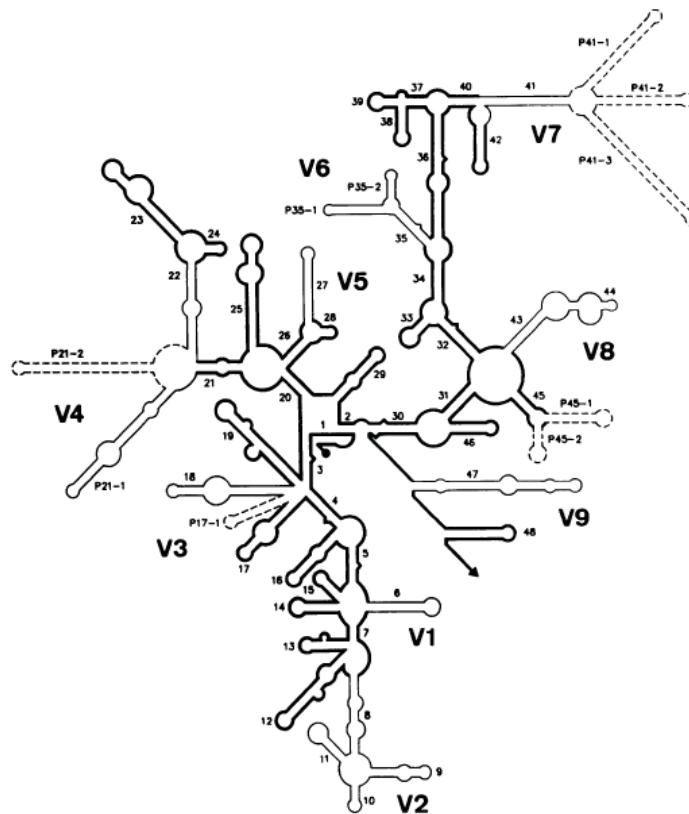


FIGURA 4. Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 à V9) (NEEFS et al., 1991).

3. Material e Métodos

3.1 Coleta de amostras de água

O Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) – Jaboticabal (21°15'S e 48°18'O e altitude média de 595 m) contém um total de 79 tanques sequenciais com fluxo contínuo de água, utilizados pelos setores de piscicultura, ranicultura e carcinicultura e de seis viveiros maiores com tamanho variando de 2.306m² a 5.671m² com profundidade média de 1,30m, conforme ilustrado na Figura 5. Exceto o primeiro viveiro que funciona como reservatório de água, os outros 5 viveiros são utilizados para prática de criação semi-intensiva de organismos aquáticos para fins de pesquisa. Os seis viveiros (V1- V6) estão dispostos sequencialmente, ou seja, a água de um viveiro fluiu diretamente para o outro, e também recebem água de outros viveiros e tanques menores de criação de organismos aquáticos usados pela nutrição, ranicultura, criação de peixes e setores da cultura de camarão.

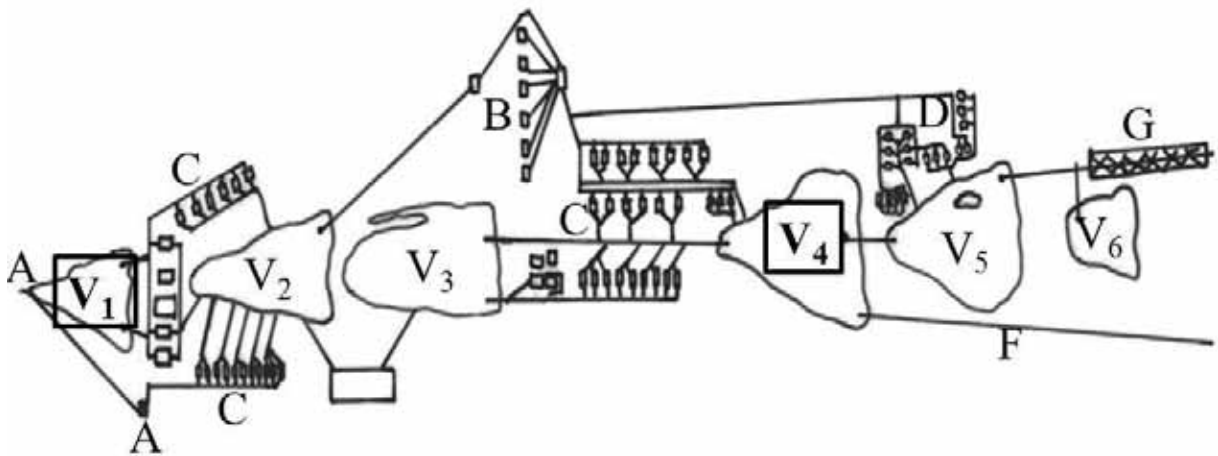


FIGURA 5. Sistema sequencial de viveiros de fluxo contínuo de água. A= nascentes; B= ranicultura; C= Tanques de peixes; D= Carcinicultura; F= Água subterrânea para abastecimento do Colégio Técnico Agrícola (CTA); G= *wetland*; V1-V6= viveiros (Fonte: adaptada de SIPAÚBA-TAVARES; GUARIGLIA; BRAGA, 2007).

Foram amostrados 2 viveiros neste sistema: V1= reservatório de água e V4 = viveiro eutrófico (SIPAÚBA-TAVARES; LOURENÇO; BRAGA, 2010), sendo os pontos de amostragem localizados nas saídas dos viveiros. As coletas foram realizadas em duas épocas distintas, seca (Julho e Agosto/2012) e chuva (Janeiro e Fevereiro/2012). O viveiro utilizado como reservatório é coberto por macrófitas aquáticas representadas principalmente por *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth e *Salvinia auriculata* Aublet que funcionam como filtro biológico. Desde 1995, este viveiro é utilizado como reservatório de água para o sistema de aquicultura do CAUNESP, utilizando água das nascentes (total de 15), entretanto atualmente o V1 tem grande aporte de material orgânico proveniente de outros setores da Universidade (SIPAÚBA-TAVARES; LOURENÇO; BRAGA, 2010; DIAS; SIPAÚBA-TAVARES, 2012). O viveiro 4 apresenta uma área de 4.351m² e recebe uma carga muito elevada de material alóctone proveniente dos tanques e viveiros localizados acima, como também da ranicultura que deságua a água de lavagem de fezes e restos alimentares diretamente neste viveiro sem tratamento prévio. Há neste viveiro uma saída de água que vai abastecer o setor de piscicultura do Colégio Agrícola (CTA).

O clima da região, segundo classificação de Köpen é do tipo Cwc, subtropical, relativamente seco no inverno com chuvas no verão, apresentando temperatura média anual de 22°C e precipitação média anual de 1.552 mm (PEEL et al., 2007). Todas as coletas foram feitas por volta das 8 h da manhã em função do ciclo do oxigênio e na coluna d'água.

3.2 Análise das variáveis limnológicas

As análises de variáveis limnológicas foram realizadas no Laboratório de Limnologia do CAUNESP.

Para tais análises, coletou-se água de superfície na saída dos viveiros V1 e V4 em 3 subréplicas com o auxílio da garrafa de Van Dorn (1 L). As amostras de água que foram estocadas em frascos de polietileno previamente limpos e congeladas para posterior análise de nutrientes. A temperatura (Temp), pH,

condutividade (Cond) e oxigênio dissolvido (OD) foram medidos no local com sonda Horiba U-10. As análises de fósforo total (PT), ortofosfato (OP), nitrato (NO₃), nitrito (NO₂) e amônia (NH₄) foram determinados de acordo com Golterman et al. (1978) e Koloreff (1976), através de espectrofotometria.

Utilizou-se ANOVA simples para comparar os parâmetros físicos e químicos da água dos viveiros (V1 e V4) e também os períodos climáticos (seca e chuva) (SOKAL; ROHLF, 1981) através do programa Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

3.3 Extração de DNA metagenômico e amplificação do gene *16S rRNA*

Para as análises moleculares, amostrou-se 5 L de água armazenadas em recipientes previamente desinfetados. Imediatamente após a coleta as amostras de água foram filtradas duas vezes. A primeira filtração ocorreu em papel filtro, para retirada de impurezas grosseiras, e a segunda ocorreu em membrana de 0.22 µm, onde o resíduo retido na membrana foi utilizado para a extração de DNA Metagenômico.

A extração do DNA metagenômico foi realizada utilizando-se o kit UltraClean™ Water DNA Isolation kit (0.22µm) (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad – CA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com algumas adequações, que no caso foi uma filtração a mais para retirada de impurezas grosseiras, em seguida o filtrado foi submetido à filtração à vácuo em membrana de 0,22µm, como recomendado pelo kit. A extração do DNA foi realizada a partir das células presentes na membrana onde a água foi filtrada, com o auxílio de *beads* e soluções de lise (*Beads Solution, WD1*).

A qualidade do DNA extraído foi medida através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X(Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3) contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, com 3µL do padrão 1Kb ladder (Invitrogen), 80V durante 1 hora (Figura 6). Após a eletroforese o gel foi analisado em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, USA). O DNA metagenômico foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Uniscience).

O DNA metagenômico extraído foi utilizado para amplificação do gene *16S rRNA* por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores, específicos para a região V3 do gene *16SrRNA* (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991):

Y1-F (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3')

Y2-R (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')

A reação de PCR foi realizada utilizando-se 60 ng de DNA metagenômico, Tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 1,5mM de $MgCl_2$ 0,2 mM de dNTP, 10 pmols de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,8U de Taq DNA polimerase e água ultra pura para completar o volume final de 20 μ L na reação. A reação foi realizada em um o termociclador Mastercycle gradiente (Eppendorf), com o perfil térmico: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C, seguidos por uma incubação final a 72°C por 5 minutos. Os *amplicons* gerados (com aproximadamente 300 pb) foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X(Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3), contendo 0,5 μ g mL⁻¹ de brometo de etídeo (Figura 7). A eletroforese se processou por 90 minutos a 80 Volts e o gel foi visualizado em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, USA).

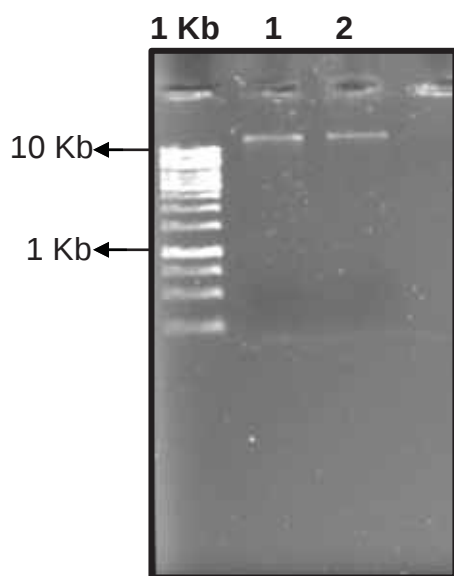


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA metagenômico da água de viveiros de piscicultura. 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) amostra de V1, (2) amostra de V4.

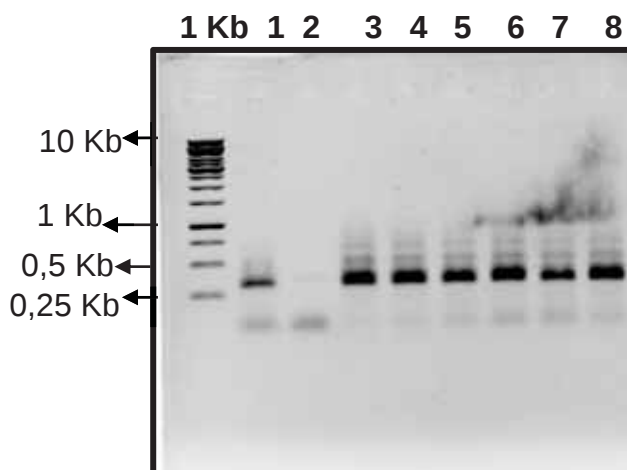


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do gene *16S rRNA*. 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) controle positivo, (2) controle negativo, (3, 4, 5) repetições do *amplicon* de V1, (6, 7, 8) repetições do *amplicon* de V4.

3.4 Eluição dos produtos de PCR

Após amplificação, o produto de PCR foi submetido a uma eletroforese preparativa em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1,5% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA).

A região do gel contendo insertos de tamanho 300 pares de base (pb) foi marcada e cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo depositada em tubos de 1,5 mL. Posteriormente para a eluição do gel utilizou-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), seguindo o protocolo conforme instruções do fabricante.

O DNA obtido (Figura 8) foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), com a finalidade de quantificação e visualização da qualidade deste DNA recuperado. E também quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Uniscience).

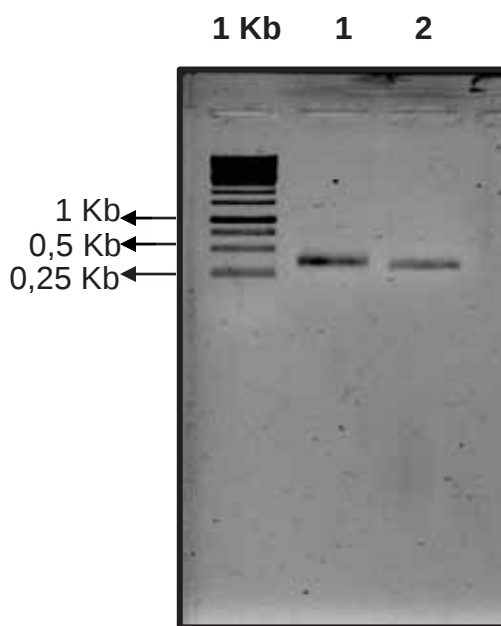


FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 1,0 % da purificação dos *amplicons*. 1 Kb (Fermentas) – padrão de tamanho molecular. (1) *amplicon* purificado das amostras de V1, (2) *amplicon* purificado das amostras de V4.

3.5 Clonagem em vetor pJET 1.2/blunt

A clonagem dos fragmentos de 16S *rRNA* amplificados da amostra de DNA metagenômico foi realizada de forma aleatória utilizando-se o kit comercial CloneJET™ PCR Cloning (Fermentas) seguindo as instruções do fabricante. Onde dos dois tipos de protocolos oferecidos, optou-se por realizar o *Sticky-End Cloning*.

Para cada reação, foi necessário aproximadamente 150 ng.μL⁻¹ dos amplicons, e depois todos os reagentes do próprio kit sem alterar a quantidade em volume e concentração dos mesmos.

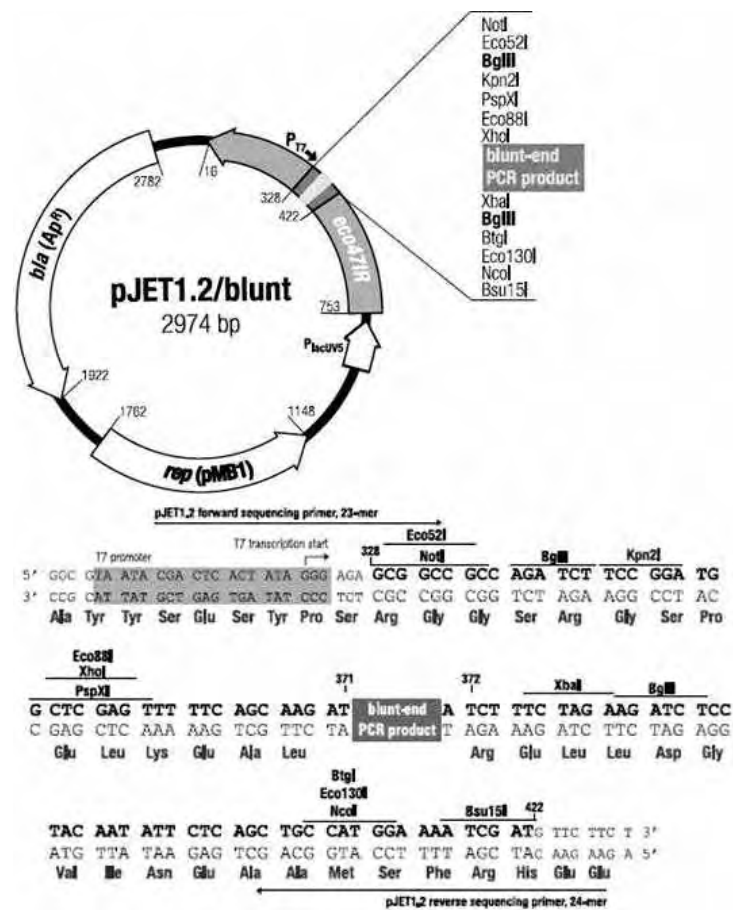


FIGURA 9. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pJET1.2/blunt (Fermentas).

3.6 Transformação das células competentes

Na etapa de transformação, foram utilizadas células quimicamente competentes utilizando solução de CaCl_2 de *E. coli* DH10B, previamente preparadas usando a estirpe e protocolo fornecido pelo Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, Laboratório de Biologia Molecular – Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP Jaboticabal.

A bactéria *E. coli* DH10B (proveniente de estoque mantida em freezer -80°C com glicerol) foi colocada em placas de Petri contendo meio de cultura sólido LB acrescido de $30\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina para obtenção de colônia isolada. A placa ficou em estufa tipo B.O.D. à 37°C por 20 horas.

Após incubação, verificou-se a colônia mais isolada na placa, e a mesma foi inoculada com 15 mL de meio LB acrescido de $30\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, em erlenmeyer de 50 mL). E posteriormente houve incubação à 37°C por 16 horas, e agitação de 250 rpm em agitador vertical.

Feito o pré-inóculo, 4 mL do mesmo foi colocado em 400 mL de meio LB acrescido de $30\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina em erlenmeyer de 2000 mL. O inóculo foi incubado nas mesmas condições de temperatura e agitação que o pré-inóculo até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}}$ entre 0,370 – 0,450.

Atingido o valor necessário, o erlenmeyer contendo a cultura foi colocado em gelo por aproximadamente 10 minutos, para parar o crescimento.

Passado o tempo, transferiu-se todo o volume da cultura para tubos de centrífuga de 450 mL, sendo que os mesmos permaneceram em gelo por mais 10 minutos e posteriormente foram centrifugados durante 10 minutos, a 10000 rpm, a 4°C em centrífuga previamente resfriada. Ao final o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado de bactéria foi então ressuspensionado em 100 mL de solução gelada (mantida à -4°C) de CaCl_2 . A ressuspensão aconteceu de forma lenta e no gelo, agitando-se o frasco gentilmente. Após a ressuspensão completa do precipitado, as bactérias foram lavadas por centrifugação por 10 minutos, 10000 rpm e à 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento

bacteriano foi ressuscitado em 10 mL de solução gelada de CaCl_2 com agitação suave. Esse procedimento foi repetido e o precipitado final de bactérias foi então ressuscitado em 4 mL de solução de CaCl_2 gelada. Terminado o processo, aliquotou-se 50 μL da suspensão em tubos eppendorf (mantido previamente gelados) e armazenou-se imediatamente a -80°C . A eficiência das células foi medida por clonagem do vetor pUC 18 (10ng).

Após a verificação da eficiência das células competentes, prosseguiu-se com a clonagem dos *amplicons* seguindo o protocolo *Sticky-End Cloning* fornecidas pelo fabricante do kit de clonagem CloneJet (Fermentas), no qual foi utilizado aproximadamente uma concentração de 150 ng de cada fragmento amplificado em uma reação com volume total de 20 μL . No final do procedimento, após a transformação com as células competentes feitas previamente, houve inoculação dos transformantes em meio LB sólido acrescido de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e em seguida, encubados em estufa tipo B.O.D. à 37°C por 20 horas.

3.7 Coleta de Clones Transformantes

Todas as colônias transformantes observadas foram coletadas com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem. Os clones foram organizados em multiplacas com 96 poços contendo 100 μL de meio líquido LB (acrescido de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina) e cultivados em estufa tipo B.O.D., a 37°C , durante 20 horas. Após esse período foi adicionado aos cultivos 100 μL de glicerol 40% (v/v) estéril, as placas foram seladas com adesivos e armazenadas a -80°C para posterior utilização na extração dos plasmídeos.

3.8 PCR de validação dos clones

Para validação do procedimento de clonagem, colocou-se 20 μL de uma solução tampão de lise (KCl [50mM]; Tween 20 0,1%; Tris-HCl [10mM], pH 8,3) em 15 tubos de 0,2 mL, em cada tubo adicionou-se uma colônia de transformante

escolhida aleatoriamente, os tubos foram submetidos a um aquecimento de 95°C durante 30 minutos. Posteriormente, realizou-se uma PCR utilizando como DNA molde, a solução de lise contendo a colônia. Essa reação continha: 4 µL de DNA molde, Tampão PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl], 2mM de MgCl₂ [50mM], 0,2 mM de dNTP [10mM], 5 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador do vetor (pJET 1.2 F e pJET 1.2 R), 0,5U de Taq DNA polimerase e água ultra pura para completar o volume final de 20µL na reação. Para isso, foi utilizado, o termociclador, Mastercycle gradiente (Eppendorf), com o perfil térmico: 5 minutos a 95°C , 35 ciclos de 45 segundos a 95°C , 45 segundos a 65°C e 90 segundos a 72°C, seguidos por uma incubação final a 72°C por 5 minutos. Os produtos gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3), contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo e visualizados em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, USA).

3.9 Cultivo dos Clones Bacterianos e Extração do DNA Plasmidial

Os clones foram cultivados em *plates* (Eppendorf) contendo 1,2 mL de meio LB com 100 µg/mL ampicilina, com agitação contínua de 220 rpm, à 37°C, durante 20 horas. Após o cultivo, os clones foram centrifugados durante 6 minutos, temperatura ambiente à 4000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e a placa invertida em papel absorvente durante 5 minutos.

Posteriormente o *plate* contendo as células, foi levado ao equipamento epMOTION 5075 (Eppendorf), no qual foi realizada a extração de DNA Plasmidial automatizada, utilizando-se o kit Wizard® MagneSil® Plasmid Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

No processo, primeiramente as células são ressuspensas na solução *Cell resuspension*, em seguida o material sofre lise através da *Cell lysis solution*. Após essa etapa a solução é neutralizada com *Neutralization solution*. O processo utiliza *beads* magnéticas, há duas soluções na qual o material é tratado, primeiramente na *MagneSil blue* para retirada de impurezas como, por exemplo, proteínas e RNA, e

em seguida na *Magnasil red* que captura o DNA purificado. Após esses passos o DNA é lavado com etanol 80%, ocorrendo posterior evaporação do mesmo por aproximadamente 30 minutos, e para terminar o processo, utilizando *Elution buffer*, o DNA é eluído em 50 μL .

Após a extração as amostras foram concentradas do volume de 55 μL para 20 μL e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3), contendo 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídeo, por uma hora e meia a 100v.

O perfil plasmidial dos clones foi avaliado em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, USA). E sua concentração medida através de espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Uniscience).

3.10 Sequenciamento dos Clones

As reações de PCR para o sequenciamento dos insertos bacterianos foram realizadas em microplacas nas seguintes condições: 1 μL de BigDye Terminator; 5 pmoles do oligonucleotídeo iniciador pJET 1.2 Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'); 4 μL de tampão (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl_2 ; 200), 100 ng de DNA plasmidial; água milli-Q esterilizada para completar o volume final para 10 μL . As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador seguindo o programa: 2 minutos por 96°C, 25 ciclos (10 segundos por 96°C, 10 segundos por 52°C e 4 minutos por 60°C).

Após a reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA foram precipitados e os ddNTPs marcados por fluorescência não incorporados foram retirados por sucessivas lavagens. Para a precipitação do DNA amplificado foram adicionados 80 μL de isopropanol 75% (v/v) às amostras; as placas foram agitadas, cuidadosamente, em vortex por alguns segundos, incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 20°C por 45 minutos, a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e 150 μL de etanol 70% (v/v) foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 10 minutos na mesma temperatura e força centrífuga descrita anteriormente, e os sobrenadantes foram descartados. As

placas foram secas durante 30 minutos em suave fluxo de ar, na ausência de luz. No momento da aplicação no sequenciador, as amostras foram ressuspensas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI PRISM), submetidas à desnaturação por 5 minutos, a 95°C. O sequenciamento foi realizado em um aparelho de capilar modelo 3100 DNA Analyzer ABI Prism.

3.11 Análise das Sequencias

Após o sequenciamento, os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Phred/Phrap (EWING et al. 1998a; EWING; GREEN, 1998b) usado na detecção da confiabilidade de cada base sequenciada. Com o auxílio de outro programa, ContGEN, foram selecionadas somente aquelas sequências que apresentaram mais de 200 bases com qualidade Phred.

As sequências foram comparadas com o banco de dados de genes ribossomais do Ribosomal Database Project II (COLE, et al. 2009), por meio do programa Classifier (WANG, et al., 2007) utilizando confiabilidade de 80%, que seguindo a proposta do Manual *Bergey's Trust*, classifica os níveis taxonômicos em Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. E também da ferramenta LibCompare (COLE et al., 2009) com confiabilidade de 80%, para comparação das sequências das bibliotecas com identificação das significativamente diferentes. Para as análises das relações filogenéticas, as sequências distintas foram alinhadas usando o programa ClustalX 1.83 (THOMPSON et al. 1997). O resultado do alinhamento serviu para construir uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist (FALSENSTEN, 1989), e esta matriz foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005) para análise de suficiência amostral da diversidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises limnológicas realizadas forneceram auxílio na caracterização física e química da água em cada viveiro nos diferentes períodos amostrados. Com os resultados obtidos, através de análise estatística, construiu-se uma tabela onde através dos valores obtidos pode-se verificar a concentração dos nutrientes em cada viveiro de acordo com a época amostrada, como mostrado na Tabela 1.

De modo geral verificou-se que as variáveis analisadas foram diferentes nos dois viveiros e também nos períodos climáticos. Os valores de V4 são maiores que os encontrados em V1 em função da carga que ele recebe.

Segundo os resultados tem-se que a menor concentração de nutrientes é encontrada em V1 e pode ser explicada por vários fatores. Um deles é a grande diversidade e quantidade de macrófitas aquáticas presentes neste viveiro, as quais podem funcionar como biofiltro capturando nutrientes do ambiente principalmente os fosfatados (SIPAÚBA-TAVARES, 2000). Além disso, em V1 não há cultivo de organismos aquáticos e, portanto os metabólitos animais são baixos e não existe disponibilização de nutrientes decorrente do uso de rações. Por outro lado, em V4, considerado eutrófico (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2010), a concentração de nutrientes foi maior por conta da descarga de efluentes oriundos da ranicultura e dos viveiros de piscicultura anteriores. Tais fatos promoveram aumento da quantidade de nutrientes na coluna d'água de V4, em especial nas formas de nitrogênio e fósforo.

Em um sistema sequencial com fluxo contínuo de água, o aumento de amônia no período chuvoso provavelmente ocorreu devido às chuvas características desta época do ano. Sipaúba-Tavares, Guariglia e Braga (2007) demonstram que o efeito das chuvas aumentou o fluxo de água nos viveiros e conseqüentemente, carreando material particulado e dissolvido de um viveiro para outro e, promovendo um aumento das variáveis limnológicas em direção aos viveiros finais, no caso V4. De acordo com Macedo e Sipaúba-Tavares (2010) o crescimento da aquicultura tem acelerado o processo de eutrofização das águas e gerado a necessidade de estudos dos efluentes provenientes da criação de peixes, já que esses organismos, através de seu metabolismo excretam amônia para o ambiente aquático.

Tabela 1. Análises físicas e químicas das amostras de água dos viveiros V1 e V4 coletadas nos períodos de chuva (C) e seca (S).

Variáveis	V1-C	V1-S	V4-C	V4-S
pH	4,7±0,2 ^d	6,5±0,5 ^b	5,7±0,2 ^c	7,2±0,4 ^a
Cond	40,0±0,1 ^b	36±0,5 ^b	103,5±6,7 ^a	103,8±3,9 ^a
Temp	23,4±0,3 ^b	19,0±0,3 ^d	26,6±0,8 ^a	20,9±0,6 ^c
OD	1,4±0,2 ^b	2,4±1,2 ^b	2,7±0,5 ^b	6,6±1,5 ^a
NO2	5,0±2,7 ^c	8,2±4,7 ^c	36,9±9,4 ^b	78,9±15,3 ^a
NO3	322,2±56,8 ^a	190,1±73,4 ^b	308,3±60,4 ^a	379,9±63,2 ^a
NH4	61,2±34,2 ^c	25,4±18,6 ^c	439,3±95,6 ^a	156,5±29,3 ^b
OP	ND	7,8±3,5 ^b	11,2±10,5 ^b	56,0±12,2 ^a
PT	11,6±21 ^c	42,1±35,6 ^c	96,7±26,1 ^b	214,8±18,0 ^a

V1-C: Viveiro 1 período chuvoso; V1-S: Viveiro 1 período de seca; V4-C: Viveiro 4 período chuvoso; V4-S: viveiro 4 período de seca; NO2: nitrito; NO3: nitrato; NH4: amônia e amônio; OP: ortofosfato; PT: fósforo total. Método ANOVA simples, com media e desvio padrão. Teste de Tukey.

A construção de bibliotecas de diversidade utilizando o gene *16S rRNA* teve como objetivo comparar as possíveis diferenças entre as comunidades bacterianas presentes no viveiro 1 (V1) e no viveiro 4 (V4) em dois períodos climáticos distintos, compreendendo os períodos de seca e chuvas.

Clones das bibliotecas V1-C (viveiro 1 no período de chuvas), V1-S (viveiro 1 no período de seca), V4-C (viveiro 4 no período de chuvas) e V4-S (viveiro 4 no período de seca) foram sequenciados e analisados utilizando ferramentas de bioinformática.

Para cada biblioteca, sequenciou-se um número diferente de clones:

- V1-C (correspondente às amostras de DNA da água do viveiro 1 coletadas no período chuvoso): 288 clones;
- V1-S (correspondente às amostras de DNA da água do viveiro 1 coletadas no período de seca): 384 clones;
- V4-C (correspondente às amostras de DNA da água do viveiro 4 coletadas no período chuvoso): 288 clones;
- V4-S (correspondente às amostras de DNA da água do viveiro 4 coletadas no período chuvoso): 384 clones.

Após sequenciar todas as amostras, os eletroferogramas que de acordo com o programa Phred/Phrap Consed apresentaram sequencias confiáveis com mais de 200 bases com qualidade Phred, foram analisadas e comparadas no banco de genes ribossomais (RDP II), utilizando as ferramentas *Classifier* e *Library Comparison* (*LibCompare*), com um *threshold* de 80%. Só foram levadas em consideração as sequencias que apresentaram 100% de confiabilidade no domínio bactéria, as menores automaticamente pelo banco de dados foram consideradas bactérias não-classificadas.

Para a biblioteca V1-C, dos 288 clones sequenciados, apenas 95 sequencias apresentaram-se confiáveis e foram analisados pelo RDP. Já para a biblioteca V1-S, dos 384 clones sequenciados, apenas 137 sequencias foram utilizadas nas análises. De acordo com os dados gerados pela ferramenta *Classifier* pode-se construir os gráficos comparativos abaixo. A Figura 10 demonstra a comparação entre os filos mais encontrados enquanto a Figura 11 mostra a comparação entre as classes mais encontradas nas bibliotecas.

Como pode ser visto nos gráficos, de acordo com cada período climático, se sobressaiu uma população bacteriana característica. De um modo geral, encontrou-se 7 filos: Actinobacteria, Bacterioidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Synergistetes e TM7.

Utilizando a ferramenta *LibCompare* do RDP com confiabilidade de 80%, pode-se verificar a diferença significativa de cada biblioteca analisada. A Figura 12 mostra qual o filo mais significativo.

Como filo predominante nas duas épocas tem-se as Proteobacterias, que no período chuvoso apareceu em maior frequência do que na seca. Este filo, de acordo com a análise da ferramenta *LibCompare* foi considerado também o mais significativo. Na Tabela 2, é mostrado a distribuição das Proteobacterias encontradas em cada biblioteca do viveiro 1.

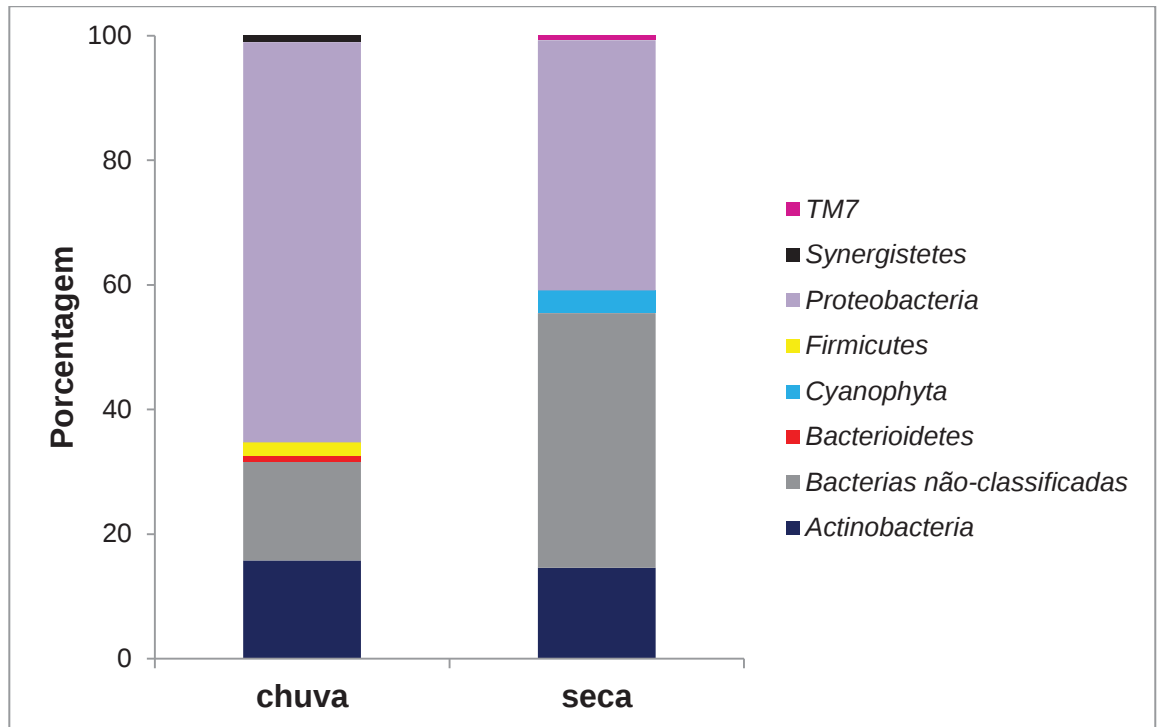


FIGURA 10. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.

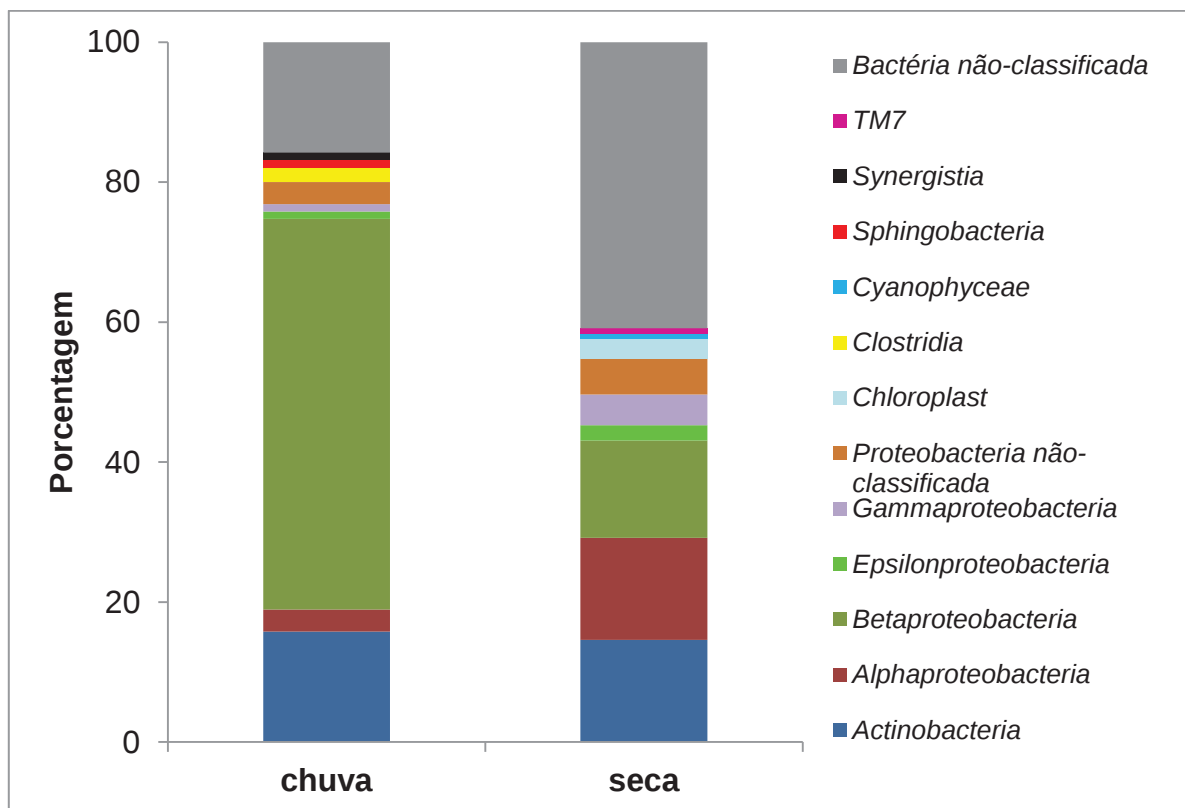


FIGURA 11. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.

Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	TM7	0.7	
	0.0	Cyanobacteria/Chloroplast	3.6	
	1.1	"Bacteroidetes"	0.0	
	1.1	"Synergistetes"	0.0	
	2.1	Firmicutes	0.0	
	15.8	"Actinobacteria"	13.9	
	64.2	"Proteobacteria" *	40.1	
	15.8	unclassified Bacteria	40.9	

(* = significantly different at 0.01)

FIGURA 12. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do viveiro 1. *Library 1* corresponde ao período de chuvas e *Library 2* ao período de seca.

Tabela 2. Distribuição das Proteobacterias encontradas em cada biblioteca do viveiro 1 nos períodos distintos, seca (S) e chuva (C).

CLASSE	ORDEM	GÊNERO	BIBLIOTECA
β-Proteobacteria	Rhodocyclales	<i>Dechloromonas</i>	V1-S
		Não-classificado	V1-S/V1-C
	Burkholderiales	<i>Polynucleobacter</i>	V1-C/V1-S
		<i>Pseudorhodoferax</i>	V1-C/V1-S
		<i>Macromonas</i>	V1-C
		<i>Limnohabitans</i>	V1-C/V1-S
		<i>Inhella</i>	V1-S
		<i>Ideonella</i>	V1-S
		<i>Piscinibacter</i>	V1-S
		<i>Curvibacter</i>	V1-S
		<i>Pelomonas</i>	V1-S
α-Proteobacteria	Rhizobiales	<i>Labrys</i>	V1-S
		<i>Bradyrhizobium</i>	V1-S

Segundo Newton e colaboradores (2011) as Proteobacterias são um grupo de bactérias gram-negativas abrangendo a maioria dos organismos reconhecidos na agricultura e industrialmente. De modo geral, as Proteobacterias residentes em água doce são competitivas sob baixas condições de nutrientes/substrato porém também

são capazes de degradar compostos orgânicos complexos, além de participar do ciclo do nitrogênio.

No período de chuvas, observou-se maior presença de β -Proteobacterias, apesar de haver também uma porção, porém menor, de α , γ e ϵ -Proteobacterias assim como Proteobacterias não-classificadas. Já no período de seca, pode-se dizer que houve um equilíbrio entre as α e β -Proteobacterias encontradas, pois pode-se observar que essas classes foram as que predominaram no ambiente. Observando-se também a presença, porém em menor frequência de γ e ϵ -Proteobacterias quando comparada as outras classes referentes a esse filo no mesmo período, porém comparando-se as γ e ϵ -Proteobacterias em V1-S com as encontradas em V1-C, percebe-se que as mesmas estão em maior frequência em V1-S. As Proteobacterias não-classificadas nessa época apareceram em maior quantidade.

A diferença significativa envolvendo as Proteobacterias está nas classes encontradas. Nas β -Proteobacterias encontradas, percebeu-se a presença das ordens Rhodocyclales e Burkholderiales, com uma grande presença de β -Proteobacterias não-classificadas nas amostras de V1-C e nenhuma em V1-S. Dentre as bactérias classificadas na ordem Rhodocyclales o gênero *Dechloromonas* foi encontrado apenas em V1-S, apesar da maior frequência ser na época de chuvas, nesse caso não foi possível classificar nenhum gênero.

A ordem Burkholderiales, foi encontrada com maior frequência no período de chuvas, dentre os gêneros encontrados estão *Polynucleobacter*, *Pseudorhodoferax*, *Macromonas* e *Limnohabitans*. Já no período de seca os gêneros são: *Inhella*, *Ideonella*, *Piscinibacter*, *Polynucleobacter*, *Curvibacter*, *Pelomonas*, *Pseudorhodoferax* e *Limnohabitans*.

Nas α -Proteobacterias encontradas, percebeu-se a presença das ordens Sphingomonadales, Rhodobacterales e Rhizobiales, apenas no período de seca. As α -Proteobacterias não-classificadas em gênero foram encontradas nos dois períodos climáticos.

As β -Proteobacterias, encontradas em abundância na entrada de água do sistema no período de chuvas, são as bactérias mais abundantes em água doce. Profundidade, pH, preferência para carbono como substrato e fatores sazonais são

características conhecidas que ajudam a diferenciar os organismos dentro desse filo (NEWTON et al., 2011).

O gênero *Polynucleobacter* foi primeiramente descrito como uma bactéria endossibiontica obrigatória de ciliados (HECKMANN; SCHMIDT, 1987). Muitos grupos são encontrados em água doce de ambientes tropicais ou mesmo subtropicais (NEWTON et al., 2011). Muitas espécies desse gênero têm sido encontradas e isoladas de diversos habitats de água doce da Europa, América do Sul, África e Oceania. São organismos quimiorganotróficos, aeróbios e anaeróbios facultativos (HAHN et al. 2010a).

Hahn et al. (2010b) descreveram um isolado de *Limnohabitans* de um viveiro de água doce no Brasil, caracterizando-o como quimiorganotrófico, aeróbio, anaeróbio facultativo, oxidase e catalase positivo. Kasalicky et al. (2010) também descrevem duas espécies desse gênero isoladas de reservatórios de água doce. Segundo os autores supracitados, as características apresentadas para esses isolados são gerais para o gênero *Limnohabitans*.

Bruland e colaboradores (2009) descrevem dois isolados do gênero *Pseudorhodoferrax* como sendo aeróbios, oxidase e catalase positivo, não reduzem nitrato, produzem urease e protease, e podem assimilar D-manitol, gluconato, malato, acetato, frutose.

O predomínio dessa classe na época de chuvas deve-se ao fato da grande quantidade de matéria orgânica no ambiente, resultado da presença de muitas macrófitas aquáticas em estado de decomposição. O que é comprovado também pelos resultados mostrados na Tabela 1, onde nesse viveiro na época citada, há elevados valores de condutividade, indicando que no local há um alto grau de decomposição.

No período de seca, pode-se dizer que houve um equilíbrio entre as α e β -Proteobacterias encontradas, pois se observa que essas classes foram as que predominaram no ambiente. Observando-se também a presença, porém em menor frequência de γ e ϵ -Proteobacterias. As Proteobacterias não-classificadas nessa época apareceram em maior quantidade.

As α -Proteobacterias estão no centro global do ciclo do nitrogênio, contendo muitos membros simbiotes facilitam a fixação do nitrogênio atmosférico em plantas.

Em água doce são onipresentes, embora menos numerosas, porém em ecossistemas marinhos são dominantes (NEWTON et al., 2011).

Dentre os gêneros mais encontrados desse filo na entrada de água do sistema no período de secas tem-se *Labrys* (ordem Rhizobiales, família Xanthobacteraceae) e *Bradyrhizobium* (ordem Rhizobiales, família Bradyrhizobiaceae).

De acordo com o descrito por Carvalho et al. (2008), um isolado da bactéria do gênero *Labrys* possui capacidade de degradar fluorobenzeno em sedimentos contaminados por resíduos industriais no norte de Portugal. Inui-Kishi et al. (2012), em seus estudos mostrou que bactérias desse gênero podem ser utilizadas para biorremediação, e também são solubilizadoras de fosfato.

O gênero *Bradyrhizobium* é caracterizado por participar na fixação de nitrogênio (SOUZA et al. 2012). Assim como as β -Proteobacterias do gênero *Ideonella* (NOAR; BUCKLEY, 2009), *Curvibacter* (DING; YOKOTA, 2004), *Pelomonas* por sua capacidade de reduzir nitrato (GOMILA et al., 2007) e a quimioheterotrófica aeróbia obrigatória *Inhella*, no qual algumas espécies também possuem capacidade de reduzir nitrato (JAEHO et al. 2009).

De modo geral, as α -Proteobacterias de água doce são competitivas quando há baixa concentração de nutrientes/disponibilidade de substrato, tendo habilidade para competir por substratos orgânicos e inorgânicos, são capazes de degradar compostos orgânicos complexos, incluindo compostos orgânicos recalcitrantes como substâncias húmicas (NEWTON et al., 2011). E também esse grupo está distribuído pelo globo, em lagos, sendo de água doce ou não, já que possuem grande capacidade de adaptação, podendo variar sua abundância de acordo como tempo de retenção do lago, e também havendo alta frequência do grupo no verão (tempo seco) e outono (NISHIMURA; NAGATA, 2007).

No viveiro estudado há mais de uma espécie de macrófitas aquáticas, e cada uma possui um ciclo de vida diferenciado, e também uma capacidade diferente para assimilar nutrientes. De acordo com resultados obtidos por Dias (2012) no viveiro em análise, as macrófitas apresentam competição entre as espécies e um teor diferenciado de matéria orgânica, o que influenciou nas comunidades de Proteobacterias encontradas no viveiro, nos diferentes períodos climáticos

analisados. Além do que de acordo com trabalho de Sipaúba-Tavares (2006), a presença de macrófitas submersas no viveiro utilizado como abastecimento de água para sistema de piscicultura influencia a dinâmica dos nutrientes na água, alterando desta forma, toda dinâmica limnológica deste viveiro, e como já demonstrado neste trabalho há também alteração microbiológica.

Glöckner et al. (2000) em um estudo inicial agruparam as α -Proteobacterias em seis grupos filogenéticos: αI , αII , αIII , αIV , αV e αVI , no qual de acordo com seus resultados apresentados, os grupos αII , αIV , αV são realmente de origem de água doce, já os outros apresentaram outras origens, como por exemplo, solos. De acordo com Newton et al. (2011) o αI , inclui os *Rhizobiales*, e o αII os *Caulobacter* e *Brevundimonas*, linhagens comumente encontradas em clones de bibliotecas de água doce.

Como segundo filo predominante tem-se as Actinobacterias, que não variaram significativamente nas duas épocas analisadas. Porém, observando o gráfico de comparação de classes, percebe-se que as Actinobacterias presentes em V1-C estiveram em equilíbrio juntamente com as α e β -Proteobacterias encontradas no período de seca.

Há estudos (NEWTON et al., 2011; ZWART et al., 2002; GLÖCKNER et al. 2000) que a abundancia desse grupo em água doce está associada com as propriedades físicas e químicas do local de estudo. Historicamente, o solo foi considerado o primeiro ambiente de residência e com ótima atividade para as Actinobacterias. Porém com o advento de estudos envolvendo biologia molecular de sistemas aquáticos, essa percepção mudou. Revelou-se, a partir de estudos do gene *16S rRNA*, que as Actinobacterias eram comuns e componente numericamente importante de uma variedade de habitats de água doce (NEWTON et al., 2011; ZWART et al., 2002).

As Actinobacteria são capazes de crescer em ambientes com baixos valores de pH e elevadas concentrações de metais pesados, nitrato e matéria orgânica (BOLLMANN et al., 2010). De acordo com Hahn et al. (2003), as bactérias desse filo são resistentes a predação por outros microrganismos.

Em um estudo feito por Fierer e Jackson (2006) sobre a diversidade e biogeografia das comunidades bacterianas nos solos, relataram que o pH de um

ecossistema é muitas vezes um controlador mestre da composição da comunidade bacteriana, e segundo Newton et al. (2011), foi identificado como sendo um dos principais fatores da presença e distribuição do filo das Actinobacteria.

Houve aparecimento de populações em menor frequência, que apareceram ou em V1-C ou em V1-S, e não nos dois períodos simultaneamente, como as descritas até agora. Obteve-se como filos únicos em V1-C: Bacterioidetes, Firmicutes e Synergistetes.

Os Bacterioidetes tem um significativo papel na degradação de matéria húmica (HUTALLE-SCHMELZER et al., 2010). O filo Firmicutes é comumente encontrado no sedimento de água doce (NEWTON et al., 2011). Os dois ambientes analisados são rasos (aproximadamente 1m de profundidade), portanto é possível dizer que há uma interação entre a coluna d'água e o sedimento, que retém toda matéria orgânica.

O filo Synergistetes, encontrado apenas em V1-C, foi descoberto recentemente e ainda é pouco caracterizado. Segundo Bhandari e Gupta (2012), são conhecidas algumas espécies gram-negativas que possuem habilidade para fermentar aminoácidos, porém não é uma simples característica que pode definir este grupo. De acordo com Marchandin et al. (2010), é um filo que tem sido bastante encontrado em ecossistemas e na microflora dos mamíferos por métodos independentes de cultivo. Segundo os autores supracitados, esses organismos possuem um papel funcional na microbiota humana, podendo nesse grupo haver bactérias patogênicas oportunistas.

Em V1-S, os filos considerados únicos da época são: Cyanophyta e TM7. As Cianobacterias estão relacionadas com a fixação de nitrogênio na água, algumas espécies aquáticas possuem heterocistos que são dedicadas exclusivamente à fixação de nitrogênio. Essas bactérias juntamente com outras que não possuem heterocistos, mas fixam nitrogênio, desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes em lagos, viveiros (NEWTON et al., 2011). Porém, algumas espécies de Cianobacterias são consideradas um transtorno para os organismos, pois possuem a capacidade de formar uma matéria flutuante e liberam toxina no meio aquático. De acordo com Hargreaves (1998), a quantidade de nitrogênio adicionada à viveiros de aquicultura pela fixação depende em grande parte da

composição de espécies da comunidade fitoplanctonica (proporção significativa de heterocistos de *Cyanobacteria*) e concentração de amônia. O nitrogênio disponível pode ser adicionado à viveiros de peixes pela redução do nitrogênio atmosférico por heterocistos das *Cyanobacterias*.

As bactérias classificadas como pertencentes ao grupo TM7 foi primeiramente caracterizadas como sendo bactérias tipicamente gram-positivas, apresentando células com envelopes que com resistência a estreptomicina, como as *Archaeas* (GUPTA et al., 1998; VAL-MORAES et al., 2011). De acordo com estudo de Hugenholtz et al. (2001), membros das bactérias candidatas à divisão TM7 estão amplamente distribuídos no meio ambiente, sequencias desse grupo foram detectados em diversos habitats como terrestres (solos, rizosfera), aquático (água doce, águas subterrâneas, água do mar, e sedimentos) inclusive clínico (cavidade oral humana e fezes de rato).

Para a biblioteca V4-C, dos 288 clones sequenciados, apenas 93 sequencias apresentaram qualidade e foram analisados pelo RDP. Já para a biblioteca V4-S, dos 384 clones sequenciados, apenas 192 sequencias apresentaram as características desejáveis para poderem ser utilizadas nas análises analisados por esse banco de dados. De acordo com os dados gerados pela ferramenta *Classifier* pode-se construir os gráficos comparativos abaixo. A Figura 13 demonstra a comparação entre dos filos mais encontrados enquanto a Figura 14 mostra a comparação entre as classes mais encontradas nas bibliotecas.

Como pode ser visto nos gráficos, de acordo com cada período climático, se sobressaiu uma população bacteriana característica. De um modo geral, encontrou-se 6 filos: *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Bacterioidetes*, *Cyanophyta*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*.

Utilizando a ferramenta *LibCompare* do RDP com confiabilidade de 80%, pode-se verificar a diferença significativa de cada biblioteca analisada. A Figura 15 mostra quais os filos mais significantes.

Como bactérias predominantes nas duas épocas têm-se as dos filos *Armatimonadetes*, *Proteobacterias* e *Cyanophyta*, sendo que no período de seca, o último, apareceu em maior frequência do que nas chuvas.

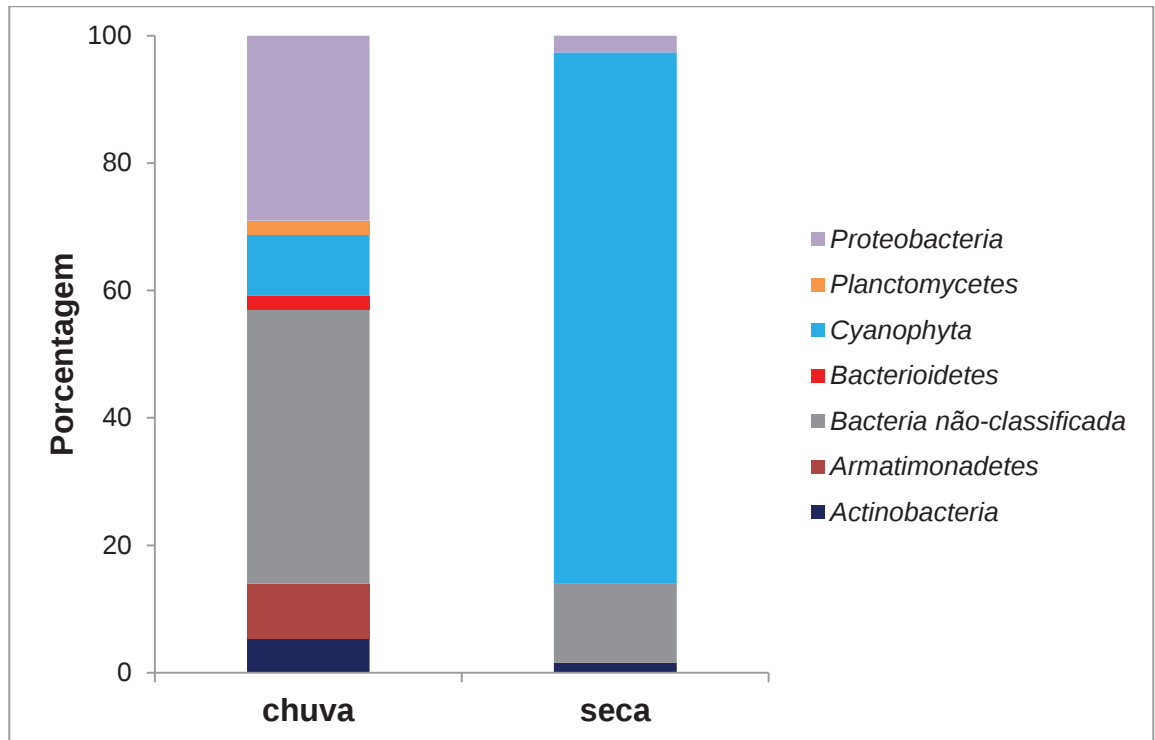


FIGURA 13. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.

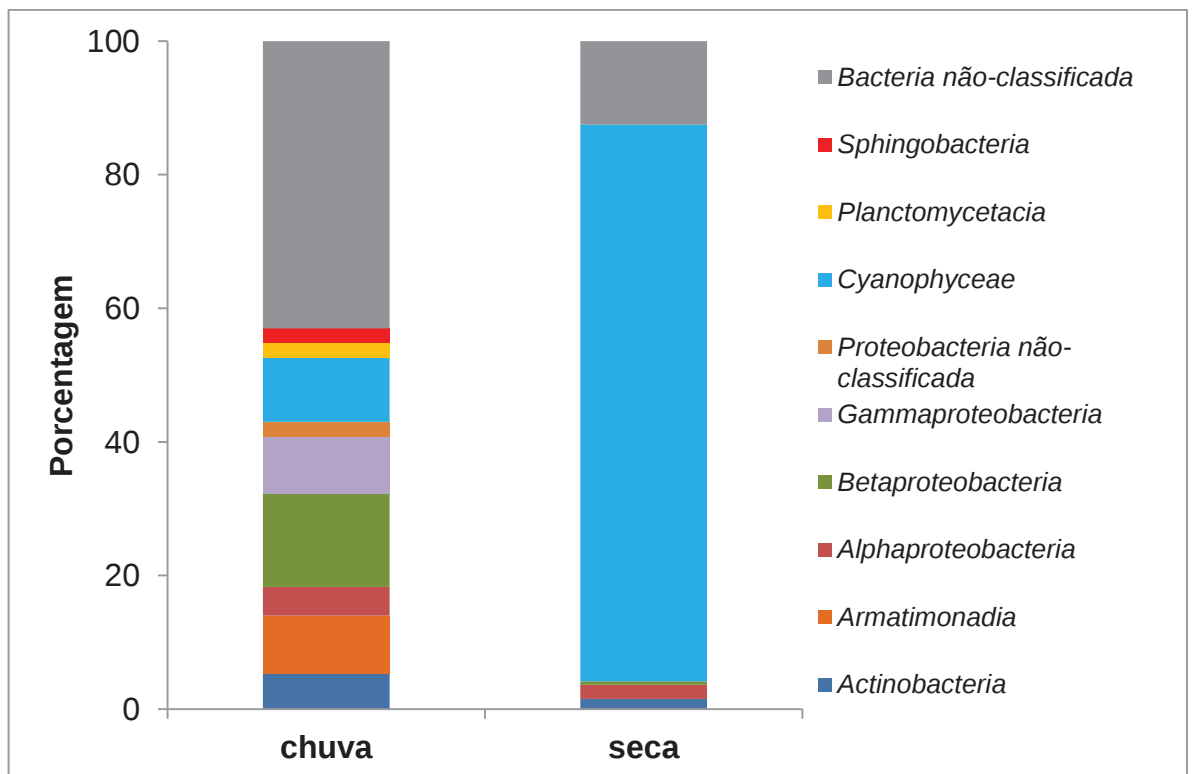


FIGURA 14. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.

Library1	%	phylum	%	Library2
■	2.2	"Bacteroidetes"	0.0	
■	8.6	"Armatimonadetes" *	0.0	
■	29.0	"Proteobacteria" *	2.6	■
■	2.2	"Planctomycetes"	0.0	
■	9.7	Cyanobacteria/Chloroplast *	81.8	■
■	7.5	"Actinobacteria"	1.6	■
■	39.8	unclassified Bacteria	14.1	■

(* = significantly different at 0.01)

FIGURA 15. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do Viveiro 4. *Library 1* correspondente ao período de chuvas e *Library 2* ao período de seca.

Observado os gráficos de comparação, pode-se ver que houve uma grande frequência de Cianobacterias nos dois períodos, porém maior na seca do que na chuva. Mais de 80% das sequências analisadas em V4-S foram correspondentes a este filo, podendo dizer, de acordo com os resultados apresentados que houve um florescimento de Cianobacterias neste ambiente. A ferramenta *LibCompare* mostrou ainda que todas as cianobacterias encontradas, pertencem ao gênero *Gp11a*.

Segundo Eiler e Bertilsson (2004) florescimento de Cianobactérias são comuns em águas doces eutróficas e frequentemente ocorre produção elevada de cianotoxinas e compostos tóxicos que comprometem a qualidade da água. Além disso, a degradação bacteriana heterotrófica de carbono orgânico produzido por florescimento de Cianobactérias também podem esgotar o oxigênio dissolvido a níveis prejudiciais para muitos organismos. A transferência de carbono fixado fotossinteticamente para bactérias heterotróficas pode ocorrer pela degradação bacteriana e utilização de Cianobactérias mortas, mas ataques enzimáticos e predação de fitoplâncton por bactérias heterotróficas podem também liberar matéria orgânica dissolvida para utilização bacteriana.

Como já citado anteriormente, algumas Cianobacterias aquáticas possuem heterocistos que são dedicadas exclusivamente à fixação de nitrogênio.

De acordo com Yuan et al. (2009), a dominância de Cianobacteria em ambientes ricos em nutrientes está associada a uma variedade de fatores, dentre eles luz, temperatura, baixa concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido e elevada concentração de fósforo total dissolvido, como ocorre em V4-S, no qual de acordo com a Tabela 1 na época de seca houve as maiores concentrações de ortofosfato e fósforo total.

Fixadoras de nitrogênio atmosférico estes organismos conseguem se proliferar rapidamente quando a disponibilidade de fósforo é alta (CONLEY et al., 2009; MILLAN, 2012). O que é observado em V4-S, onde há altas concentrações de fósforo total.

Como segundo filo significativo, porém predominante em V4-C, tem-se as Proteobacterias. De modo geral nesse período, as classes β e γ -Proteobacterias foram as predominantes, e consequentemente significativamente diferentes de acordo com o *LibCompare*. Essas classes não foram encontradas em V4-S, somente α -Proteobacterias, porém em menor frequência como em V4-C.

Nas β -Proteobacterias encontradas em V4-C, a ordem Burkholderiales, foi a única encontrada e com grande frequência, o gênero encontrado foi *Polynucleobacter*. Que como já descrito anteriormente esse gênero possui bactérias cosmopolitanas e com grande habilidade de adaptação aos diversos ambientes.

Nas γ -Proteobacterias encontradas em V4-C, não foi possível classificar nenhuma das sequências a partir da ordem de acordo com a ferramenta utilizada, pois as mesmas apresentaram confiabilidade abaixo de 30% na classificação.

De acordo com Newton et al. (2011), esse filo é mais abundante nos oceanos, porém quando encontrados em água doce muitos organismos são entéricos, como por exemplo, *Escherichia coli*, podem ser considerados membros transitórios indicando contaminação antropogênica ou de fontes zoonóticas.

Os Armatimonadetes apareceram apenas no período chuvoso. Sua principal classe, Armatimonadia, foi a dominante prevalecendo o gênero *Armatimonas/Armatimonadetes_gp1*, em todas as sequências encontradas na biblioteca.

Até meados de 2011, os Armatimonadetes eram chamados de filo candidato à OP10, porém nesta época duas espécies candidatas a este filo foram validadas taxonomicamente sendo removido o “candidato” do status do filo (DUNFIELD et al., 2012).

Segundo Wan-Taek et al. (2012), sequências que representam esse filo foram identificadas por métodos independentes de cultura de vários ambientes, incluindo processos aeróbios e anaeróbios de tratamento de águas residuárias, da rizosfera e superfícies de riachos de águas geotérmicas.

Um estudo filogenético, utilizando 490 sequências de alta qualidade e não redundante do “candidato” à OP10, realizado por Dunfield et al. (2012) agrupou as sequências do filo Armatimonadetes. Na árvore construída foram encontrados 12 grupos, o grupo 1 pertencente à classe Armatimonadia, a mesma encontrada neste trabalho, contém primariamente filotipos detectados em solo e água. Outro relato dos autores, é que os membros desse filo, são comumente detectados em áreas onde predominam bactérias fotossintéticas, incluindo florescimento de Cyanobacteria em água doce.

Houve aparecimento de populações em menor frequência, que apareceram apenas em V4-C: Bacterioidetes, Planctomycetes. E também que apareceram nas duas épocas analisadas, como as Actinobacterias.

Segundo Newton et al. (2011), os Planctomycetes possuem a habilidade de carrear reações de oxidação anaeróbia de amônia e também alguns isolados podem ser capazes de degradar fitoplâncton derivado de carboidratos.

Fuerst e Sagulenko (2011) em uma revisão feita sobre o filo Planctomycetes relatam que este é um filo distinto do domínio bactéria, pois possuem características incomuns, como compartimentalização intracelular e falta de peptidoglicano em suas paredes celulares. Eles podem ser encontrados em diversos habitats como marinho, água doce e solos. Além de possuírem um grupo especializado na oxidação aneróbica de amônia, utilizando nitrito como aceptor de elétrons, sendo caracterizados como organismos quimiolitotróficos. Podendo também utilizar ácidos graxos como propionato para fonte de carbono

Utilizando a ferramenta *LibCompare* com confiabilidade de 80% comparou-se também qual a diferença significativa dos filos encontrados de acordo com o estado trófico dos viveiros, nas épocas distintas. Na Figura 16 mostra-se os resultados obtidos na comparação entre V1-C (*Library 1*) e V4-C (*Library 2*).

Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	"Armatimonadetes" *	8.6	■
	0.0	"Planctomycetes"	2.2	■
	0.0	Cyanobacteria/Chloroplast *	8.6	■
■	1.1	"Bacteroidetes"	2.2	■
■	1.1	"Synergistetes"	0.0	
■	2.1	Firmicutes	0.0	
■	15.8	"Actinobacteria"	7.5	■
■	64.2	"Proteobacteria" *	29.0	■
■	15.8	unclassified Bacteria	40.9	■

(* = significantly different at 0.01)

FIGURA 16. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1-C (viveiro 1 período chuvoso) e V4-C (Viveiro 4 período chuvoso).

Segundo resultados obtidos percebe-se que como filos significativamente diferente tem-se os Armatimonadetes e Cyanobacteria (presentes apenas em VC), e Proteobacteria, presente nos dois ambientes, porém em maior frequência em EC.

A Figura 17 demonstra os resultados obtidos na comparação entre V1-S (*Library 1*) e V4-S (*Library 2*).

Library1	%	phylum	%	Library2
■	0.7	TM7	0.0	
■	0.7	Firmicutes	0.0	
■	40.1	"Proteobacteria" *	2.6	■
■	3.6	Cyanobacteria/Chloroplast *	82.8	■
■	16.1	"Actinobacteria" *	1.0	■
■	38.0	unclassified Bacteria	13.5	■

(* = significantly different at 0.01)

FIGURA 17. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1-S (viveiro 1 período chuvoso) e V4-S (Viveiro 4 período seca).

Segundo resultados obtidos percebe-se que como filos significativamente diferente tem-se as Proteobacterias em maior frequência em V1-S, e Cyanobacterias com maior frequência em V4-S.

Com todos esses resultados obtidos, utilizou-se por fim o software DOTUR, o mesmo permitiu determinar o número de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) através da distância genética entre as sequências (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004) das duas bibliotecas analisadas. Com o resultado também foi possível a construção da curva de rarefação (Figura 18). O desenho de curvas de rarefação é uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade (ROESCH, et al. 2007).

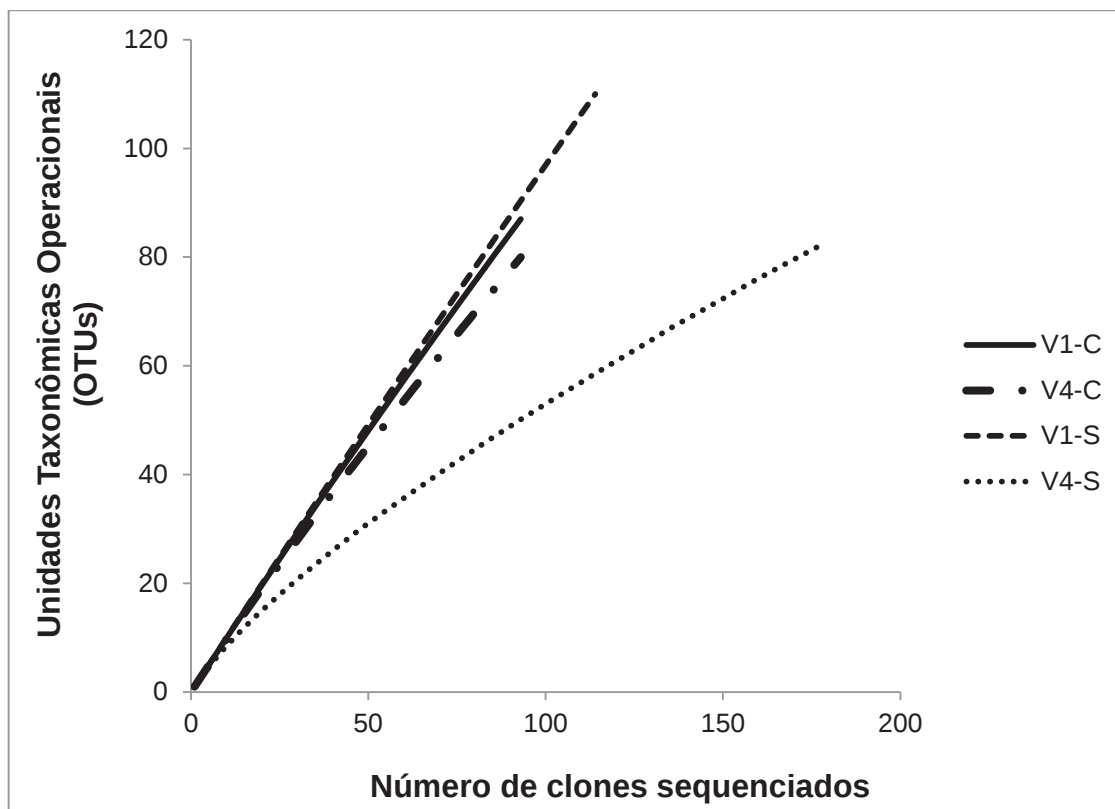


FIGURA 18. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das sequências de *16S rDNA* das bibliotecas de águas de aquicultura (V1-C: viveiro 1 período de chuvas; V1-S: viveiro 1 período de seca; V4-C: viveiro 4 período de chuvas; V4-S: viveiro 4 período de seca).

Como demonstrado pelo gráfico, o ambiente analisado nos dois viveiros nas duas épocas climáticas possui grande diversidade de microrganismos, já que os gráficos nem chegaram a atingir o início do platô. Porém, pode-se observar que V4-S iniciou a curva, mas mesmo obtendo esse resultado serão necessárias mais análises para se confirmar a real composição das populações nessas áreas. Fato esse comprovado pela tabela que mostra os índices de diversidade e riqueza (tabela). Schloss e Handelsman (2004) relatam que o programa DOTUR é sensível ao número de sequências analisadas, portanto esse é um fato que deve ser observado com bastante atenção. E também, em seu estudo, as autoras supracitadas preveem que para uma boa amostragem é necessário pelo menos 10000 sequências para estabilização da curva de rarefação de determinado ecossistema.

A Tabela 3 abaixo mostra os índices de diversidade e riqueza, gerados pelo próprio programa DOTUR. Tais índices promovem estimativas que variam com o número das sequências e frequências das OTUs.

Tabela 3. Índices de Riqueza e diversidade de V1-C (viveiro 1 no período chuvoso), V1-S (viveiro 1 período seca), V4-C (Viveiro 4 período de chuvas) e V4-S (Viveiro 4 período de seca) gerados pelo programa DOTUR.

Amostras	OTU	ÍNDICES DE RIQUEZA		ÍNDICES DE DIVERSIDADE	
		ACE	CHAO1	SHANNON	SIMPSON
V1-C	87	876,67	751,2	4,4	0,00164
V1-S	110	1567,5	1223	4,7	0,00062
V4-C	80	770,5	605,6	4,3	0,00584
V4-S	82	363,32	271,1	3,7	0,04481

No índice de riqueza de espécies ACE as sequências são agrupadas em raras e abundantes de acordo com sua frequência de observação. O algoritmo ACE utiliza as frequências obtidas do banco de dados metagenômico, baseado nas sequências das espécies < 10 ou baixo número de amostras para estimar riquezas de diversidade e espécies (HUGHES et al., 2001). O índice de CHAO1 usa o número de OTUs com uma ou duas sequências para estimar o número de espécies faltantes (CHAO, 1984). De acordo com o demonstrado pelos dados, V1-C, V1-S e V4-C são bastante ricos, exceto V4-S na comparação dos valores demonstrados.

O índice de Simpson varia de 0 a 1, com os valores altos indicando forte dominância e baixa diversidade. No caso do índice de Shannon, quanto maior o valor mais alta a diversidade (ODUM; BARRETT, 2007). De forma geral, os ambientes analisados além de ricos possuem grande diversidade. Mas os valores dos índices mostraram que em V4-S há forte dominância e baixa diversidade, fato esse comprovado já que nessa época já foi mostrado o aparecimento de mais de 80% de Cianobacterias.

5. CONCLUSÃO

Através do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* das bibliotecas de águas de dois viveiros de piscicultura, foi observado que as comunidades bacterianas encontradas estão relacionadas com a concentração de nutrientes de cada viveiro em cada período climático (seca e chuva).

Há diferença nas comunidades bacterianas dos viveiros nos diferentes períodos climáticos, e também entre os viveiros, ou seja, quando comparado o viveiro 1 e o 4 houve mudança significativa nas comunidades bacterianas presentes nos mesmos.

De modo geral os ambientes são bem diversificados e ricos em microrganismos, porém comparando a água do viveiro 1 com a do viveiro 4 percebe-se que o primeiro é mais diversificado e rico que o segundo, já que em V4, no período de seca, houve forte dominância de Cianobacterias.

O período de seca exerceu maior influencia nas populações dos viveiros do que a chuva, apresentando seleção de microrganismos específicos.

6. REFERÊNCIAS

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J.G.; GRAY, J.S.; MEYER-REIL, L.A.; THINGSTAD, F. The Ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine ecology – progress series**, Amelinghausen, v.10, p.257-263, 1983

BENLLOCH, S.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.18, p.267-280, 1995.

BHANDARI, V.; GUPTA, R.S. Molecular signatures for the phylum Synergistetes and some of its subclades. **Antonie van leeuwenhoek**, Amsterdam, v.102, p.517-540, 2012.

BOLLMANN, A.; PALUMBO, A. V.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.76, n.22, p.7413-7419, 2010.

BRULAND, N.; BATHE, S.; WILLEMS, A.; STEINBÜNCHEL, A. *Pseudorhodoferrax soli* gen. nov., sp. nov. and *Pseudorhodoferrax caeni* sp. nov., two members of the class *Betaproteobacteria* belonging to the family *Comamonadaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.2702-2707, 2009.

CARVALHO, M. F.; MARCO, P.; DUQUE, A. F.; PACHECO, C. C.; JANSSEN, D. B.; CASTRO, P. M. L. *Labrys portucalensis* sp. nov., a fluorobenzene-degrading bacterium isolated from an industrially contaminated sediment in northern Portugal. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.692-698, 2008.

CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Malden, v. 11, p. 265-270, 1984.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CAARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.37, 2009.

CONLEY, D. J.; PAERL, H. W.; HOWARTH, R. W.; BOESCH, D. F.; SEITZINGER, S. P.; HAVENS, K. E.; LANCELOT, C.; LIKENS, F. E. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. **Science**, Washington, v.323, p.1014-1015, 2009.

CRUMP, B. C.; KLING, G. W.; BAHR, M.; HOBIE, J. E. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.4, p.2253-2268, 2003.

DESAI, C., PARIKH, R.Y., VAISHNAV, T., SHOUKHE, Y.S., MADAMWAR, D. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. **Research in Microbiology**, Paris, v.160, p.1–9, 2009.

DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. **Bioresource Technology**, Essex, v.101, p.1558-1569, 2010.

DIAS, S.G. **Caracterização físico-química, microbiológica e planctônica de um viveiro coberto por macrófitas usado no abastecimento de água para aquicultura**. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.2223-2230, 2004.

DUNFIELD, P. F.; TAMAS, I.; LEE, K. C.; MORGAN, X. C.; MCDONALD, I. R.; STOTT, M. B. Electing a candidate: a speculative history of the bacterial phylum OP10. **Environmental microbiology**, Oxford, v.14, n.12, p.3069-3080, 2012.

DURFEE, T., NELSON, R., BALDWIN, S., PLUNKETT, G. 3RD, BURLAND, V., MAU, B., PETROSINO, J.F., QIN, X., MUZNY, D.M., AYELE, M., GIBBS, R.A., CSORGO, B., POSFAI, G., WEINSTOCK, G.M., BLATTNER, F.R. "The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse." **Journal of bacteriology**, Washington, v.190, p.2597-2606, 2008.

EILER, A.; BERSILSSON, S. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental microbiology**, Oxford, v.5, n.12, p.1228-1243, 2004.

EL-SAYED, A. B.; EL FOULY, M. M.; ABDEL-MAGUID, A. A. Green algae for improving nutritional and environmental status of fish ponds production. **Journal of American Science**, New York, v.6, n.8, p.47-55, 2010.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 575p.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v.8, p.186-194, 1998a.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, p.175-185, 1998b.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Westport, v.5, p.164-166, 1989.

FENCHEL, T. The microbial loop – 25 years later. **Journal of Experimental Marine Biology and ecology**, Amsterdam, v.366, p.99-103, 2008.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **PNAS**, Washington, v.103, n.3, p.626-631, 2006.

FORSTER, S.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; SNAPE, J.R.; PORTER, J. Rains, drains and active strains: towards online assessment of wastewater bacterial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.55, p.859-864, 2003.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature reviews-microbiology**, London, v.9, 2011.

GILBRIDE, K.A.; LEE, D.-Y.; BEAUDETTE, L.A. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, p.1-20, 2006.

GLÖCKNER, F. O.; ZAICHIKOV, E.; BELKOVA, N.; DENISSOVA, L.; PERNTHALER, J.; PERNTHALER, A.; ARMANN, R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.11, p.5053-5065, 2000.

GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh water**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1978. 213 p.

GOMILA, M.; BOWIEN, B.; FALSEN, E.; MOORE, E. R. B.; LALUCAT, J. Description of *Pelomonas aquatic* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and water haemodialysis water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.57, p.2629-2635, 2007.

GUPTA, R. S. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. **Molecular Microbiology**, Salem, v.29, p.695-707, 1998.

HAHN, M. W.; LANG, E.; BRANDT, U.; LÜNSDORF, H.; WU, Q. L.; STACKEBRANDT, E. *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.60, p.166-173, 2010a.

HAHN, M. W.; KASALICKÝ, V.; JEZBERA, J.; BRANDT, B.; SIMEK, K. *Limnohabitans australis* sp. nov., isolated from a freshwater pond, and emended description of the genus *Limnohabitans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.60, p.2946-2950, 2010b.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 5, p. 245-249, 1998.

HARGREAVES, J. A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. **Aquaculture**, Oxford, v.166, p.181-212, 1998.

HECKMANN, K.; SCHMIDT, H. J. *Polynucleobacter necessarius* gen., nov., sp. nov., an Obligately endosymbiotic bacterium living in the cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.37, n.4, p.456-457, 1987.

HENARES, M. N. P. **Cultivo de camarão com aerador e substrato artificial, identificação de bactérias da wetland construída para o tratamento do efluente**. 2012. 117f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.2, p.519-526, 2002.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.14, p.190-197, 1996.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W.; WEBB, R. I.; WAGNER, A. M.; BLACKALL, L. L. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p.411-419, 2001.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETS, T. H.; BOHANNAN, B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-06, 2001.

HUTALLE-SCHMELZER, K. M. L.; ZWIRNMANN, E.; KRUGER, A.; GROSSART, H. P. Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.72, p.58–73, 2010.

INUI-KISHI, R. N.; KISHI, L. T.; PICCHI, S. C.; BARBOSA, J. C.; LEMOS, M. T. O.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. Phosphorus solubilizing and IAA production activities in plant growth promoting rhizobacteria from Brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and applied sciences**, Ipswich, v.7, n.11, 2012.

JAEHO, S.; OH, H. M.; LEE, J. S.; WOO, S. B.; CHO, J. C. *Inhella inkyongensis* gen. nov., sp. nov., a new freshwater bacterium in the order *Burkholderiales*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.19, n.1, p.5-10, 2009.

KASALICKÝ, V.; JEZBERA, J.; SIMEK, K.; HAHN, M. W. *Limnohabitans planktonicus* sp. nov. and *Limnohabitans parvus* sp. nov., planktonic betaproteobacteria isolated from a freshwater reservoir, and emended description of the genus *Limnohabitans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 2710-2714, 2010.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.47, p.161-177. 2004.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASHOF, E.; KREMLING, E. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. German: Verlag Chemie Weinheim, 1976. p.117-181.

LEFF, L.G. Freshwater habitats. **Environmental Microbiology and ecology**. Elsevier. 2009.

MACEDO, C.F. **Qualidade Da Água Em Viveiros De Criação De Peixes Com Sistema De Fluxo Contínuo**. 2004. 150f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MACEDO, H. S. **Comunidades bacterianas em solos de mata nativa e cultivados com cana-de-açúcar**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

MACEDO, C.F.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36 (2), p. 149-163. 2010.

MARCHANDIN, H.; DAMAY, A.; ROUDIÈRE, L.; TEYSSIER, C.; ZORGIOTTI, I.; DECHAUD, H.; JEAN-PIERRE, H.; JUMAS-BILAK, E. Phylogeny, diversity and host specialization in the phylum Synergistetes with emphasis on strains and clones of humic origin. **Research in Microbiology**, Paris, v.161, p.91-100, 2010.

MILLAN, R. N. **Dinâmica da qualidade da água em tanques de peixes de sistema pesque-pague: aspectos físico-químicos e plâncton**. 2009. 88f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

MILLAN, R.N. **Variação da comunidade planctônica e fatores físico-químicos da água em dois sistemas de aquicultura**. 2012. 166f. Tese (Doutorado em microbiologia agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

NEEFS,J.M; PEER,Y.V.; RIJK,P.; GORIS,A.; WACHTER,R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Oxford University Press. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.1987-2015, 1991. suppl.

NEOFITOU, N.; KLAUDATOS, S. Effect of fish farming on the water column nutrient concentration in a semi-enclosed gulf of the eastern Mediterranean. **Aquaculture Research**, Oxford, v.39, n.5, p.482-490, 2008.

NEWTON, R.J.; JONES, S.E.; EILER, A.; MCMAHON, K.D.; BERTILSSON, S. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.75, n.1, p.14-49, 2011.

NISHIMURA, Y.; NAGATA, T. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). **Aquatic Microbial Ecology**, Germany, v.48, p. 31-240, 2007.

NOAR, J. D.; BUCKLEY, D. H. *Ideonella azotifigens* sp. nov., an aerobic diazotroph of the *Betaproteobacteria* isolated from grass rhizosphere soil, and emended description of the genus *Ideonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.1941-1946, 2009.

ODUM, E.P; BARRETT, G.W. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2008, 612p.

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

PACE, N. R.; OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. **Cell**, Cambridge, v.45, p.325-326, 1986.

PEEL, M.C; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. Updated world map of the Köpen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences**, v.11, p.1633-1644, 2007.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.55, p.856-866, 2009.

QUEIROZ, J.F. de; BOEIRA, R.C. **Boas práticas de manejo (BPMs) para reduzir o acúmulo de amônia em viveiros de aquicultura**. Jaguariuna: EMBRAPA, 2007. p.1-5 (Comunicado técnico 44).

SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.1501-1506, 2005.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.75, p.955–962, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Aspectos limnológicos de um viveiro utilizado como abastecimento de água para sistemas de aquicultura. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v.19, p.59-64, 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 70p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Utilização de biofiltros em sistema de cultivo de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.203, p.38-43, 2000.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; LOURENÇO, E.M.; BRAGA, F.M.S. Water quality in six sequentially disposed fishponds with continuous water flow. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v.32, n.1, p.9-15, 2010

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; DONADON, A. R. V.; MILLAN, R. N. Water quality and plankton populations in na earthen polyculture pond. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.71, n.4, p.845-855, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Manejo ecológico em aquicultura**. Jaboticabal: CAUNESP, 2012, 43p. Apostila.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; GUARIGLIA, C.S.T.; BRAGA, F.M.S. Effects of rainfall on water quality in six sequentially disposed fishponds with continuous water flow. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.67, n.4, p 643-649. 2007.

SOUZA, J. A. M.; TIEPPO, E.; MAGNANI, G. S.; ALVES, L. M. C.; CARDOSO, R. L.; CRUZ, L. M.; OLIVEIRA, L. F.; RAITTZ, R. T.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; LEMOS, E. G. M. Draft genome sequence of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium elkanii* 587. **Journal of bacteriology**, Washington, v.194, n.13, p.3547-3548, 2012.

STATSOFT. STATISTICA (data analysis software system), version 8. 2007. Disponível em: <www.statsoft.com> Acesso em: 07 jan. 2013.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.4876- 4882, 1997.

TRINGE, S. G., RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, London, v.6, p.805–814, 2005.

VAL-MORAES, S. P.; MARCONDES, J.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.27, p.1997-2003, 2011.

WANG, Q.G.M.; GARRITY, J.; TIEDJE, M.; COLE, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.73, n.16, p.5261-7, 2007.

WAN-TAEK, I.; ZI-YE, H.; KYOUNG-HO, K.; SUNG-KEUN, R.; HAN, M.; SUNG-TAIK, L.; ZHE-XUE, Q. Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. Nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.102, p.307-317, 2012.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.

YUAN, L.; ZHU, W.; XIAO, L.; YANG, L. Phosphorus cycling between the colonial cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and attached bacteria, *Pseudomonas*. **Aquatic Ecology**, Netherlands, v.43, p.859-866, 2009.

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**, Germany, v.28, p141-155, 2002.