UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMUNIDADE BACTERIANA EM VIVEIROS DE AQUICULTURA

Daniele Belarmino da Silva
Tecnóloga em Biocombustíveis

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

COMUNIDADE BACTERIANA EM VIVEIROS DE AQUICULTURA

Daniele Belarmino da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

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.

2014

Silva, Daniele Belarmino da
S586c Comunidade bacteriana em viveiros de aquicultura / Daniele Belarmino da Silva. – – Jaboticabal, 2014
x, 54 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves
Banca examinadora: Rodrigo Matheus Pereira, Mariana Carina Frigieri
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.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: COMUNIDADE BACTERIANA EM VIVEIROS DE AQUICULTURA

AUTORA: DANIELE BELARMINO DA SILVA
ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES

Aprovada 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

Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal Da Grande Dourados

Profa. Dra. MARIANA CARINA FRIGIERI
Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal

Data da realização: 25 de abril de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniele Belarmino da Silva nasceu em 01 de março de 1990, na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo. Em Janeiro de 2008 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, recebendo o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em Dezembro de 2010. Em Agosto de 2011, iniciou o mestrado no programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal (SP), obtendo o título de mestre em Abril de 2014.

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu irmão Fábio, exemplo de honestidade e sabedoria.

Em especial, ao meu irmão Luiz André (*in memoriam*), a certeza de que ser irmão está além da convivência mútua e sim estarmos unidos pelos eternos laços de amor.

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela oportunidade da vida, pela possibilidade de aprender e evoluir nesta caminhada.

A minha família, pelo amor, carinho, compreensão em todos os momentos.

A professora, Dra Lucia Maria Carareto Alves, pela amizade, confiança, paciência e orientação, proporcionando meu desenvolvimento pessoal e profissional.

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

À Profa. Dra. Lucia H. Sipaúba-Tavares pela amizade, incentivo, confiança e orientação fundamentais para minha formação.

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

A todos os meus companheiros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas (LBMP) e também aos amigos de trabalho do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, pela agradável convivência e amizade. Agradeço, sinceramente, pela contribuição de cada um de vocês nesse trabalho.

Em especial, ao meu amigo e companheiro de experimento Aylan pelo carinho, pela amizade e companhia para o que der e vier.

Aos fiéis companheiros Gabi, Milena, Laís, André, pela dedicação e colaboração durante todo o período de convivência.

Aos que sempre estiveram prontos para me ajudar: Camila Cesário Martins e João Carlos Campanharo pelos auxilio, dedicação e ajuda nas práticas laboratoriais essenciais para a concretização deste trabalho.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, por ceder a área experimental e proporcionar todas as condições para a realização desse ensaio.

Aos meus amigos Juliana, Igor, Elisa, Guilherme, Alana, Aline, Jéssica, Renata, pela amizade, incentivo e companheirismo.

A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e de minha formação. Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....9

ABSTRACT 10

LISTA DE ABREVIATURAS.....11

LISTA DE TABELAS 12

LISTA DE FIGURAS 13

1.INTRODUÇÃO 15

2.REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1.Importância do sedimento na Aquicultura 16

2.2. Qualidade da água em Aquicultura 19

2.3.A importância dos microrganismos em Aquicultura 20

2.4.Utilização Análise molecular e abordagem metagenômica da diversidade microbiana do sedimento 22

3.MATERIAL E MÉTODOS 25

3.1. Área de estudo.....25

3.2.Análises do sedimento 28

3.3.Análise das variáveis limnológicas.....28

3.4.Extração do DNA metagenômico e amplificação do gene 16S rRNA 29

3.5.Purificação dos amplicons 30

3.6.Clonagem dos fragmentos do gene 16S rRNA amplificados 30

3.7.Extração de DNA plasmidial 32

3.8.Sequenciamento dos clones obtidos 33

3.9.Análises das sequencias.....34

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....34

5.CONCLUSÃO.....51

6.REFERÊNCIAS.....51

COMUNIDADE BACTERIANA EM VIVEIROS DE AQUICULTURA

RESUMO – O trabalho objetiva avaliar o papel da comunidade bacteriana na dinâmica dos sedimentos. No presente trabalho, compararam-se as comunidades bacterianas presentes em sedimentos de dois viveiros de piscicultura, um reservatório de água (V1) e o outro com condições de elevada carga orgânica (V4), os quais estão inseridos em um sistema sequencial com fluxo contínuo de água. As coletas de sedimentos foram realizadas em dois períodos distintos, um sendo 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.* Os filos bacterianos permaneceram praticamente inalterados nas amostras V1 comparadas nas duas épocas estudadas. Nas amostras do V4 observou-se variação na frequência dos organismos encontrados em relação às diferentes coletas. A predominância em V1 foi dos filos Firmicutes seguido do Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria. No V4, o maior número de sequências encontradas pertencia ao filo Proteobacteria, seguido de Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospira, Gemmatimonadetes e TM7. A comparação da população bacteriana dos dois viveiros estudados em diferentes épocas mostrou que as bactérias variam de acordo com as condições climáticas e estão intimamente interligadas com a concentração de nutrientes do local. Estas diferenças são importantes na elucidação do papel desenvolvido pelos procariotos na dinâmica dos sedimentos.

Palavras-chave: Aquicultura, Metagenoma,16S rDNA,

BACTERIAL COMMUNITIES IN FISH FARMING

ABSTRACT – The aim of this study was identify the bacterial communities in dynamic of the sediment. In this study, we compared the bacterial communities present in sediment of two fish farm pond a used as water reservoir (V1) and the other with conditions of high nutrient load (V4), which are inserted in a sequential system with continous water flow (six ponds). The sediment 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. Through this data we observed in V1 regardless of time of year the bacterials phyla remained virtually unchanged.In V4 samples, was observed a variation in the frequency of organisms found in relation to different collections. In V1 was the predominance of the Phylum Firmicutes followed
Proteobacteria, Acidobacteria and Actinobacteria. The largest number of sequences found at V4 belonged to the Proteobacteria phylum followed Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi, Nitrospira, Gemmatimonadetes and TM7. 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 climatic conditions and are closely linked with nutrient concentration local. These differences are important in elucidating the role played by prokaryotes in the sediment dynamics.

Keywords: aquaculture, metagenomic, gene 16S rRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

LB – Luria Bertani
ng – Nanograma, unidade de medida de concentração ($1x10^{-9}g$)
µL – Microlitro, unidade de medida de volume ($1x10^{-6}L$)
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
NO_2 – Nitrito
NO_3 – Nitrato
NH_4 – amônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão das análises físicas e químicas das amostras de água dos viveiros V1 e V4 nos períodos de chuva (C) e seca (S). 36

Tabela 2. Analise química das amostras de sedimento dos viveiros V1 e V4 nos períodos de chuva (C) e seca (S).....36

Tabela 3. Índices de Riqueza e diversidade de V1C (viveiro 1 no período chuvoso), P1S (viveiro 1 período seca), V4C (Viveiro 4 período de chuvas) e V4S (Viveiro 4 período de seca) gerados pelo programa DOTUR.....50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 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). 24

Figura 2. Desenho esquemático da localização do sistema de aquicultura do CAUNESP, enfatizando os dois viveiros estudados, onde V1 = entrada de água do viveiro, V4= saída de água (local de coleta).....26

Figura 3. Pontos de coletas nos viveiros do CAUNESP, onde: V1 = reservatório de agua e V4 = viveiro eutrófico. As setas indicam os pontos amostrados.....27

Figura 4. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pJET1.2/blunt (Fermentas).....31

Figura 5. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 1. 38

Figura 6. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do viveiro 1. Library 1 corresponde ao período de chuvas (V1C) e Library 2 ao período de seca (V1S).....39

Figura 7. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 1. 40

Figura 8. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 4. 42

Figura 9. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V4C (viveiro 1 período chuvoso) e V4S (Viveiro 4 período seca), V4C (Library 1) e V4S (Library 2). 43

Figura 10. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 4. 44

Figura 11. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1C (viveiro 1 período chuvoso) e V4C (Viveiro 4 período chuvoso).....46

Figura 12. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1S (viveiro 1 período seca) e V4S (Viveiro 4 período seca).....47

Figura 13. Distribuição das classes de acidobacterias nos viveiros estudados, nos períodos distintos, seca (S) e chuva (C). 47

Figura 14. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1 (Library 1) e V4 (Library 2). 48

Figura 15. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das sequências de 16S rDNA das bibliotecas de sedimento de piscicultura (V1C: viveiro 1 período de chuvas; V1S: viveiro 1 período de seca; V4C: viveiro 4 p períodos de chuvas; V4S: viveiro 4 período de seca).....49

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se intensificado nos últimos anos modificando as características dos ecossistemas de água doce, entretanto a água e o sedimento são compartimentos de grande importância para a manutenção desta atividade. A implementação de sistemas de criação de peixes leva a modificação das condições ambientais, seja pela alteração da flora, fauna, sedimentos e em muitos casos do clima, de forma mais moderada. Portanto, estudos que tenham por objetivo o entendimento holístico dos sistemas de criação de peixes poderão garantir um meio ambiente adequado e uma produção de peixes sustentável.

Os sedimentos de viveiros de aquicultura são relacionados com os processos biogeoquímicos e estes processos são amplamente mediados por procariotos. Assim, as propriedades e particularidades dos sedimentos são extremamente associadas com a estrutura das comunidades microbianas presentes neste ecossistema. O entendimento sobre o papel dos microrganismos em termos de suas interações tróficas e suas participações nos processos biogeoquímicos vem promovendo novas linhas de pesquisa na aquicultura com a finalidade de propiciar cultivos menos agressivos e mais equilibrados em termos do relacionamento entre os microrganismos e os cultivos.

Sob estes aspectos, o sequenciamento do gene 16S rRNA, é uma importante ferramenta da biologia molecular, para o estudo e identificação das bactérias presentes neste habitat. Assim, a caracterização da diversidade de bactérias deste ecossistema poderá contribuir para o entendimento do papel desenvolvido por estes organismos procariotos na dinâmica dos sedimentos.

O objetivo do presente trabalho foi a comparação das comunidades bacterianas presentes em sedimentos de dois viveiros rasos, em dois períodos climáticos característicos (seca e chuva), através do sequenciamento da região V1 e V2 do gene *16S rRNA*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância do sedimento na Aquicultura

O sedimento de viveiros de aquicultura consiste de uma mistura de partículas do solo de vários tamanhos e estágios diferentes de decomposição da matéria orgânica. Do ponto de vista de energia, o sedimento é o compartimento que funciona como reservatório de nutrientes para os demais componentes do viveiro, onde ocorrem processos biológicos, físicos e químicos, afetando o metabolismo de todo o sistema (BOYD, 1995).

O mesmo autor destaca que os solos de viveiros são conglomerados de diferentes perfis, completamente embutidos em água e destituídos de espaços com ar. Viveiros em grandes áreas represadas possibilitam a entrada de nutrientes dissolvidos e partículas de solo devido à lixiviação. O processo de sedimentação da matéria orgânica, que comumente ocorre em viveiro devido ao manejo empregado, modifica as propriedades do solo Grande parte da armazenagem de substâncias, processos químicos e biológicos, substâncias suspensas e dissolvidas são derivados ou dependem da interação com o sedimento. Substâncias que entram no solo podem ser armazenadas permanentemente ou podem ser transformadas em outras por meio físico, químicos ou biológicos e, liberadas para a água, por meio de mudanças (trocas) de íons, dissolução (equilíbrio) e decomposição. O fluxo de água no fundo do viveiro tem papel importante na decomposição do nitrogênio, fósforo e cálcio (BOYD, 1995).

No sedimento, ocorrem processos e reações que em muitas vezes são responsáveis pela alteração da coluna d` agua. Dentre as reações estão a dissolução, a hidrólise, a neutralização, a oxidação, a redução, a adsorção, a mudança de cátions e a hidratação e dentre os processos pode-se citar a sedimentação, a decomposição, a fotossíntese, a difusão, a infiltração, a erosão e a ressuspensão (BOYD, 1982).

O sedimento em sistemas artificiais rasos é o principal compartimento com interferência direta nas condições limnológicas dos viveiros de criação de peixes. O manejo empregado na aquicultura e as condições climáticas locais afetam o sedimento que por sua vez pode impactar diretamente na coluna d água (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2013).

Um dos principais impactos associados com a criação de peixes resulta dos resíduos metabólicos, fezes e alimento não digerido (TALBOT e HOLE, 1994). Os resíduos sólidos estão suspensos ou acumulados sobre o sedimento e são constituídos, principalmente, de carbono orgânico e compostos de nitrogênio. Já os resíduos solúveis são, geralmente, derivados de produtos metabólicos do cultivo ou são produtos da decomposição e lixiviação (YOO et al., 1995; SIPAÚBA-TAVARES, 2000).

Neste contexto, a eutrofização dos recursos hídricos é um dos maiores impactos causados pela aquicultura (BOYD et al. 2005), pois o aumento da disponibilidade de nitrogênio e fósforo é fator primordial para elevar o grau de trofia das águas superficiais e a degradação desses ecossistemas (CHEN et al., 2010). Sob esse aspecto, a disponibilidade de oxigênio, elemento necessário para a respiração dos organismos e decomposição de detritos também é comprometida, uma vez que a adição de alimento aumenta a demanda por este gás. Segundo Kaur & Ansal (2010), a depleção de oxigênio dissolvido resulta na produção de gases tóxicos como o CO_2, H_2S, NH_3, etc., além de poder disseminar doenças parasitárias.

Dentre os nutrientes dissolvidos na água, os mais importantes para determinar padrões de qualidade são os compostos fosfatados e nitrogenados (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011). Somente parte dos nutrientes dos alimentos e fertilizantes compõe o produto final da produção, os restos não consumidos podem permanecer no sedimento, sendo mineralizados pelas bactérias ou disponibilizados na coluna d’água. A decomposição da matéria orgânica (fezes, restos de animais mortos, alimento fornecido e não consumido) favorece o aumento da concentração de N e P, pois durante esse processo há liberação de formas solúveis de nitrogênio (ex. nitrito, nitrato, amônio, aminoácidos) e fósforo (ex. ortofosfatos, fosfoproteínas, fosfolipídeos) (MIRES ,1995).

Grande fração do N e P não utilizado pela biota aquática se acumula no sedimento podendo ser armazenado em uma proporção de 100 a 1000 vezes mais concentrado do que na coluna d’água. Assim sendo, o monitoramento da água e do sedimento serve como importante mecanismo para evitar a eutrofização ou mesmo o florescimento de algas que geralmente ocorre em ambientes ricos em nutrientes como os viveiros e os tanques de piscicultura (RAHMAN et. al, 2008).

Embora o fósforo seja encontrado em concentrações menores na água, ele é um elemento metabólico chave e sua disponibilidade frequentemente regula a produtividade nas águas naturais. Em piscicultura, a dinâmica do fósforo é controlada pelo arraçoamento e fertilização dos tanques e viveiros. Entre as formas de P, as formas solúveis de P-ortofosfato ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}) assumem maior relevância por serem as principais formas assimiladas pelos vegetais aquáticos (ESTEVES & PANOSSO, 2011).

Entre os principais compostos nitrogenados estão o nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) e o nitrito ($N\text{-}NO_2$) (SHISHEHCHIAN et al., 1999). Estes compostos são observados em águas com elevadas concentrações de nutrientes ou em camadas de água mais profundas com grande acúmulo quando ocorre a decomposição aeróbica (ONO & KUBITZA, 2003). O N-amoniacal é um produto da excreção nitrogenada e também da decomposição aeróbica (BOYD & ZIMMERMANN, 2010).

Em sistemas de cultivo fechados, com mínima ou nenhuma troca de água, o sedimento pode atuar como fonte de macronutrientes, tais como nitrogênio e fósforo ou pode ainda conter elevadas concentrações de micronutrientes que, geralmente, não estão presentes em grandes concentrações na coluna d'água (cobre, ferro, manganês e zinco), porém em excesso podem prejudicar toda a produção (AVNIMELECH & RITVO, 2003).

O potencial de um viveiro para a produção de peixes pode ser determinado por meio de análise química do sedimento, determinando-se pH, os teores de fósforo, nitrogênio e carbono inorgânico e a relação carbono/ nitrogênio (BOYD,1995). Na maioria dos ecossistemas aquáticos continentais, a concentração dos compostos químicos no sedimento é significativamente maior do que nos demais compartimentos, portanto, o sedimento funciona como um reservatório de nutrientes influenciando o trofismo do meio aquático (BOYD, 1995; ESTEVES, 2011).

Em piscicultura o perfil do fluxo de nutrientes é complexo e as maiores fontes de nutrientes são a excreção dos peixes e alimento. Assim, a água e o sedimento são afetados por esses fatores e a analise da qualidade destes podem fornecer as condições e potenciais de risco dos viveiros de criação de peixes (OSMAN & KLODAS, 2010). Desta forma, a interação entre a água e os sedimentos do fundo dos viveiros de aquicultura é de fundamental importância, pois o manejo inadequado da

água e dos sedimentos pode prejudicar a sobrevivência e o crescimento dos organismos aquáticos cultivados (RIBEIRO et al, 2005).

2.2. Qualidade da água em Aquicultura

Os tanques e viveiros de piscicultura são ecossistemas dinâmicos, caracterizados pela baixa profundidade e fluxo contínuo de água, que afetam diretamente as variáveis limnológicas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2010). Portanto, esses sistemas são sustentados por complexos fatores físicos e químicos e por interações bióticas que dependem diretamente da qualidade da água.

Diversos parâmetros de qualidade de água têm influencia na produtividade de sistemas aquícolas. As variáveis físico-químicas mais apropriadas para verificação da qualidade da água de viveiros são: oxigênio dissolvido; pH; alcalinidade total; condutividade elétrica; temperatura; transparência; nutrientes e abundância de plâncton (TOLEDO & CASTRO, 2001).

Um fator que afeta a qualidade da água na aquicultura é o fluxo de água, técnica utilizada na região sudeste do Brasil. A água de um viveiro que é drenada diretamente para o viveiro subsequente, juntamente com as fezes dos peixes e resíduos alimentares que são ricos em nitrogênio e fósforo, levarão à deterioração da qualidade da água (BOYD & QUEIROZ, 2001; SIPAÚBA-TAVARES et al, 2010).

O fluxo de água é extremamente importante, sendo responsável em parte pelo transporte de nutrientes, microrganismos, adição de oxigênio e matéria orgânica ao meio. Os limites de tolerância da qualidade da água dependem muito das espécies cultivadas, especialmente em relação aos fatores ambientais como temperatura, oxigênio, pH, carbono, nutrientes, turbidez, entre outros. A aquicultura utiliza grande quantidade de água sem a preocupação de como vai ser utilizada, com perdas por infiltração ou evaporação. A qualidade da água só pode ser manejada de forma adequada através do entendimento dos processos biológicos juntamente com os fatores abióticos do meio (SIPAÚBA-TAVARES, 2005).

O manejo tem influência direta na limnologia dos sistemas de cultivo, por exemplo: o aumento na concentração de cálcio acarreta uma elevação da alcalinidade

e pH, condições que podem levar a eutrofização da água. Em pH elevado, o nitrogênio é transformado em amônia gasosa escapando para a atmosfera (PILLAY,1992).

A deterioração da água pode ocorrer a partir da eutrofização, pois a excessiva quantidade de matéria orgânica introduzida no viveiro cria condições favoráveis às doenças, pois as bactérias também estão relacionadas ao estado trófico do meio (SIPAÚBA-TAVARES, 2005).

A aquicultura pode levar a eutrofização natural ou antropogênica e, portanto, há necessidade de abordagens interagindo a limnologia do manejo de cultivo com o objetivo de avaliar os prováveis fatores que estão atuando diretamente no sistema, garantindo desta forma, uma alta biomassa (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2010).

A baixa profundidade e a dinâmica dos tanques e viveiros de piscicultura são diretamente influenciadas pelas condições locais ao longo do dia. Os viveiros apresentam diferenças limnológicas entre si, mesmo que sejam manejados de forma similar, contendo o mesmo tipo de peixe, mesma densidade de estocagem, com abastecimento de água de uma única origem e posicionados um ao lado do outro. Essas variações são muito mais pronunciadas ao longo do ano (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2006, 2007).

O crescimento da aquicultura acarreta problemas que afetam o regime das águas, empatando os mananciais naturais e diretamente a qualidade da água, sendo esta a responsável para o sucesso da produção racional dos viveiros. Apesar de diversos estudos sobre a qualidade da água em viveiros, ainda falta um entendimento de como realmente esses ecossistemas funcionam e interagem com os fatores bióticos, abióticos e sedimento, pois qualquer perturbação altera a qualidade da água e consequentemente, pode causar danos às espécies comercializadas (SIPAUBA-TAVARES, 2005).

2.3. A importância dos microrganismos em Aquicultura

Os microrganismos são importantes integrantes da estrutura biológica da água e do sedimento dos viveiros de piscicultura. Atuam no metabolismo dos ecossistemas aquáticos desempenhando papel fundamental no processo de produção primária e

decomposição. As transformações da matéria orgânica por meio do metabolismo microbiano são importantes nos ciclos biogeoquímicos e no fluxo de energia desses ecossistemas (NAYAK & SAVAN, 1999; MORIARTY, 1997).

O sedimento pode ser considerado como o resultado da integração de todos os processos que ocorrem em um ambiente aquático. Do ponto de vista de ciclagem de matéria e fluxo de energia, o sedimento é um dos compartimentos mais importantes. Nele ocorrem processos biológicos, físicos e químicos que influenciam o metabolismo de todo o sistema e consequentemente a comunidade microbiana (ESTEVES, 2011). A qualidade do sedimento está extremamente relacionada com a qualidade das águas superficiais e subterrâneas, influenciando direta ou indiretamente a manutenção da vida na grande maioria dos ecossistemas globais (SOLOMONS & BRILS, 2004).

As propriedades e particularidades dos sedimentos são extremamente relacionadas com a estrutura das comunidades microbianas presentes no meio. Os microrganismos contribuem para a estabilidade de ecossistemas, sendo também responsáveis pela ciclagem de compostos essenciais como o carbono, o nitrogênio e o fósforo. As bactérias heterotróficas são especializadas na transformação de matéria orgânica. Segundo Sherr & Sherr (1988), esses organismos convertem carbono orgânico dissolvido em carbono particulado, tornando-o potencialmente disponível para níveis trófico superiores. O ciclo global do carbono é, sem dúvida, o mais afetado pela ação dos microrganismos (REX *et al*.,2006), entretanto, estes também influenciam os ciclos do fósforo, nitrogênio e enxofre.

A concentração de oxigênio presente no sedimento é limitada pela sua baixa solubilidade na água intersticial. Assim, na superfície dele ocorre a oxidação aeróbia da matéria orgânica, porém após poucos centímetros de profundidade, sedimentos não perturbados tornam-se quase universalmente anóxicos. Os organismos procarióticos são muito versáteis na obtenção de energia, pois utilizam diferentes receptores de elétrons na ausência de oxigênio (NEALSON, 1997) tornando esses microrganismos numerosos nos sedimentos. Bactérias amonificantes liberam amônia de certas substâncias nitrogenadas e bactérias nitrificantes oxidam a amônia a nitrito e nitrato. Na ausência de oxigênio livre, as bactérias redutoras de sulfato podem produzir sulfeto de hidrogênio, que, se difundido nas águas oxigenadas, pode ser oxidado com a formação de sulfato ou enxofre (ZOBELL & MORITA 1959).

A piscicultura tem demonstrado que afeta a composição microbiológica do sedimento por introduzir nutrientes no sistema, causando depleção de oxigênio e, ocasionalmente, expondo-o a antibióticos (TAMMINEN et al, 2011). A poluição orgânica consequente da eutrofização influencia os processos biogeoquímicos e as comunidades microbianas bênticas (ASAMI et al, 2005; HOLMER & KRSTENSEN,1996; MCCAIG et al,1999; RAJENDRAN et al,1997). Considerando que a distribuição bacteriana é estreitamente relacionada às propriedades do sedimento (DANOVARO e FABIANO, 1995), a abundância bacteriana pode ser utilizada como um forte indicativo de mudanças no fluxo de nutriente resultante de variações sazonais.

2.4. Utilização Análise molecular e abordagem metagenômica da diversidade microbiana do sedimento

Muitas pesquisas estão sendo realizadas voltadas as análises das regiões de DNA conservadas entre microrganismos do meio ambiente, principalmente para estudos filogenéticos. Um exemplo disso é análise do DNA que codifica o gene do RNA ribossomal 16 S (16S rDNA). Essa molécula é um componente da subunidade menor do ribossomo, que é bastante utilizado para estudos taxonômicos e identificação de espécies bacterianas (PETTI et al., 2005). É uma sequencia relativamente conservada e está presente em todas as bactérias, possibilitando a identificação das mesmas.

A utilização do gene *16S rRNA* e a possibilidade de se estudar o material genomico total extraído de um ambiente revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, tornou-se possível a determinação das posições filogenéticas de comunidades bacterianas do meio ambiente (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1998; HENTSCHEL, et al.,2002). Coletivamente, os genomas da microbiota total encontrados em uma comunidade são denominados de metagenoma (HANDELSMAN et al.,1998; HANDELSMAN, 2004), sendo que esta estratégia propicia o acesso a muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Além disso, essas metodologias podem ser aplicadas para identificar genes de organismos em diferentes ambientes, genes envolvidos em diversos

processos metabólicos (mineralização e decomposição da matéria orgânica, por exemplo) ou que possam ser utilizados em processos biotecnológicos (SEBAT et al., 2003).

O gene *16S rRNA* é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos (WOESE et al., 1987) com regiões conservadas e variáveis que se alternam e que permitem a determinação das relações filogenéticas entre os microrganismos bacterianos (LUDWIG et al., 1997). Este gene está presente em todos as bactérias e possui um alto grau de conservação. O desenvolvimento da PCR e de técnicas de sequenciamento tem consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia.

A região codificadora do gene *16S rRNA* (16S rDNA) apresenta diversas porções, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis numeradas de 1 a 9 (V1 a V9) e estas são diversificadas entre as espécies bacterianas. Assim, as sequencias desse material se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (LIU e STAHL, 2002). Através da amplificação do 16s rDNA, a partir do DNA genômico ou metagenômico, utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais, é possível identificar qual ou quais espécies estão sendo estudadas, baseado nas diferenças encontradas entre as regiões hipervariáveis das sequencias amplificadas (MUNSON et al., 2004).

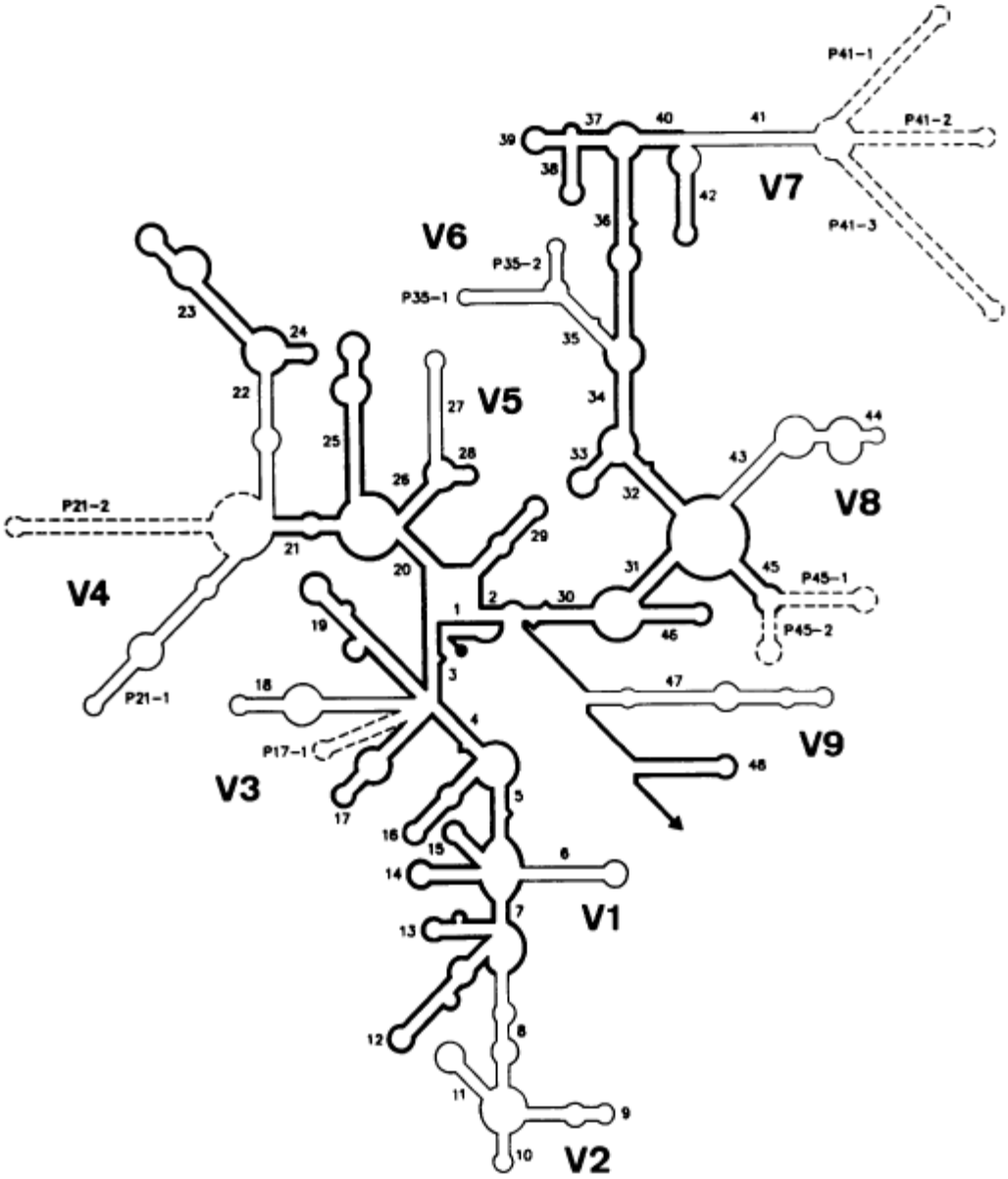


Figura 1. Modelo da estrutura secundária do rRNA. As linhas mais escuras representam regiões mais conservadas e as linhas mais finas representam regiões variáveis (V1 à V9) (NEEFS et al., 1991).

Esta metodologia tem sido aplicada em estudos de composição, dinâmica e funções de comunidades microbianas em uma variedade de ecossistemas, incluindo os sujeitos a modificações antrópicas (GILBERT e DUPONT, 2011). No Brasil, o primeiro estudo metagenômico de água doce foi realizado no Rio Solimões, compreendendo a análise da diversidade microbiana da maior bacia hidrográfica do mundo (GHAI et al., 2011).

Essa abordagem moleculares independente de cultura também tem sido utilizadas para estudos da ecologia microbiana em sedimentos de água doce (ALTMANN et al., 2003; MACGREGOR et al., 2001). A comparação da composição das populações bacterianas em sedimentos superficiais e da coluna de água, a fim de revelar quais bactérias são realmente restritas a este habitat. Além disso estudos nessa área também podem auxiliar a elucidar o papel desenvolvido por estes microrganismos nos sedimentos de viveiros de aquicultura, a fim de se caracterizar a microbiota envolvida nos processos metabólicos deste sistema e que são fundamentais para o equilíbrio e para o sucesso do cultivo de peixes em viveiros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

O trabalho foi desenvolvido no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), campus de Jaboticabal - SP, (21º15’ S e 48º18’O e altitude média de 595 m). O CAUNESP apresenta um conjunto de 79 tanques com fluxo contínuo de água, utilizados pelos setores de piscicultura, ranicultura e carcinicultura e de seis viveiros maiores com tamanho variando de 2.306 m² a 5.671 m² com profundidade média de 1,30m, conforme ilustrado na Figura 1.

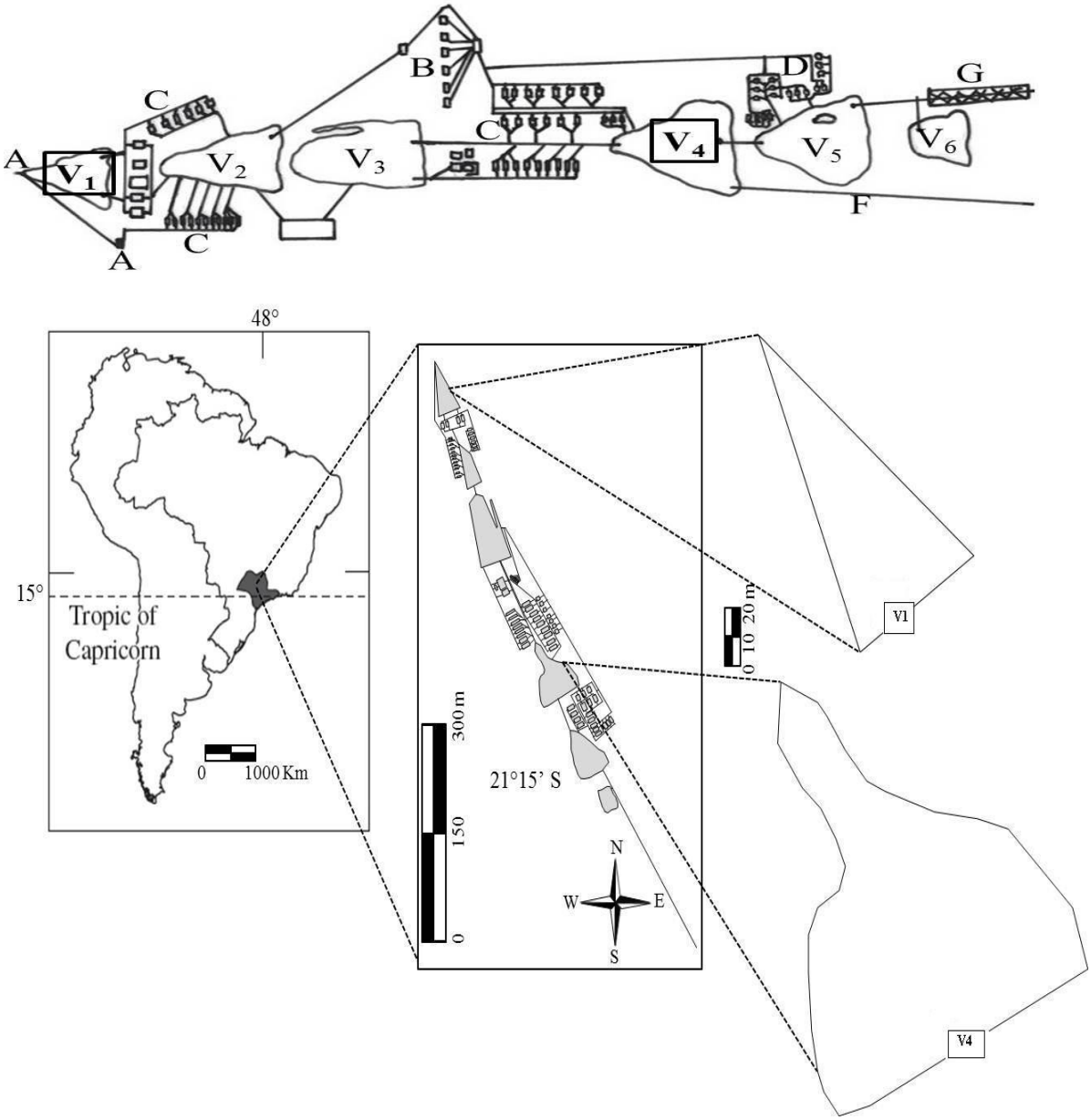


Figura 2. Desenho esquemático da localização do sistema de aquicultura do CAUNESP, enfatizando os dois viveiros estudados, onde V1 = entrada de água do viveiro, V4= saída de água (local de coleta).

O primeiro viveiro funciona como reservatório de água, e os outros cinco viveiros são utilizados para prática de criação semi-intensiva de organismos aquáticos para fins de pesquisa. A circulação de água nos seis viveiros (V1- V6) é do tipo sequencial, ou seja, a água de um viveiro deságua diretamente para o próximo sem tratamento prévio, 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.

Foram selecionados dois viveiros neste sistema, mostrados na Figura 2: V1= reservatório de água e V4 = viveiro eutrófico (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2010), sendo que os pontos de amostragem estavam localizados nas saídas destes viveiros. As amostragens foram realizadas em duas épocas, de Julho e Agosto/2012) e Janeiro e Fevereiro/2012).

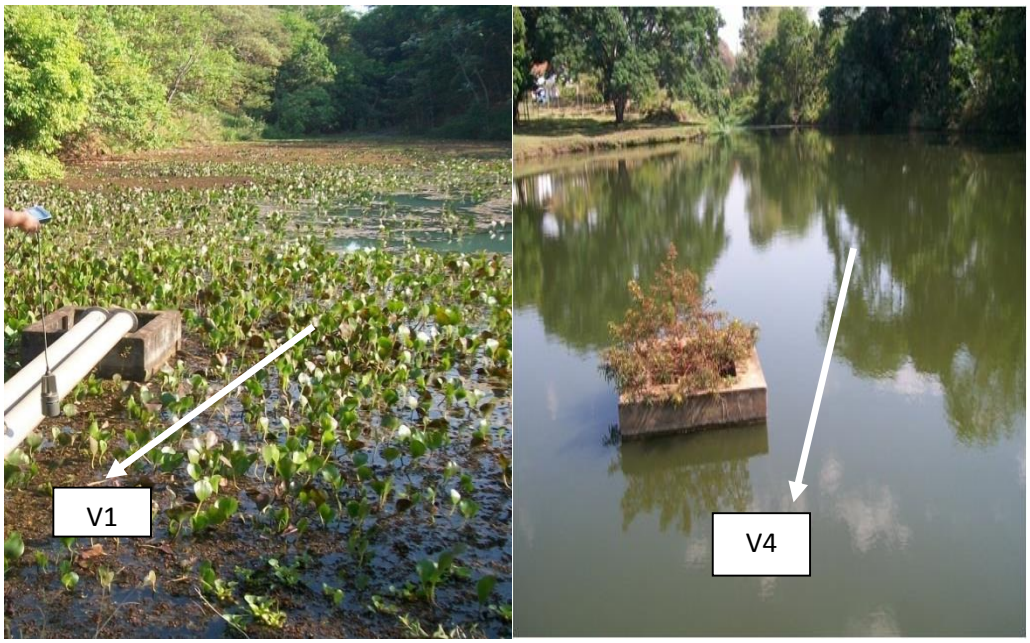


Figura 3. Pontos de coletas nos viveiros do CAUNESP, onde: V1 = reservatório de agua e V4 = viveiro eutrófico. As setas indicam os pontos amostrados.

O viveiro utilizado como reservatório (V1) apresenta grande quantidade de macrófitas aquáticas (*Eichhornia azurea* e *Salvinia auriculata Aublet)* não ocorrendo criação de peixes neste local. Os peixes remanescentes da época em que esse viveiro era utilizado como sistema de criação sobrevivem da própria biota (SIPAÚBA-TAVARES, 2006). Desde 1995, este viveiro é utilizado como reservatório de água pelo o sistema de aquicultura, recebendo água de um conjunto de nascentes (total de 15), entretanto, o V1 tem grande aporte de material orgânico proveniente de outros setores da Universidade (SIPAÚBA-TAVARES et al, 2010; DIAS e SIPAÚBA-TAVARES, 2012). O quarto viveiro do sistema sequencial do CAUNESP (V4) apresenta as piores

condições limnológicas de todo o conjunto de viveiros (SIPAÙBA-TAVARES et al, 2010). Essas condições estão relacionadas ao aporte de material alóctone proveniente dos tanques e viveiros localizados acima, como também da ranicultura cuja água de lavagem de fezes e restos alimentares deságua diretamente neste viveiro.

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 22ºC 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 na coluna d'água.

3.2. Análises do sedimento

As amostras de sedimento foram obtidas usando um tubo coletor de PVC de 4 cm de diâmetro e 1,5 m de comprimento em tréplica próximo a saída de água (OW). Foram analisados o pH e Matéria Orgânica (M. O) de acordo com a metodologia de Raij et al (2001), o fósforo (P) de acordo com Wetzel (1975). Todas as amostras foram transportadas para o laboratório sob refrigeração e devidamente armazenadas.

3.3. Análise das variáveis limnológicas

As análises de variáveis limnológicas foram realizadas no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do CAUNESP. Para tais análises, coletou-se água do fundo 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 (NO_3), nitrito (NO_2) e amônia (NH_4) foram determinados de acordo com Golterman et al. (1978) e Koloreff (1976), através de espectrofotometria.

3.4. Extração do DNA metagenômico e amplificação do gene 16S rRNA

Para as extrações do DNA total utilizou-se FastDNA® SPIN Kit for soil (MP Biomedicals), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As subréplicas dos sedimentos coletados deram origem a uma amostra composta para cada viveiro e foram utilizadas para a extração do DNA. A qualidade do DNA metagenômico extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL). Os géis foram visualizados sob luz UV e registrados através de um sistema de documentação de géis Gel Doc 1000, (Bio Rad, USA). A concentração e pureza do DNA foi analisada através da relação das absorbâncias obtidas a 260 e 280 nm, 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 as regiões V1, V2 e V3 do gene (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 MgCl2 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 20µL 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 TEB 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. 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).

3.5. Purificação dos amplicons

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 dos fragmentos do gel de agarose utilizou-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), seguindo o protocolo conforme instruções do fabricante.

Os fragmentos obtidos foram analisados 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 visualização da qualidade desses amplicons purificados, a quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Uniscience) conforme descrito anteriormente.

3.6. Clonagem dos fragmentos do gene 16S rRNA amplificados

A clonagem dos fragmentos de 16S rDNA amplificados foi realizada utilizando-se do kit comercial vetor CloneJET™ (Fermentas), específico para clonagem de fragmentos de PCR, de acordo com as instruções do fabricante (Figura 3).

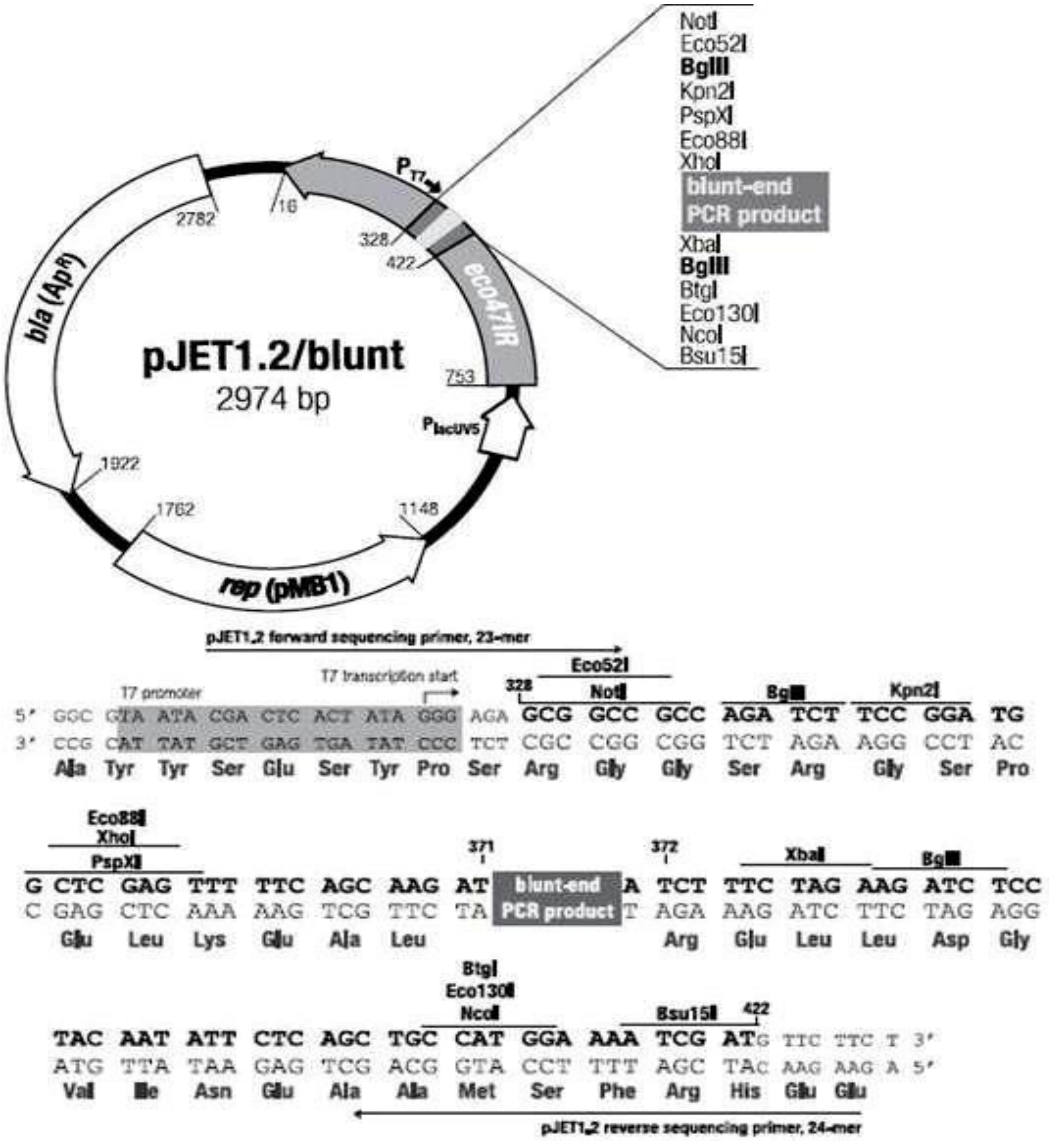


Figura 4. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor pJET1.2/blunt (Fermentas).

Para a clonagem dos *amplicons* seguiu-se o protocolo *Sticky-End Cloning* e foi utilizado 150 ng de cada amostra amplificada em uma reação com volume total de 20 µL. Após a ligação dos fragmentos do gene 16S rRNA ao vetor pJET1.2/blunt esse material foi utilizado para transformação de células competentes de *E. coli* DH10B. As células transformadas foram cultivadas em meio LB sólido acrescido de 100 µg/mL de ampicilina, à 37°C por 20 horas. .

Todas as colônias transformantes observadas foram coletadas com palitos de madeira esterilizados por autoclave. Os clones foram organizados em multiplacas de

96 poços contendo 100 µL de meio líquido LB (acrescido de 100 µg/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, e então as placas foram seladas com adesivos e armazenadas a -80°C para posterior utilização na extração dos plasmídeos.

Assim, foram obtidos coleções de clones das diferentes amostras ambientais em estudo que passaram a constituir 4 bibliotecas de clones com sequencias parciais de genes 16S rRNA, Biblioteca obtida pelo amplificação do material metagenomico do viveiro de abastecimento (V1) ou do viveiro eutrofizado (V4), coletados na época de chuva e na seca, V1-C, V1-S, V4-C e V4-S, respectivamente.

3.7. Extração de DNA plasmidial

Os clones foram cultivados em multiplacas (Eppendorf) contendo 1,2 mL de meio LB com 100 µg/mL ampicilina, com agitação contínua de 220 rpm, à 37°C, durante 22 horas. Após o cultivo, as placas foram centrifugadas durante 6 minutos, à temperatura ambiente à 4000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e a placa invertida em papel absorvente durante 5 minutos.

A extração de DNA plasmidial dos clones obtidos foi realizada utilizando-se o kit Wizard® MagneSil® Plasmid Purification System (Promega). No processo, primeiramente as células são ressuspendidas na solução *Cell resuspetion*, em seguida o material sofre lise através da *Cell lysis solution*. Após essa etapa a solução é neutralizada com *Neutralization solution*. O processo utiliza *beeds* 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 *Magnesil red* que captura o DNA purificado. Após esses passos o DNA é lavado por centrifugação com etanol 80%, ocorrendo posterior evaporação do mesmo por aproximadamente 30 minutos. O processo de extração termina utilizando-se 50 µL do tampão *Elution buffer* para a obtenção do DNA plasmidial purificado. 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).

3.8. Sequenciamento dos clones obtidos

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'); 4µL de tampão (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM MgCl2; 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, 39 ciclos (10 segundos por 96°C, 10 segundos por 52°C e 4 minutos por 60°C).

Após a reação, as amostras foram preparadas para o 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 20ºC 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 centrifuga descrita anteriormente, e os sobrenadantes foram descartados. As placas foram secas durante 30 minutos em suave fluxo de ar. Em seguida, as amostras foram ressuspendidas 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.

3.9. Análises 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 sequencias 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%. Esse parâmentro segundo informações obtidas no Manual *Bergey's Trust*, classifica os níveis taxonômicos em Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. Utilizou-se também da ferramenta LibCompare (COLE et al., 2009) com confiabilidade de 80% para comparação das sequencias das amostras estudadas e com identificação dos grupos 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 auxiliaram na caracterização física e química da água dos viveiros estudados nos diferentes períodos amostrados (Tabela 1).

Durante o período analisado, a temperatura da água em todos os pontos amostrados variou de 19,7 a 26,7, sendo que em V4 a temperatura foi ligeiramente superior nas duas épocas estudadas com relação às temperaturas do V1. Como era esperado as temperaturas menores ocorreram na época de seca e na chuva elas

foram mais elevadas para os dois viveiros, pois essas duas épocas correspondem ao inverno e verão respectivamente. Essa temperatura é considerada adequada para o abastecimento de uma piscicultura, já que a temperatura para cultivo de peixes tropicais gira em torno de 20 a 30°C (KUBTIZA, 1998). Os valores médios de pH variaram entre 4,8 e 7,1. O pH ácido encontrado para o viveiro de abastecimento ao longo do estudo foi condizente aos valores publicados por Sipaúba-Tavares et al. (2010), sendo característico da água de nascente da região.

De maneira geral, verificou-se que as variáveis analisadas apresentaram diferenças entre os viveiros e também entre períodos climáticos. Os valores de V4 foram maiores que os encontrados em V1 corroborando com Meneghine (2013).

De acordo com Sipaúba-Tavares (1994) os valores de condutividade elétrica constantemente acima de 80 $\mu S.cm^{-1}$, conforme observamos em V4, podem ser indicativos de elevada matéria orgânica em decomposição.

Foram observadas maiores concentrações de amônia no V4, fato que é apontado como indicativo de degradação da qualidade da água (LANDA et al., 2007).

No V4, a concentração de nutrientes foi maior devido à descarga de efluentes oriundos da ranicultura e dos viveiros de piscicultura anteriores. Tais fatos promoveram aumento da quantidade de nutrientes na coluna d'água, em especial nas formas de nitrogênio e fósforo contribuindo com a eutrofização deste viveiro (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2010).

O sistema sequencial com fluxo contínuo de água, provavelmente promoveu o aumento de amônia no período chuvoso no V4. Sipaúba-Tavares et al (2007) demonstram que os efeitos das chuvas aumentam o fluxo de água nos viveiros e consequentemente, carreando mais partículas em suspensão para os viveiros subsequentes.

A presença de macrófitas flutuantes, emersas e submersas no primeiro viveiro pode explicar a menor concentração de nutrientes encontrada neste viveiro, pois essas plantas podem agir 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.

Tabela 1. Média e desvio padrão das análises físicas e químicas das amostras de água dos viveiros V1 e V4 nos períodos de chuva (C) e seca (S).

Variáveis	V1C	V1S	V4C	V4S
Temp	23,3 ± 0,3	19,7 ± 0,3	26,7 ± 0,7	20,8 ± 0,6
pH	4,8 ± 0,3	5,9 ± 0,5	5,6 ± 0,2	7,1 ± 0,5
Cond	46 ± 15,8	37,2 ± 1,3	101,5 ± 5,0	102,7 ± 4,1
OD	1,2 ± 1,1	1,5 ± 0,4	2,6 ± 0,5	6,5 ± 1,3
NO_2	1,9 ± 2,5	7,9 ± 7,3	31,5 ± 5,2	85,4 ± 15,3
NO_3	336,4 ± 50,6	238,8 ± 48,7	335,2 ± 15,8	364,6 ± 78,2
NH_4	76,8 ± 29,9	37,9 ± 18,2	415,8 ± 68,3	156,4 ± 22,3
OP	2,4 ± 4,2	12,0 ± 8,5	12,4 ± 10,3	53,1 ± 16,7
PT	92,8 ± 93,0	83,7 ± 80,0	121,4 ± 56,4	225,3 ± 11,4

V1C: Viveiro 1 período chuvoso; V1S: Viveiro 1 período de seca; V4C: Viveiro 4 período chuvoso; V4S: viveiro 4 período de seca; NO_2: nitrito; NO_3: nitrato; NH_4: amônia e amônio; OP: ortofosfato; PT: fósforo total.

Através da análise da Tabela 2 observa-se que o sedimento de ambos os viveiros apresentaram pH ácido. A acidez do solo pode ser explicada pela presença de enxofre, que ao formar ácido sulfúrico, provoca decréscimo do pH. Na decomposição das argilas, devido a ação do ácido, pode ocorrer a liberação de íons de ferro e alumínio em quantidades tóxicas à biota (SILVA et al, 2006). A concentração de matéria orgânica (M.O) e fosforo encontradas em V4 foi maior em ambos os períodos analisados.

Tabela 2. Analise química das amostras de sedimento dos viveiros V1 e V4 nos períodos de chuva (C) e seca (S).

Variáveis	V1C	V1S	V4C	V4S
pH $CaCl_2$ g/dm³	4,16	4,03	5,11	4,8
M.O mmolc/dm³	26,33	31,16	49,83	54,16
P resina mg/dm³	11,16	10,66	14,83	17,5

A diversidade bacteriana foi analisada por meio de análise parcial do gene *16S rRNA*. Através da construção das bibliotecas de clones com fragmentos do gene 16SrRNA pode-se comparar as diferenças entre as comunidades bacterianas do

primeiro viveiro (V1) e no viveiro 4 (V4) em duas épocas, sendo, os períodos de seca (S) e chuva (C). Assim, 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.

Após sequenciamento das 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 70%. Só foram consideradas as sequencias que apresentaram 100% de confiabilidade no domínio bactéria, o restante foi automaticamente considerada bactérias não-classificadas pelo banco de dados.

Para a biblioteca V1C, dos 384 clones sequenciados, apenas 228 sequencias apresentaram-se confiáveis e foram analisados para comparação no RDP. Já para a biblioteca V1S, apenas 138 sequencias foram utilizadas nas análises. De acordo com os dados gerados pela ferramenta *Classifier* foi possível identificar a similaridade das sequencias depositadas nesse banco de dados e através dessa identificação foram construídos os gráficos comparativos abaixo. A Figura 4 demonstra a comparação entre os filos mais encontrados enquanto a Figura mostra a comparação entre as classes mais encontradas nas bibliotecas.

Independente da época de coleta, a composição microbiana do sedimento de V1 permaneceu praticamente inalterada, tendo a predominância dos mesmos grupos, sugerindo que a área de estudo encontra-se em equilíbrio em relação à microbiota. De um modo geral, encontrou-se 4 filos: Actinobacteria, Acidobacteria , Firmicutes e Proteobacteria (Figura 4).

Utilizando a ferramenta *LibCompare* do RDP (Figura 5) com confiabilidade de 70%, pode-se verificar que não houve diferença significativa entre as bibliotecas do viveiro de abastecimento analisadas entre os períodos de seca e chuva. Observou-se também uma quantidade muito grande de sequências que não foram identificadas, sendo 25,4% em V1C e 42% em V1S.

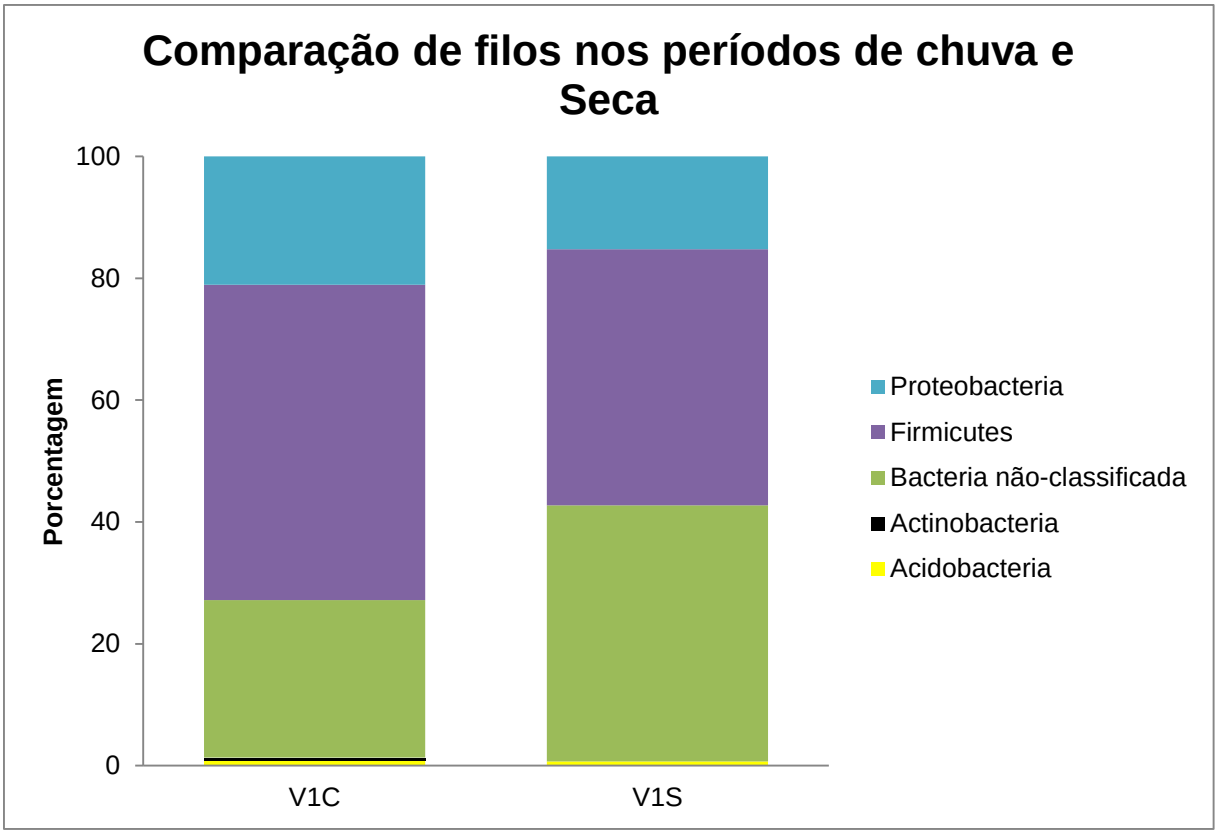


Figura 5. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.

A distribuição em nível de filo bacteriano para cada época avaliada revelou que Firmicutes e Proteobacteria foram os filos mais abundantes (Figura 4). Menor atribuição de sequências (com frequência menor que 1%) foi relacionada com os filos Acidobacteria e Actinobacteria.

O filo Firmicutes foi encontrado em todas as amostras, no entanto, nas amostras de V1, o número de sequências encontradas foi mais representativo, especificamente à subdivisão Bacilli, seguido da subdivisão Clostridia e Negativicutes.

O filo Firmicutes é comumente encontrado em sedimento de água doce (Newton et al., 2011). São conhecidos indivíduos aeróbicos e anaeróbicos, com capacidade de crescimento quando as fontes nutricionais estão abundantes e formam esporos em momentos de escassez (Atlas; Bartha, 1997).

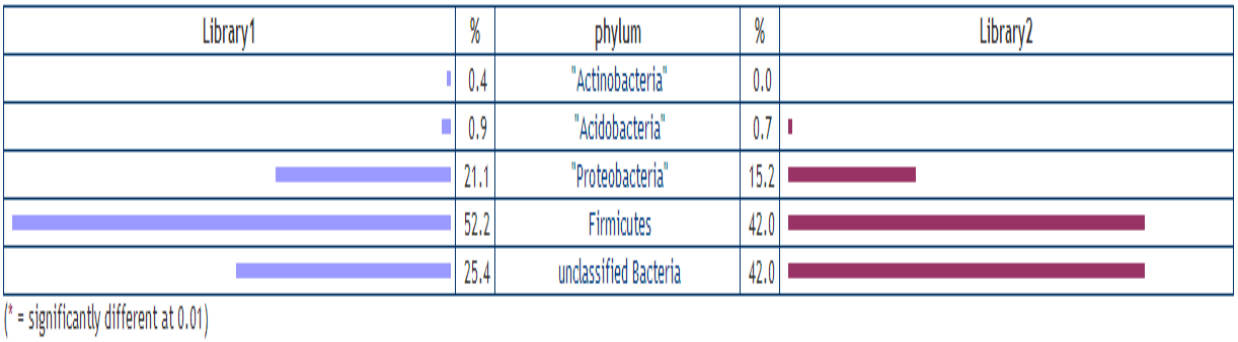


Figura 6. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA do viveiro 1. Library 1 corresponde ao período de chuvas (V1C) e Library 2 ao período de seca (V1S).

O filo Proteobacteria é o maior e mais diverso grupo de bactérias, sendo extremamente diverso morfológica e metabolicamente. Subdividido em 5 grupos: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria. Os seus representantes são comumente encontrados em solos e é de grande importância no ciclo global do nitrogênio (Alphaproteobacteria principalmente), no do enxofre (Deltaproteobacteria) (NUSSLEIN; TIEDJE, 1999). As Deltaproteobacterias apresentam alguns representantes com capacidade predatória no qual exerce sobre outros microrganismos, sendo capaz de liberar macromoléculas como algumas exoenzimas, por exemplo, proteases, lípases, nucleases, glucanases, estas todas de interesse biotecnológico (THOMAS et. al., 2008). Este filo foi encontrado em todas as amostras analisadas.

Segundo Newton e colaboradores (2011) as Proteobacterias residentes em água doce são competitivas sob baixas condições de nutrientes/substrato, semelhante ao viveiro de abastecimento, porém também são capazes de degradar compostos orgânicos complexos, além de participar do ciclo do nitrogênio.

Este filo apresenta o maior número de representantes capazes de fixar nitrogênio atmosférico, sendo que apresenta pelo menos um representante em cada uma das suas cinco classes (Alpha,Delta, Beta, Epsilon e Gamma). Dentre o filo Proteobacteria, as classes mais abundantes foram: Alphaproteobacteria (7,02%) e Gammaproteobacteria (7,02%) e Deltaproteobacteria (2,19%) na estação chuvosa e, 3,62%, 2,90% e 1,45% durante a estação seca, respectivamente (Figura 6). Não foram identificados representantes da classe betaproteobacteria no período de chuvas.

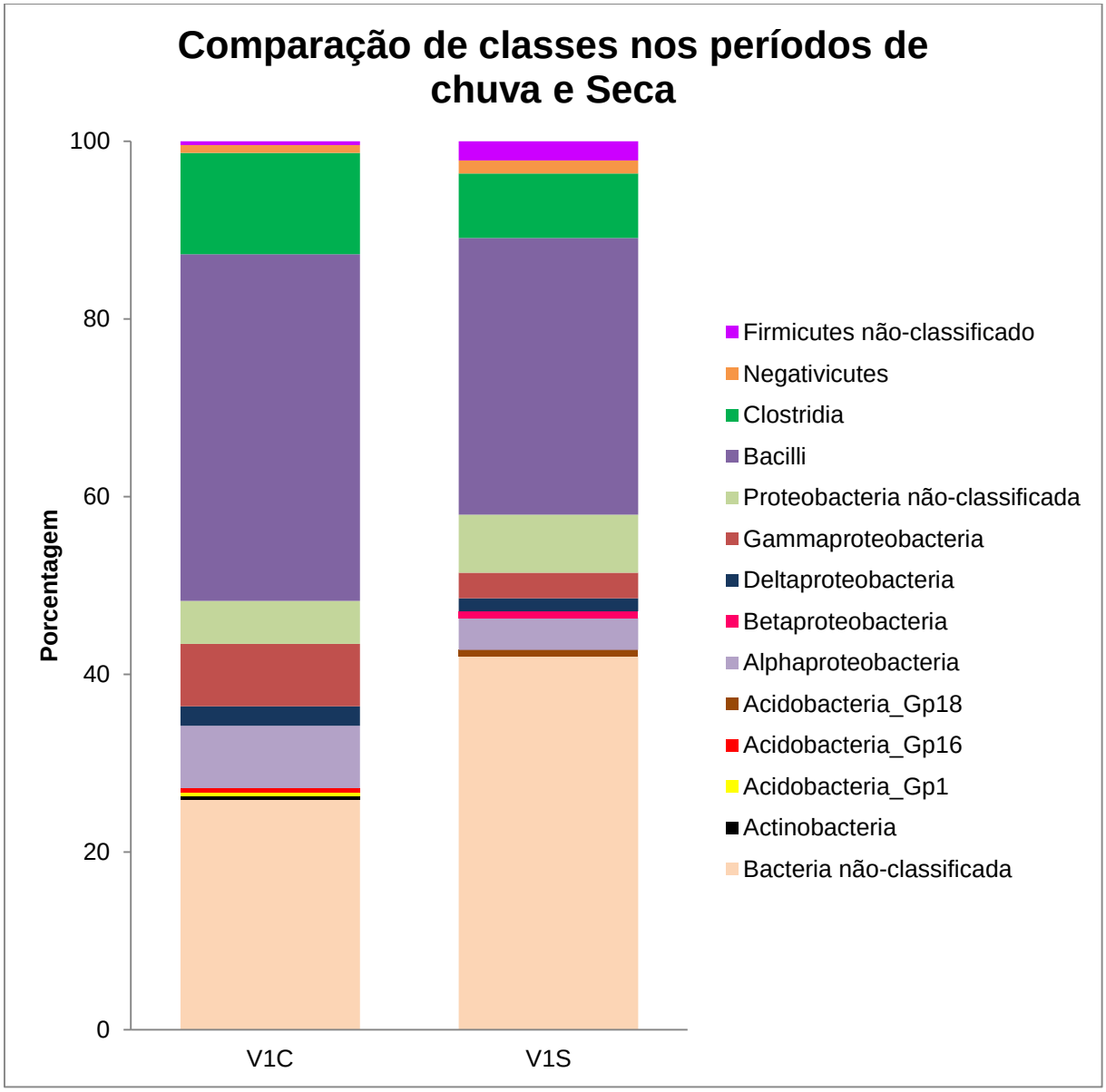


Figura 7. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 1.

As alphaproteobacterias estão no centro global do ciclo do nitrogênio, contendo muitos membros simbiontes que facilitam a fixação do nitrogênio atmosférico em plantas. Em água doce são menos numerosas, porém são dominantes em ecossistemas marinhos (NEWTON et al., 2011).

O grupo betaproteobacteria possui a capacidade de oxidar amônia, promovendo a nitrificação (OTAWA et al., 2006), e à degradação da matéria orgânica

(KIRCHMAN, 2001). A ocorrência deste grupo em V1S relaciona-se com a maior concentração de nitrito encontrada para este viveiro em relação a V1C. De acordo com Sipaúba-Tavares (2006), a presença de macrófitas no V1 influencia o fluxo dos nutrientes na água, alterando a dinâmica limnológica e microbiológica deste viveiro.

Quanto ao filo Acidobacteria, os subgrupos Gp1 (0,44%) e Gp16(0,44%) foram característicos da estação de chuva, enquanto o subgrupo Gp18 (0,72%) foi predominante na seca.

Já o filo Actinobacteria esteve presente somente no período chuvoso. As bactérias deste grupo são degradadoras de matéria orgânica como celulose, lignina e quitina, gerando biomassa protéica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (GAVA 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.

Os resultados obtidos para a população bacteriana dos sedimentos estudados demonstraram que os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes presentes no sedimento, são também encontrados com elevada frequência em lagos de água doce e marinha (ZWART et al., 2002; EILER & BERTILSSON, 2004). Assim como bactérias desses filos foram identificados por Wu et al. (2007) em um lago (*Lake Taihu*) eutrofizado no leste da China. Como os dois ambientes analisados são rasos (aproximadamente 1m de profundidade) há a interação entre a coluna d'água e o sedimento.

Para a biblioteca V4C, 195 sequencias foram analisados pelo RDP. Já para a biblioteca V4S, 279 sequencias apresentaram as características desejáveis para poderem ser utilizadas nas análises por esse banco de dados. De acordo com os dados gerados pela ferramenta *Classifier* pode-se construir os gráficos comparativos abaixo. A Figura 7 e 8 demonstra a comparação entre dos filos mais encontrados enquanto a Figura 9 mostra a comparação entre as classes mais encontradas nas bibliotecas.

Como pode ser visto nos gráficos, a frequência dos filos predominantes Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Actinobacteria mantiveram-se similares em ambas às épocas analisadas (Figura 7). No entanto, através da análise da

comparação das duas bibliotecas, percebe-se diferença significativa para o filo Firmicutes entre as épocas (Figura 8). Dentre as classes mais encontradas (Figura 9), observou-se que a Classe Clostridia estava presente apenas na biblioteca V4C, e a Bacilli em ambas as bibliotecas. No que se refere a esta última classe, percebe-se que a diferença significante vai até família, onde em V4C há maior número pertencentes à classe Bacilli (ordem Bacillales). Dentre as famílias em destaque na biblioteca 1 estão: Paenibacillaceae 2, Bacillaceae 1, Paenibacillaceae 1; enquanto na biblioteca V4S há apenas Bacillales não-classificados.

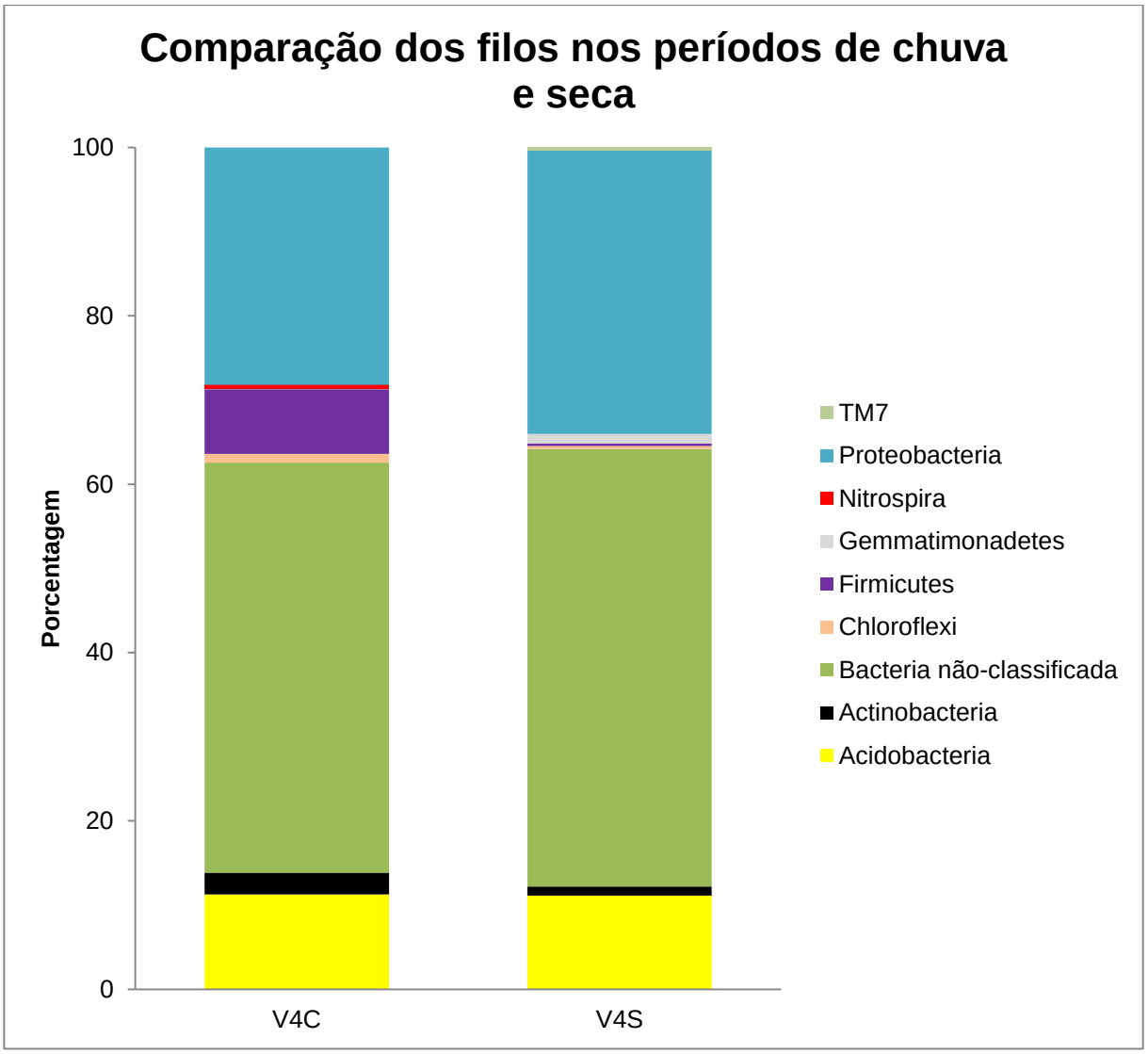


Figura 8. Abundância relativa (%) dos diferentes filos encontrados nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.

Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	TM7	0.4	
	2.6	"Actinobacteria"	1.1	
	0.0	"Gemmatimonadetes"	1.1	
	11.3	"Acidobacteria"	11.1	
	0.5	"Nitrospira"	0.0	
	7.7	Firmicutes *	0.4	
	1.0	"Chloroflexi"	0.4	
	28.2	"Proteobacteria"	34.1	
	48.7	unclassified Bacteria	51.6	

(* = significantly different at 0.01)

Figura 9. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V4C (viveiro 1 período chuvoso) e V4S (Viveiro 4 período seca), V4C (Library 1) e V4S (Library 2).

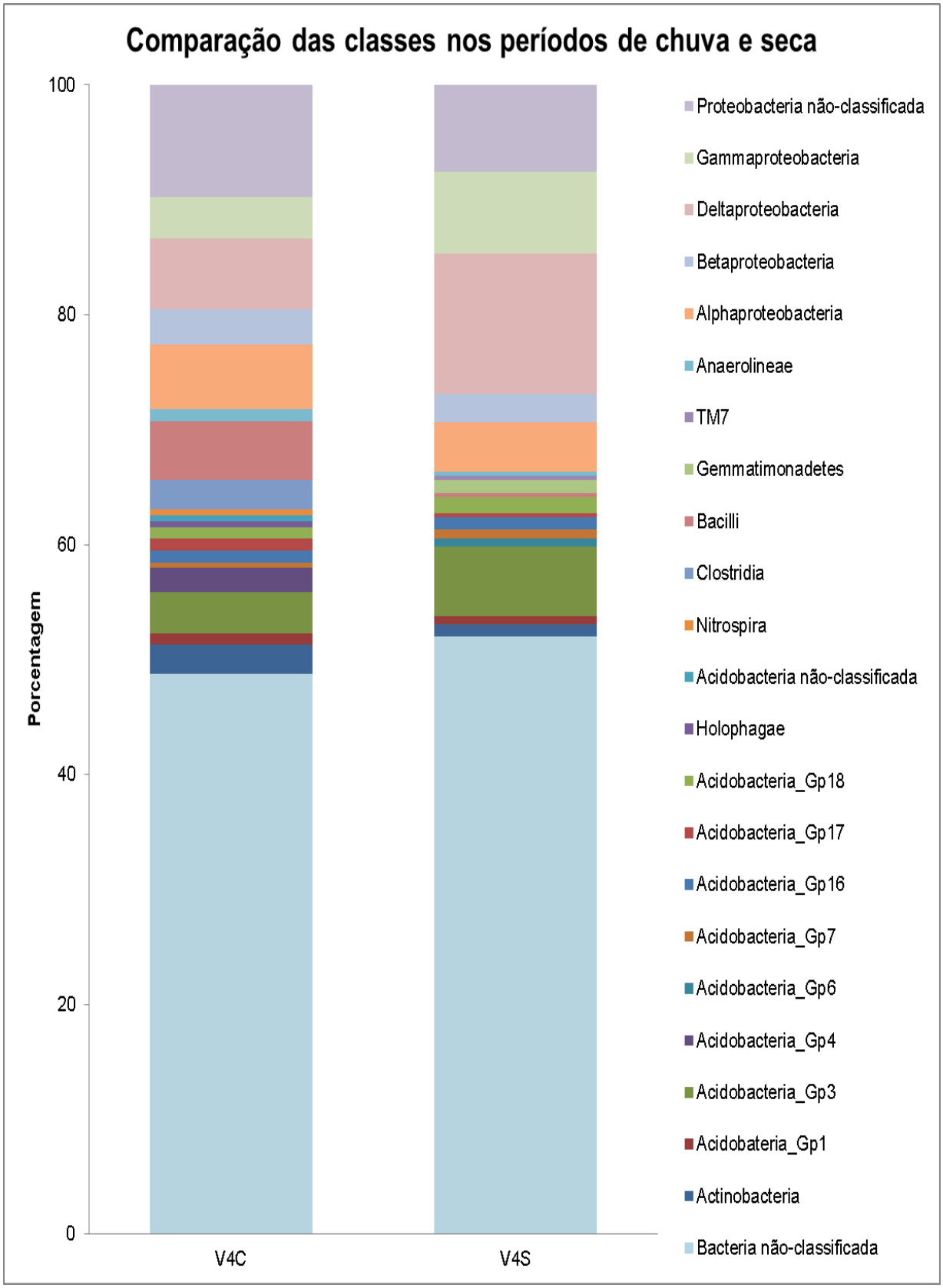


Figura 10. Abundância relativa (%) das diferentes classes encontradas nos períodos de chuva e seca no viveiro 4.

A análise da distribuição dos filos em V4 revelou, assim como no viveiro de abastecimento, que o filo Proteobacteria manteve-se entre um dos mais frequentes, sendo que as subdivisões Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria apresentaram maior proporção na seca. Geralmente essas duas classes são ubíquos em amostras de solo (TAMAMES *et al.*, 2010).

Smit et. al. (2001) com base em trabalhos da literatura, observaram que em solos com alto teor de nutrientes, dentre eles matéria orgânica, as Proteobacterias apresentaram altas taxas de ocorrência. Esses dados corroboram com o nosso trabalho em que as amostras do V4, que recebe elevada carga de efluentes, apresentaram maior índice de proteobacterias que o viveiro de abastecimento.

Além da predominância das Proteobacterias, observou-se também a presença de bactérias pertencentes ao filo Acidobacteria, com percentual em torno de 11% tanto na seca quanto na chuva. Os membros do filo Acidobacteria correlacionaram-se positivamente com o aumento da disponibilidade de fósforo e amônio (BACHAR *et al*. 2010).

O filo Acidobacteria possui 26 subgrupos baseados em semelhanças do gene 16S rRNA (BARNS et. al., 2007). Os subgrupos Gp1, Gp2, Gp3, Gp4 e Gp6 foram encontrados em maior abundancia em solos das Américas nos estudos de Jones et. al (2009).

O aumento de nitrito e amônia em V4 (Tabela 1) pode ter favorecido o aumento das classes pertencentes ao filo Acidobacteria (Figura 13) por este estar diretamente envolvido no ciclo do nitrogênio, reduzindo nitrato, nitrito e talvez, óxido nítrico (WARD *et al.*, 2009).

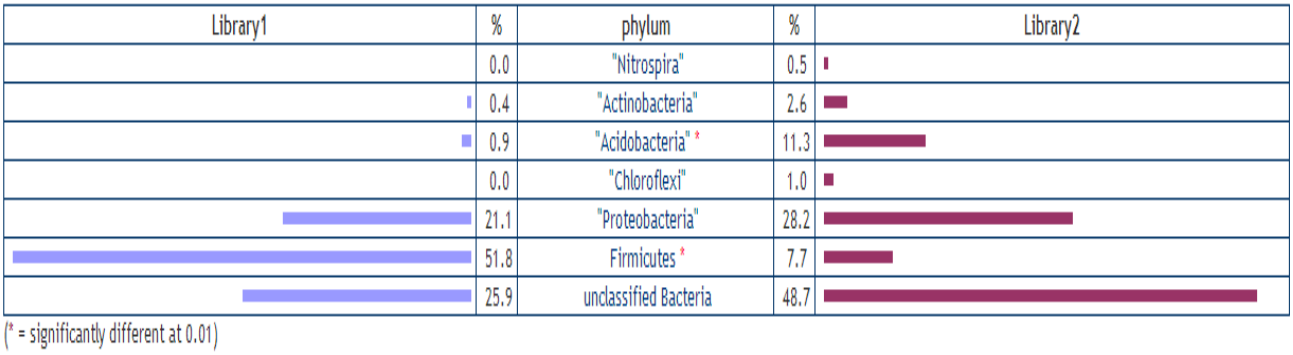
A diferença de proporção do filo Actinobacteria entre os viveiros pode estar relacionada com o aumento de nutrientes, pois este filo está relacionado à degradação de lignina de amostras ambientais (TAYLOR *et al*., 2012).

O ph ácido do sedimento, e as maiores concentrações de matéria orgânica e fosforo (Tabela 2) explicam a elevada frequência de Acidobacterias em V4. Os membros do filo Acidobacteria correlacionaram-se positivamente com o aumento da disponibilidade de fósforo e amônio (BACHAR et al., 2010).

Os filos Gemmatimonadetes e TM7 foram exclusivos da estação seca, e o Nitrospira da estação chuvosa. Já os filos Actinobacteria e Chloroflexi mantiveram-se frequentes em ambas as estações.

Organismos pertencentes ao filo Firmicutes prevalecem em ambientes com grande quantidade de nutrientes disponíveis e áreas com baixa competição, características típicas de microrganismos estrategistas. Geralmente são encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (ATLAS & BARTHA, 1997).

Utilizando a ferramenta *LibCompare* com confiabilidade de 70% comparou-se também qual a diferença significativa dos filos encontrados de acordo com o estado trófico dos viveiros, nas épocas distintas. Na Figura 11 mostra-se os resultados obtidos na comparação entre V1C (*Library 1)* e V4C *(Library 2)*.



Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	"Nitrospira"	0.5	
	0.4	"Actinobacteria"	2.6	
	0.9	"Acidobacteria" *	11.3	
	0.0	"Chloroflexi"	1.0	
	21.1	"Proteobacteria"	28.2	
	51.8	Firmicutes *	7.7	
	25.9	unclassified Bacteria	48.7	

(* = significantly different at 0.01)

Figura 11. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1C (viveiro 1 período chuvoso) e V4C (Viveiro 4 período chuvoso).

De acordo com os resultados obtidos percebe-se que como filos significativamente diferentes tem-se as Acidobacteria, presente em maior frequência em V4C; e Firmicutes, encontrado em maior frequência em V1C.

A Figura 12 demonstra os resultados obtidos na comparação entre V1S (Library 1) e V4S (Library 2).

Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	"Gemmatimonadetes"	1.1	
	0.0	TM7	0.4	
	0.0	"Actinobacteria"	1.1	
	0.0	"Chloroflexi"	0.4	
	0.7	"Acidobacteria" *	11.1	
	42.0	Firmicutes *	0.4	
	15.9	"Proteobacteria" *	33.7	
	41.3	unclassified Bacteria	52.0	

(* = significantly different at 0.01)

Figura 12. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1S (viveiro 1 período seca) e V4S (Viveiro 4 período seca).

Segundo os resultados obtidos percebe-se que como filos significativamente diferentes tem-se Acidobacteria e Proteobacteria, presentes com maior frequência em V4S; e Firmicutes encontrado em maior frequência em V4C.

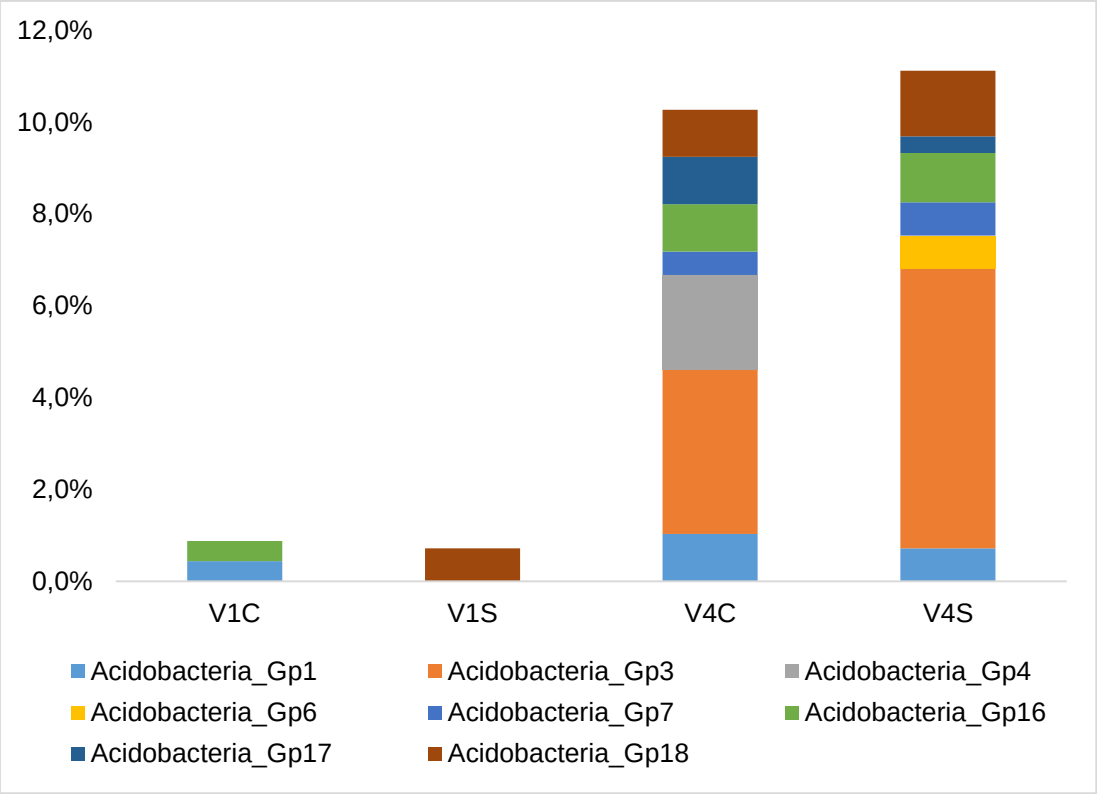
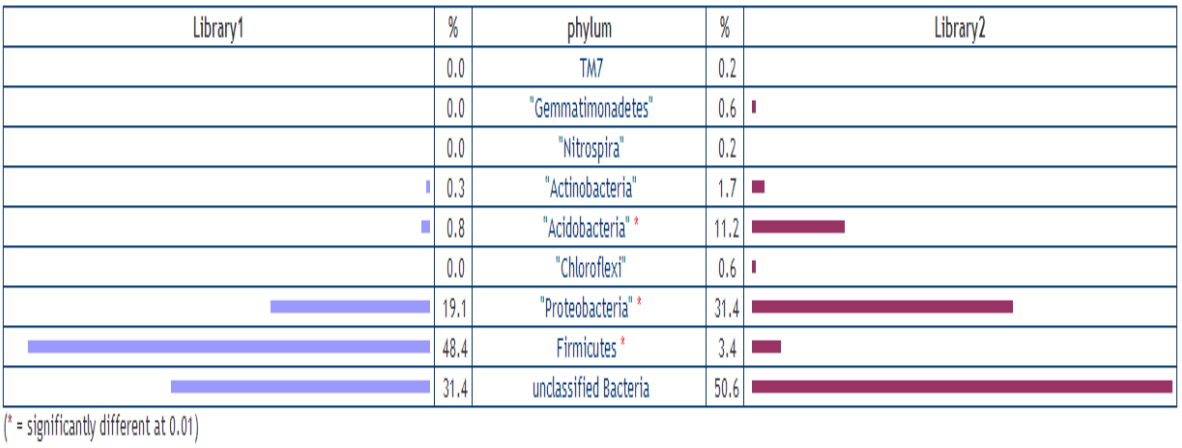


Figura 13. Distribuição das classes de acidobacterias nos viveiros estudados, nos períodos distintos, seca (S) e chuva (C).

A Figura14 demonstra os resultados obtidos na comparação geral dos filos presentes nos sedimento, dos dois viveiros analisados.



Library1	%	phylum	%	Library2
	0.0	TM7	0.2	
	0.0	"Gemmatimonadetes"	0.6	
	0.0	"Nitrospira"	0.2	
	0.3	"Actinobacteria"	1.7	
	0.8	"Acidobacteria" *	11.2	
	0.0	"Chloroflexi"	0.6	
	19.1	"Proteobacteria" *	31.4	
	48.4	Firmicutes *	3.4	
	31.4	unclassified Bacteria	50.6	

(* = significantly different at 0.01)

Figura 14. Comparação dos filos bacterianos das bibliotecas das amostras de DNA de V1 (Library 1) e V4 (Library 2).

De acordo com o obtido relacionando apenas os filos obtidos de cada viveiro, sem levar em consideração o período sazonal, percebe-se que como filos significativamente diferentes tem-se Acidobacteria e Proteobacteria, presentes com maior frequência no viveiro considerado eutrófico; e Firmicutes encontrado em maior frequência no viveiro considerado oligotrófico.

As variações observadas na frequência dos grupos bacterianos ao longo do ano devem-se aos fatores abióticos do solo como temperatura e umidade (BOSSIO et. al., 1998). As alterações climáticas interferem na composição da comunidade bacteriana em determinadas épocas (VAL-MORAES, 2008). Abundância de grupos de microrganismos de solo pode estar diretamente relacionada ao estado nutricional deste (SMIT *et al.*, 2009).

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 sequencias (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004) das quatro bibliotecas analisadas. Com o resultado também foi possível a construção da curva de rarefação (Figura 13). 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). Esse software permitiu também o cálculo dos índices de riqueza e diversidade nos ambientes.

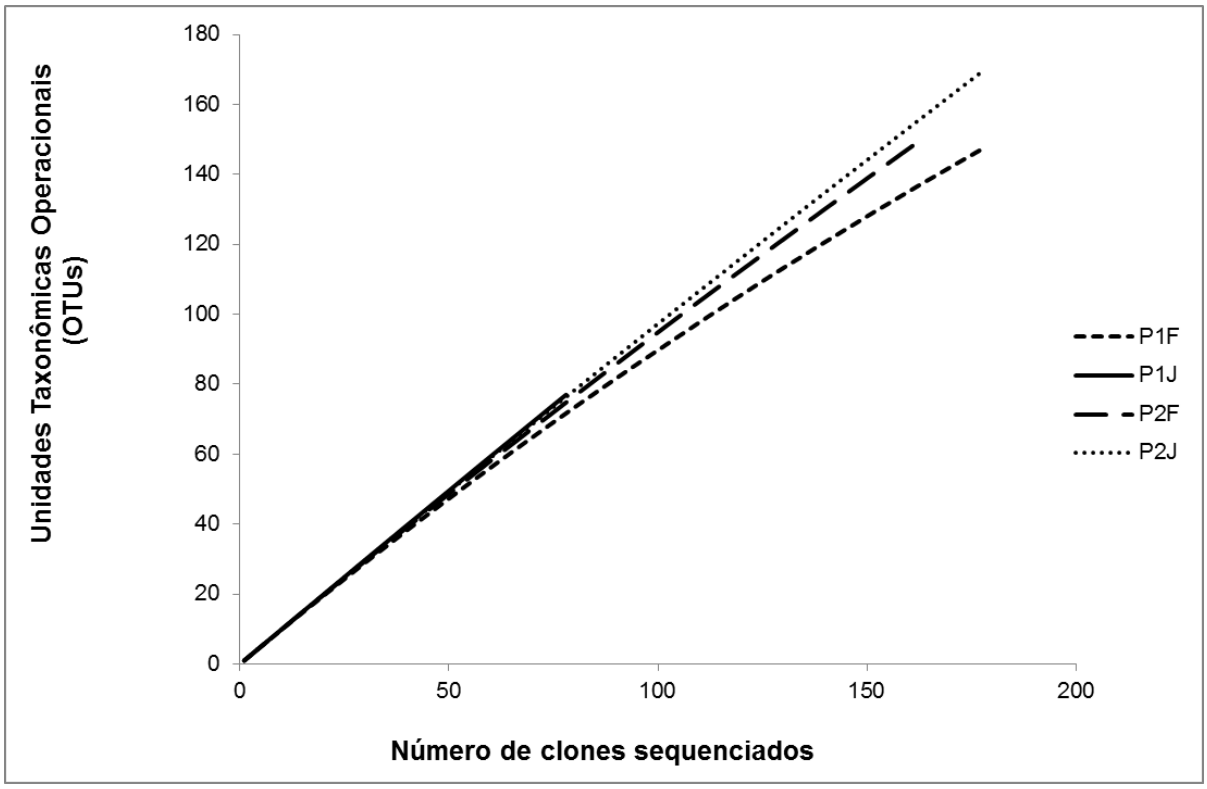


Figura 15. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das sequências de 16S rDNA das bibliotecas de sedimento de piscicultura (V1C: viveiro 1 período de chuvas; V1S: viveiro 1 período de seca; V4C: viveiro 4 p períodos de chuvas; V4S: viveiro 4 período de seca).

Como demonstrado pelo gráfico, o ambiente analisado nos dois viveiros nos dois períodos climáticos possui grande diversidade de microrganismos, já que os gráficos não chegaram a atingir o início do platô. Schloss e Handelsman (2004) relatam que o programa DOTUR é sensível ao número de sequencias 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.

Quando comparado esses resultados com os obtidos no trabalho de Meneghine (2013), que realizou a análise da água destes mesmos viveiros nas mesmas épocas de coleta, percebe-se um resultado similar, diferenciando apenas no que diz respeito

ao viveiro 4, que demonstrou um iniciou da curva, devido à elevada dominância de uma espécie.

A Tabela 2 abaixo demonstra 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 V1C (viveiro 1 no período chuvoso), P1S (viveiro 1 período seca), V4C (Viveiro 4 período de chuvas) e V4S (Viveiro 4 período de seca) gerados pelo programa DOTUR.

Amostras	**OTU**	**ÍNDICES DE RIQUEZA**		**ÍNDICES DE DIVERSIDADE**	
		ACE	**CHAO1**	**SHANNON**	**SIMPSON**
V1C	153	464,1	435,4	5,0	0,00221
V1S	77	3003,0	1502,0	4,3	0,00033
V4C	150	1167,4	1109,1	5,0	0,00114
V4S	179	2218,1	1995,9	5,2	0,00057

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, V1S, V4C e V4S são bastante ricos, exceto V1C na comparação dos valores demonstrados. Com relação aos resultados obtidos pela análise da água por Meneghine (2013), percebeu-se que o ambiente menos rico é o viveiro 4, na época de seca.

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, sem muita distinção entre si. Diferentemente do visto na água, nas mesmas épocas analisadas, onde os valores dos índices mostraram que no viveiro 4 na época de seca houve forte dominância e

baixa diversidade, fato esse comprovado pelo aparecimento de mais de 80% de Cianobacterias no ambiente (MENEGHINE, 2013).

5. CONCLUSÃO

Os filos encontrados através do emprego do sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* no viveiro de abastecimento (V1), permaneceram praticamente inalterados independente da época da coleta, apresentando um equilíbrio em relação à microbiota.

As amostras de sedimento do quarto viveiro (V4) apresentaram diferença significativa para o filo Firmicutes entre as épocas, sendo que a maioria das sequencias pertenciam ao filo Proteobacteria.

A comparação entre os viveiros V1 e V4 apresenta diferença significativa para os filos Acidobacteria e Proteobacteria, presentes em maior proporção em V4.

A análise dos organismos encontrados pela metodologia aplicada no sedimento dos dois viveiros de piscicultura revelou que as composição das comunidades bacterianas estão relacionadas com a concentração de nutrientes de cada viveiro bem como as alterações climáticas.

6. REFERÊNCIAS

ALTMANN, D., P. STIEF, R. AMANN, D. De Beer, SCHRAMM, A. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment. **Environ. Microbiol**, v.5 p.798–803, 2003.

ANDERSEN, J. M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. ***Water Research*, London**, v. 10, n. 4, p. 329-331, 1976.

ASAMI, H., AIDA, M., WATANNABE, K. Accelerated sulfur cycle in coastal marine sediment beneath areas of intensive shellfish aquaculture. **Appl. Environ. Microbiol**. v.71, p.2925–2933, 2005.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life, In: ATLHAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed). **Microbial ecology**: fundamentals and applications. 4 th. ed. Membro Park: Books News, 1997. P. 37-39.

AVNIMELECH, Y., RITVO, G. Shrimp and Fish Pond Soils: Processes and Management. **Aquaculture**, v.220, n.1-4, p.549-567, 2003.

BARNS, S.M.; CAIN, E.C.; SOMMERVILLE, L.; KUSKE, C.R. (2007). Acidobacteria phylum sequences in uranium- contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Applied Environmental Microbiology** v. 73, p. 3113 – 3116.

BOLLMANN, A.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. (2007). Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. **Applied Environmental Microbiology** 73:6386–6390.

BOYD, C.E. Bottom soils, sediment, and pond aquaculture. Chapman & Hall. New York: 1995. p348.

BOYD, C.E. Water Quality Management for Pond Fish Culture.Development in Aquaculture and Fisheries Science 9, Elsevier Scientific Publishing Company. New York., 1982, p.317.

BOYD, C.E., & QUEIROZ, J.Feasibility of structures settling basins, and Best management pratices in effluent regulation for Alabama channel catfish farming. ***Rewiews in Fisheries Science***, v 9:p. 43-67, 2001.

BOYD, C.E.; ZIMMERMANN, S. Grow-out system – water quality and soil management. In**: *Freshwater Prawns: Biology and Farming*** (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D'Abramo L.R. &. Kutty M.N.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2010, p. 239-255.

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

CHEN, G.; DALTON, C.; TAYLOR, D. Cladocera as indicators of trophic state in Irish lakes. **Journal of Paleolimnology**, v. 44, p. 465-481, 2010.

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.

DANOVARO, R. & FABIANO, M. Seasonal and inter-annual variation of bacteria in a seagrass bed of the Mediterranean Sea: relationship with labile organic compounds and other environmental factors. **Aquatic Microbial Ecology**, v.9,p.17-26, 1995.

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

ESTEVES F.A. & PANOSSO R. 2011. Fósforo. In: *Fundamentos de limnologia.* (Esteves F.A. -coordenador) 3ª. ed. Rio de Janeiro, Interciência, 826p.
ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**, 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência/ FINEP, 829p, 2011.

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

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, 1998.

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

GAVA, C. A. T; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de Ralstonia solanacearum em tomateiro**. Pesquisa agropecuária brasileira.** Vol.37 no.10 Brasília Oct. 2002. Site acessado em fevereiro de 2013. http://www.scielo.br/scielo.

GHAI, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F, MCMAHON, K.D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; OLIVEIRA, T.C.S.; GARCIA, J.W.; MIRANDA, F.P.; HENRIQUE-SILVA, F. Metagenomics of the water coulumn in the prestine upper course oh the Amazon river**. PLOS One**. 6(8): e23785.2011.

GILBERT, G.A; DUPONT, C.L. Microbial metagenomics: beyond the genome. ***Annual Review of Marine Science***, v 3, p.347-371, 2011.

HAHN, M.W.; LUNSDORF, H.; WU, Q.; SCHAUER, M.;HOFLE, M.G.; BOENIGK, J.; STADLER, P. Isolation of Novel Ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. **Applied Environmental Microbiology.** Mondsee, v. 69, n.3, p. 31442 – 1451, 2003.

HANDELSMAN, J. Metagenomics.Application of genomics to uncultural microorganisms. **Microbiology ande Molecular Biology Reviews**, v.68, p.669 685, 2004.

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

HENTSCHEL, U. et al. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.09, p. 4431-4440, 2002.

HOLMER, M., KRISTENSEN, E., 1996. Seasonality of sulfate reduction and pore water solutes in a marine fish farm sediment: the importance of temperature and sedimentary organic matter. **Biogeochemistry** 32, 13–39.Infofish International, 1(9): 30-34.

HONGCHEN JIANG, CHRISTINA Z. DONG, QIUYUAN HUANG, GENHOU WANG, BIN FANG, CHUANLUN ZHANG, HAILIANG DONG. Actinobacterial Diversity in Microbial Mats of Five Hot Springs in Central and Central-Eastern Tibet, China. **Geomicrobiology Journal** .Vol. 29, Iss. 6, 2012.

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

JONES, R.; ROBESON, N.; LAUBER, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. A comprehesive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. **The ISME Journal**, New York, v.3, p.442-453, 2009.

KAUR, V. I.; ANSAL, M. D. Efficacy of vermicompost as fish pond manure – Effect on water quality and growth of *Cyprinus carpio* (Linn.). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6215-6218, 2010.

KIRCHMAN D.L. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments**.** **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v.39, p. 91–100, 2001.

KUBITZA, F., 1998, Qualidade da água na produção de peixes. Panorama da Aqüicultura, 8 (46) p. 35-41.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.09, p. 3614-3621, 1997.
LANDA, G. G.; BARBOSA, F. A. R.; RIETZLER, A. C.; MAIA-BARBOSA, P. M. Thermocyplops decipiens (Kiefer, 1929) (Copepoda, Cyclopoida) as indicator of water quality in the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 4, p. 695-705, 2007.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical Ecology.Amsterdam: Elsevier Science B.V., p.853, 1998.
LIU, W.T. & STHAL, D.A. Molecular Approaches for the Measurement of Density,

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Lettles**, Amsterdan, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

MACGREGOR, B. J., D. P. MOSER, B. J. BAKER, E. W. ALM, M. MAURER, K. H. NEALSON, D. A. Stahl.. Seasonal and spatial variability in Lake Michigan sediment small-subunit rRNA concentrations. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 67, p.3908–3922, 2001.

MCCAIG, A.E., PHILLIPS, C.J., STEPHEN, J.R., KOWALCHUK, G.A., HARVEY, S.M., HERBERT, R.A., EMBLEY, T.M., PROSSER, J.I. Nitrogen cycling and community structure of Proteobacterial beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. **Appl. Environ. Microbiol**. v.65, p.213–220, 1999.

MENEGHINE, A, K. **Diversidade bacteriana em piscicultura neotropical**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

MORIARTY, D. J. W.The role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.151, p.333-349, 1997.

MUNSON, M.A.; BANERJEE, A.; WATSON,T.F.;WADE, W.G.Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. **Journal of Clinical Microbiology.** 42 (7): 3023-9. 2004.

NAYAK, D. K.; SAVAN, R. Bacteria as a supplementary feed in aquaculture. **Infofish International**, Malaysia, v. 1, n. 9, p. 30-34, 1999.

NEALSON,K.H.1997.Sediment bacteria : who´s there ,what are they doing, and what´s new? ***Annu.Rev. Earth Planet.Sci***.v.25, p.403-434.

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.

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.

NUSSELEIN, K.; TIEDJE , J.M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**. Washigton, v.65, n.8, p. 3622-26, 1999.

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

ONO, E.A., KUBITZA , F. Cultivo de peixes em tanques-rede. USP/ESALQ, Jundiaí, 2003, 112p.

OSMAN, A. G. M.; KLOAS, W. Water Quality and Heavy Metal Monitoring in Water, Sediments, and Tis- sues of African Catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) from the River Nile, Egypt. ***Journal of Environ- mental Protection*.** v.1, n.4, p.389-400, 2010.

OTAWA, K., ASANO, R., OHBA, Y., SASAKI, T., KAWAMURA, E., KOYAMA, F., NAKAMURA, S. AND NAKAI, Y. (2006), Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. **Environmental Microbiology**, 8: 1985–1996. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01078.x.

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.

PETIT C.A.; POLAGE C.R.; SCHRECKENBERGER P. The role of 16 S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(12) 6123-6125, 2005.

PILLAY, T.R.V. Aquaculture and the Environment. **Fishing News Books**. p.189, 1992.

RAHMAN, M. M.; GONG, Q. Jo, Y. G.; MILLER, S. A., HOSSAIN, M. Y. A Comparative Study of Common Carp (*Cy-prinus carpio* L.) and Calbasu (*Labeo calbasu* Hamilton) on Bottom Soil Re-Suspension, Water Quality, Nutrient Accumulations, Food Intake and Growth of Fish in Simu-lated Rohu (*Labeo rohita* Hamilton) Ponds. ***Aquaculture*,** v.285, n. 1-4, pp. 78-83, 2008.

RAIJ, B. V. et al. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas Instituto Agronômico, p. 285, 2001.

RAJENDRAN, N., MATSUDA, O., RAJENDRAN, R., URUSHIGAWA, Y. Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays. Mar. Pollut. Bull, 1997. 34, 26–34.

REX, M.A.; ETTER, R.J.; MORRIS, J.S.; CROUSE, J.; MCCLAIN, C.R.; JOHNSON, N.A.; STUART, C.T.; DEMING, J.W.; THIES, R. & AVERY, R. 2006. Globalbathymetric patterns of standing stock and body size in the deep-sea benthos. *Marine* **Ecology Progress Series**, 317: 1-8.

RIBEIRO, R.P. et al. Coleta de amostras de sedimentos em viveiros de piscicultura. ***Acta Scientiarum. Animal Sciences***, v. 27, n. 3, p. 399-403. 2005.

ROESCH, L.F.W., PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O.; Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho.. **R. Bras. Ci. Solo**, 31:1367-1380, 2007.

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.

SHERR E.; SHERR B. (1988) Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept.

SHISHEHCHIAN F., YUSOFF F.M., OMAR, H., KAMARUDIN M.S. Nitrogenous excretion of Penaeus monodon postlarvae fed with different diets. **Marine Pollution Bulletin***,* Oxford, 39, 224-227, 1999.

SILVA, L.M. ET AL. Impactos ocasionados pela atividade da carcinicultura Marinha no ecossistema manguezal no Brasil. In: XXIX Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 29,2006, Porto Rico. **Anais**. p.1-7.

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. **Uso racional da água: Limnologia e Plâncton.** 2005 217f. Tese (Livre-Docência em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., 2000. Utilização de biofiltros em sistemas de cultivo de peixes. Informe Agropecuário 21, 238-243.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ALVAREZ, E. J. S.; BRAGA, F. M. S. Water quality and zooplankton in tanks with larvae of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1949). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 77-86, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BARROS, A. F.; BRAGA, F. M. S. Effect of floating macrophyte cover on the water quality in fishpond. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 101-106, 2003.

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**, v. 71, n. 4, p. 845-855, 2011.

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**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. São Paulo: Funep, 1994.

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.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; MILLAN, R.N.; AMARAL, A.A. Influence of Management on the Water Quality and Sediment in Tropical Fish Farm. ***Journal of Water Resource and Protection*****,** v.5, n. 495-501, 2013.

SOLOMONS W, BRILS J. 2004. Contaminated Sediments in European River Basins. Europea Sediment Research Network - **SedNet** - www.SedNet.org, 47p.

SPRING, S., R. SCHLZE, J. OVERMANN, SCHLEIFER K. H. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. **FEMS Microbiol. Rev**, v.24, p.573–590, 2000.

TALBOT, C.; HOLE, R. Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. **Journal Applied Ichthyology**, v. 10, p. 258-270, 1994.

TAMAMES, J., GIL, R., LATORRE, A., PERETO´, J.,SILVA, F. J. & MOYA, A. (2010). The frontier between cell and organelle: genome analysis ofCandidatus Carsonella ruddii**. BMC Evol Biol** 7, 181.

TAMMINEN M, KARKMAN A, CORANDER J, PAULIN L, VIRTA M.Differences in bacterial community composition in Baltic Sea sediment in response to fish farming. **Aquaculture**, v.313, p. 15-23, 2011.

THOMAS, S.H.; WAGNER, R.D.; ARAKAKI, A. K.; SKOLNICK J, KIRBY, J.R, et al. (2008) The Mosaic Genome of Anaeromyxobacter dehalogenans Strain 2CP-C Suggests an Aerobic Common Ancestor to the Delta-Proteobacteria. **PLoS ONE** 3(5): e2103. doi: 10.1371/journal.pone.0002103.

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.

TOLEDO, J. J.; CASTRO, J. G. D. Parâmetros físico-químicos da água em viveiros da Estação de Piscicultura de Alta Floresta - Mato Grosso. ***Revista de Biologia e Ciências da Terra, Belo Horizonte***, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2001.

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.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B, COUTINHO P.M.; WU M et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Appl Environ Microbiol** 75: 2046–2056.

WETZEL, R. G. Limnology. W. B. Saunders Co. Philadelphia, 1975, p 215.

WISE, M. G., J. V. MCARTHUR, SHIMKETS, L.J. Bacterial diversity of a Carolina Bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. **Appl. Environ. Microbiol**. v.63 p.1505–1514, 1997.

WOESE, C. R.; Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271, 1987.

WU, X., W. Y. XI, W. J. YE, AND H. YANG. 2007. Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology** v.61. p.85–96.

YOO, K. H.; MASSER, M. P.; HAWCROFT, B. A. An in-pond raceway system incorporating removal of fish wastes. **Aquacultural Engineering**, v. 14, p. 175-187, 1995.

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.

ZOBELL, C.E. & MORITA, R.Y. 1959. Deep-sea bacteria. ***Galathea Report***, 1: 139-154.

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.