Felipe Rezende de Lima

**Caracterização da comunidade bacteriana
da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de
cultivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

Felipe Rezende de Lima

**Caracterização da comunidade bacteriana
da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de
cultivo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão Original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Lima, Felipe Rezende de.

Caracterização da comunidade bacteriana da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de cultivo / Felipe Rezende de Lima. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Ecologia microbiana.

Versão do título para o inglês: Characterization of bacterial community from Tietê River Basin by cultivation independent methods.

1. Biologia 2. Ecologia 3. Ecologia Microbiana I. Araújo, Prof. Dr. Welington Luiz de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB069/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Rezende de Lima.

Título da Dissertação: Caracterização da comunidade bacteriana da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de cultivo.

Orientador(a): Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : 11 - 3091.7733 - telefax : 11 3091.8408
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de Fevereiro de 2014.

Ilmo. Srs.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP SH

Ref.: Solicitação de Certificado de Isenção

Prezados Professores,

Vimos por meio deste solicitar **Certificado de Isenção das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICB/USP) e Comissão de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos (CEPSH-ICB/USP)**, visto que o projeto de pesquisa intitulado "Caracterização de comunidades microbianas da bacia do Rio Tietê por método independente de cultivo" sob a responsabilidade do aluno "Felipe Rezende de Lima" e orientação do Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo do Departamento de Microbiologia, não fará coleta nem uso de amostras biológicas e/ou células primárias provenientes de seres humanos bem como não utilizará seres humanos como veículo ou hospedeiro para coleta e manutenção de insetos ou organismos invertebrados.

Declaro ainda que os animais utilizados no referido projeto não estão sob a égide da Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Por fim, informo que o projeto (X) não utilizará células imortalizadas/() utilizará células imortalizadas (caso afirmativo, preencha os dados abaixo).

Linhagem celular _____ () / _____ () / _____ () / _____ () .

Origem:

(A) animal

(H) humana

Atenciosamente,

Aluno:

Felipe R. L.

Orientador:

[Assinatura]

Obs: Encaminhando o detalhamento do procedimento experimental que será utilizado.

CEP - ICB/USP

RECEBIDO: 13/2/14

Ass: *[Assinatura]*

DEDICO

À minha família, em especial à minha mãe...

Pelo amor, carinho e altruísmo incondicionais para comigo.

OFEREÇO

*Aqueles que de alguma forma
contribuíram para minha formação
pessoal e científica ...*

OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosa Maria e Laércio Rezende, por contribuírem para minha formação biológica, como cidadão e profissional.

À minha irmã Kely Lima e meus sobrinhos amados; Mateus, Gabriel e Carol, por me motivarem a seguir em frente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo, pelas oportunidades a mim oferecidas, pelas longas caronas com boas conversas e pelos conselhos.

Às amigas Eliane Gonçalves e Lina Rada, por toda paciência, pelos ombros encharcados, pelas conversas de apoio e também pelas hospedagens.

Às amigas Emy Mano, Priscila Romano e Ana Marie pelas longas conversas e por todo carinho a mim oferecido.

À Mabel Ortiz, Raíssa Mesquita e Aline Neves, pelo companheirismo, pelos vários conselhos e por toda força incentivadora.

À Lilandra Rios e Ricardo Olchanheski pela amizade e auxílio durante os experimentos.

À Luciana Francisco, por me ensinar os primórdios da Microbiologia Clássica.

Ao colega Almir Ferreira, por me ensinar os primeiros passos em Biologia Molecular, por toda ajuda computacional e paciência, além de inspiração e incentivo desde a IC.

À Vanessa Feitosa pela amizade, pelas conversas sempre boas e incentivo constante.

À Universidade de São Paulo, programa de Mobilização Santander e principalmente à Professora Dra Joana Falcão Sales, por me proporcionarem tamanha experiência durante o intercâmbio na *University of Groningen – The Netherlands*.

À Mylenne Pinheiro por me ensinar a sobreviver na Holanda e me fazer rir o tempo todo.

Aos amigos Eric Prado e Moara Bertotti por toda loucura e descontração.

Às amigas Paula Orlando, Erica Caroline, Roseli Oliveira e Natali Gomes, pela distração necessária aos limites do enlouquecimento.

A toda a equipe da CETESB pelas coletas e análises físico-químicas.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho ou que de alguma forma, profissional ou pessoal, me impulsionaram a chegar até aqui...

Muito Obrigado!

*É pouco provável, mas, talvez eu me esqueça daqueles...
que estiveram comigo em momentos de glória e alegria...
mas é certo que, jamais esquecerei daqueles...
que me apoiaram e auxiliaram em tempos difíceis.*

Felipe Rezende

*Tenho pensamentos que,
se pudesse revelá-los e fazê-los viver,
acrescentariam nova luminosidade às estrelas,
nova beleza ao mundo e maior amor ao coração dos homens.*

Fernando Pessoa

RESUMO

LIMA, F. R. **Caracterização da comunidade bacteriana da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de cultivo**, 2015. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A manutenção dos ecossistemas é dependente da interação dos diversos organismos presentes, dentre os quais estão as comunidades microbianas. Neste contexto, o Brasil é tido como um dos países com a maior biodiversidade, contudo, existem ainda poucos estudos sobre a diversidade microbiana em ambientes aquáticos e menos ainda sobre a diversidade microbiana presente no Rio Tietê. Apesar dos avanços da metagenômica utilizando a clonagem combinada à técnica de sequenciamento, ainda existe uma grande lacuna no conhecimento a respeito da diversidade de micro-organismos presentes no ambiente. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e sequenciamento em larga escala a diversidade (NGS – MiSeq Illumina)) a estrutura e composição da comunidade bacteriana presente no corpo e nos afluentes do Rio Tietê, da nascente à foz, e correlacioná-las às variáveis ambientais. Para tanto, a diversidade bacteriana foi avaliada em 28 (T-RFLP) ou 14 (NGS) pontos do Rio Tietê e afluentes entre Agosto e Novembro de 2013, representando a temporada de estiagem (primeira coleta), e Fevereiro à Abril de 2014, representando a temporada de cheias (segunda coleta). Foram obtidos 385 e 217 fragmentos terminais de restrição (TRFs – *Terminal Restriction Fragments*) para a primeira e segunda coleta, respectivamente. As análises de Redundância (RDA) demonstraram o agrupamento das amostras de acordo com o período de coleta, seguida da qualidade da água e posteriormente da origem geográfica. Foi observada uma maior riqueza e diversidade na temporada de 2013 em relação à 2014. Nesta temporada de 2013, foi observada correlação inversa de dominância, riqueza e diversidade entre pontos com qualidade de água superior (Ótima, Boa e Regular) e inferior (Ruim e Péssima) entre as temporadas avaliadas, ou seja, pontos com melhor qualidade de água apresentaram maior dominância, menor riqueza e diversidade com relação aos pontos com menor qualidade inferior. Entretanto, para a temporada 2014 foi observada uma correlação inversa, visto que as maiores dominância e menores riqueza e diversidade foram observadas em pontos com menor qualidade de água. Por meio do sequenciamento em larga escala (NGS - MiSeq Illumina) foram obtidas 2.130.122 de sequências de boa qualidade. Com base nesta análise, foi observada que a comunidade bacteriana do Rio Tietê é composta principalmente por bactérias pertencentes às ordens Campylobacterales, Burkholderiales e Flavobacteriales. A temperatura foi a principal variável ambiental agindo sobre a riqueza das comunidades avaliadas, sendo 25 a 27°C a condição onde foram observados os maiores valores de riqueza. A localização geográfica dos rios e suas conexões representaram fatores importantes para a distribuição dos gêneros observados e embora não se tenha observado separação completa entre as temporadas nos agrupamentos apresentados pela PCoA, foram observadas diferenças na estruturação das comunidades, de acordo com a avaliação da abundância relativa dos gêneros para os pontos amostrados em ambos os anos.

Palavras-chave: Ecologia Microbiana. Diversidade bacteriana. Microbiota Aquática. Rio Tietê.

ABSTRACT

LIMA, F. R. **Characterization of bacterial community from Tietê River Basin by cultivation independent methods**, 2015. 85 p. Master Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The ecosystems maintenance is dependent of the interaction among many factors and organisms, including the microbial communities. In this context, Brazil is considered one of the countries with the highest biodiversity; however, there are few studies on microbial diversity in aquatic environments and less about the microbial diversity present in Tietê River. Despite the advances in metagenomics, using cloning technique combined with sequencing, there is still lacking in knowledge about the diversity of microorganisms in the environment. Thereby, the aim of present work was to evaluate the diversity and structure of bacterial community present in Tietê river and its tributaries, from the source to the mouth, by a fingerprint approach and high-throughput sequencing method. For that, two independent techniques were used and all the 28 points along Tietê River Basin were evaluated by T-RFLP. After that, 14 points were chosen based on the results from fingerprint and the rRNA 16S gene was partially sequenced by MiSeq Illumina. The samples were collected between August to November from 2013, representing the dry season, and February to April from 2014 representing the rainy season. Based on T-RFLP analysis, 385 and 217 TRFs (Terminal Restriction Fragments) were observed for season 2013 and 2014, respectively. The Redundancy Analysis (RDA) grouped the samples according to seasons followed by water quality and group separation. The richness and diversity index were higher in 2013 than in 2014 season. Furthermore, inverse correlation was observed for dominance, richness, diversity index and water quality, since in 2013, points with better water quality had higher dominance and lower richness and diversity. In another had, in 2014, higher dominance and lower richness and diversity were observed in lower water quality. The MiSeq Illumina technique generated 2.130.122 sequences from XXX samples (X points). These sequences were used to identify the microbial community in Tietê River and tributaries. Based on this analysis, it was observed that the dominant bacterial groups in Tietê River is composed by Campylobacterales, Burkholderiales e Flavobacteriales. The temperature represented the main environmental variable acting on the richness of evaluated communities, while the greater richness index was observed between 25 to 27 °C. In addition, the geographic location and their connections were important factors the distribution of the bacterial genera. Although some groups were observed, the bacterial community was not completely grouped based on the season, suggesting that the season was a secondary factor in the structuration of the bacterial community.

Keywords: Microbial Ecology. Bacterial diversity. Aquatic microbiota. Tietê River.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das UGRHIs do Estado de São Paulo	15
Figura 2 – Bacias e Regiões Hidrográficas do estado de São Paulo.....	16
Figura 3 – Pontos de amostragem ao longo da Bacia do rio Tietê	23
Figura 4 – Variação dos parâmetros físico-químicos ao longo das amostras coletadas em 2013.....	29
Figura 5 – Variação dos parâmetros físico-químicos ao longo das amostras coletadas em 2014.....	30
Figura 6 – Caracterização físico-química dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais.....	31
Figura 7 – Regiões Metropolitanas do Estado de São Paulo	32
Figura 8 – Frequência dos TRFs obtidos entre as temporadas amostradas	33
Figura 9 – Diagrama de Venn representando os TRFs core	34
Figura 10 – Diagrama de Venn representando TRFs compartilhados por qualidade de água...35	
Figura 11 – Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos.....	36
Figura 12 – Índices e estimadores entre as temporadas amostradas	38
Figura 13 – Índices e estimadores obtidos para a temporada 2013	39
Figura 14 – Índices e estimadores obtidos para a temporada 2014	40
Figura 15 – Curvas de rarefação construídas com o auxílio do programa QIIME, indicando o efeito do esforço no seqüenciamento	43
Figura 16 – Estimativas de riqueza por Chao-1 entre os pontos avaliados	44
Figura 17 – Estimativas de riquezas correlacionadas aos parâmetros físicos e químicos da água..	45
Figura 18 – Análise de Coordenadas Principais realizada com a matriz de seqüenciamento em larga escala	47
Figura 19 – Abundância relativa dos Filos bacterianos	48
Figura 20 – Abundância relativa das Ordens bacterianas observadas	51
Figura 21 – Abundancia relativa dos Gêneros bacterianos e distribuição dos pontos em 2013.....	52
Figura 22 – Abundância relativa dos Gêneros bacterianos e distribuição dos pontos em 2014.....	54
Figura 23 – Gêneros raros observados em pontos limpos	55

Figura 24 – Gêneros raros observados apenas em pontos sujos	56
--	----

Figuras em anexo

Figura B1 – Análise de Redundância representando as matrizes de T-RFLP e as variáveis ambientais para ambas as temporadas	82
Figura B2 – Classes pertencentes ao Filo Proteobacteria	83
Figura B3 – Classes pertencentes ao Filo Bacteroidetes	83
Figura B4 – Classes pertencentes ao Filo Actinobacteria.....	84
Figura B5 – Classes pertencentes ao Filo Firmicutes	84
Figura B6 – Abundância relativa das Famílias observadas	85
Figura B7 – Representação dos Gêneros mais abundantes entre as temporadas	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ponderações das categorias de IQA.....	25
Tabela 2 – Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os agrupamentos e as temporadas amostradas	37
Tabela 3- Pontos avaliados por Illumina e número de sequências após filtragem	42
Tabela 4- Índices de diversidade	46

Tabelas em anexo

Tabela A1- Pontos de amostragem e suas localizações geográficas	76
Tabela A2- Caracterização físico-química dos pontos avaliados	77
Tabela A3- Efeitos marginais das variáveis ambientais para 2013	80
Tabela A4- Efeitos marginais das variáveis ambientais para 2014	80
Tabela A5- Índices de diversidade e estimadores de riqueza estimados por T-RFLP	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOSIM	ANalysis Of SIMilarities
BMP	Brazilian Microbiome Project
C.O.T.	Carbono Orgânico Total
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	COnselho NAcional do Meio Ambiente
D.B.O.	Demanda Bioquima de Oxigênio
DCA	De-trended Correspondence Analysis
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQA	Índice de Qualidade da Água
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NGS	Next-generation Sequencing
O.D.	Oxigênio Dissolvido
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
p. ex.	Por Exemplo
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
RCC	River Continuum Concept
RDA	Redundancy Analysis
RDP	Ribosomal Database Project
RM	Região Metropolitana
T-RFLP	Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism
TRFs	Terminal Restriction Fragments
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UTO	Unidade Taxonômica Operacional

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Os micro-organismos e o ambiente aquático	18
2.2 Avaliação de comunidades por métodos independentes de cultivo	19
2.2.1 <i>Fingerprint por T-RFLP</i>	19
2.2.2 <i>Sequenciamento em larga escala por MiSeq Illumina</i>	20
3 OBJETIVOS	22
4 MÉTODOS	23
4.1 Pontos de coletas	23
4.2 Parâmetros físico-químicos de qualidade das águas	24
4.3 Extração de DNA da microbiota aquática	25
4.4 Amplificação do gene 16S rRNA	25
4.5 Análise de T-RFLP	26
4.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA por MiSeq Illumina	26
4.6.1 <i>Análise das sequências obtidas</i>	27
4.6.1.1 <u>Seleção de sequências de acordo com a qualidade</u>	27
4.6.1.2 <u>Preparo das sequências para a criação da matriz de UTO's</u>	27
4.6.1.3 <u>Cluster, Alinhamento e Classificação</u>	28
4.6.1.4 <u>Estimativas de riqueza e diversidade</u>	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1 Caracterização físico-química da água	29
5.2 Avaliação da Comunidade Bacteriana por T-RFLP	33
5.3 Caracterização da Comunidade Bacteriana por MiSeq Illumina	42
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	
A - TABELAS EM ANEXO	76
B - FIGURAS EM ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da dimensão da diversidade bacteriana em ambientes complexos como o solo, água, rizosfera, interior (endófitos) e superfícies (epífitas) de plantas, junto com as técnicas que utilizam a recuperação de DNA e RNA bacterianos diretamente do ambiente tem aumentado o interesse no estudo de comunidades microbianas de ambientes pouco avaliados. Essas técnicas podem ter várias aplicações, entre elas a identificação de novas espécies bacterianas, descoberta de agentes para biorremediação, determinação da qualidade do solo por meio de populações indicadoras e o estudo de impactos sobre comunidades bacterianas, como por exemplo, os diferentes tipos de manejo e a presença de poluentes.

O Rio Tietê nasce na Serra do Mar e embora próximo ao Oceano Atlântico, flui para o interior do estado de São Paulo percorrendo 1.150 km até desaguar no rio Paraná. A sua nascente se localiza em área preservada de Mata Atlântica no município de Salesópolis, SP e em seu trajeto original cruzava florestas latifoliadas tropicais semidecíduas, matas ciliares e várzeas, além de trechos de cerrados e cerradões. Com o tempo, essas áreas naturais foram sendo reduzidas, em decorrência da crescente ocupação do solo e da destruição e substituição das formações vegetais primitivas por pastagens e culturas. O rio atual apresenta um gradiente de contaminação e as atividades do entorno tem grande influência sobre a qualidade das águas ao longo da bacia, sendo a parte mais degradada decorrente do adensamento populacional devido ao desenvolvimento econômico e industrial (Figura 1). Com exceção da Nascente, pontos com qualidade de água inferior encontram-se concentrados em UGRHIs de caráter Industrial enquanto pontos com qualidade ótima concentram-se na parte final do rio, pertencente à UGRHIs de caráter Agropecuário.

Figura 1 – Classificação das UGRHIs do Estado de São Paulo.

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP .

O estado de São Paulo é dividido em 7 Regiões ou Bacias Hidrográficas, as quais são subdivididas em Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs), facilitando assim, o manejo e a administração. A figura 2 apresenta as Bacias e Regiões Hidrográficas do estado de São Paulo, diferenciadas por cores, em escala de tons estão representas as Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) e tons em vermelho/rosa representam a Bacia Hidrográfica do Rio Tietê (Figura 2), com suas 6 UGRHIs, abrangendo todo o percurso do rio, da sua nascente até a foz.

Figura 2 – Bacias e Regiões Hidrográficas do estado de São Paulo.

Fonte: Secretaria Estadual de Saneamento e Recursos Hídricos (JMR-ENGEPCORPS, 2011).

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a diversidade microbiana de solos e em associação com plantas de importância agrícola e/ou ambiental. Contudo, tem sido observado que, sistematicamente, ambientes aquáticos dulcícolas (água e sedimento) têm sido

negligenciados no Brasil, resultando na ausência de conhecimento deste ambiente, bem como possibilidade de exploração da diversidade de bactérias e fungos. Aliado a esta pouca atenção, corpos d'água doce têm recebido grande quantidade de detritos provenientes de atividades humanas, levando a alterações nas condições físico-químicas e biológicas e com exceção aos coliformes fecais, a forma como a comunidade microbiana responde a estas alterações tem sido pouco estudada. Assim sendo, por se tratar de um ambiente pouco estudado, é possível sugerir que espécies microbianas com grande potencial biotecnológico podem ter sido negligenciadas, sendo em alguns casos extintas antes mesmo de serem conhecidas e/ou o seu potencial biotecnológico explorado. Dessa forma, é de grande interesse avaliar a diversidade das comunidades bacterianas presentes nestes ambientes e inter-relacioná-las aos gradientes de poluentes químicos e contaminantes orgânicos presentes nos mesmos, assim como o entendimento do papel destas bactérias nestes nichos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os micro-organismos e o ambiente aquático

A presença dos mais diversos seres vivos está ligada à atividade metabólica proveniente da diversidade de micro-organismos presentes na natureza, incluindo parte consistente de todo o oxigênio existente no planeta, produzido principalmente, pela grande massa fotossintética aquática presente nos oceanos (DURHAM et al., 2015; KASTING; SIEFERT, 2002; TRÜPER, 1992). Os micro-organismos são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas, atuando principalmente em processos como a ciclagem de carbono, a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, desnitrificação, produção de metano, redução de sulfato, transformação de metais e de diferentes moléculas (HAINES et al., 2002; LI et al., 2014; PACE, 1997). Mora et al. (2011) estimaram a existência de aproximadamente 8,7 milhões de espécies de eucariotos no planeta e acreditam que cerca de 86% das espécies terrestres e 91% marinhas ainda não tenham sido descobertas, enquanto para procariotos, considerados os organismos mais diversos do planeta, estima-se que uma fração ainda menor foi identificada. Esta carência de informação não é diferente com a microbiota aquática dulcícola e acredita-se que a maior parte da biomassa procariótica encontrada na superfície ou no sedimento de corpos de água doce corresponda a bactérias heterotróficas e autotróficas (KIRCHMAN, 2002). À medida que diversas alterações ambientais ocorrem, esta diversidade pode sofrer alterações, uma vez que a densidade populacional é regulada por fatores como fotoperíodo, temperatura e demanda por nutrientes. Essas variações podem ser determinantes para a distribuição de espécies e a densidade de micro-organismos (BILLER et al., 2015; RIKHVANOV et al., 1999). Dessa forma, impactos ambientais como descarte de efluentes não tratados contribuem para a rápida degradação desses ecossistemas, além de gerar o acúmulo de metais pesados no ambiente, prejudicando a qualidade das águas e atividades dependentes do seu uso, desde domésticas e agrícolas até as atividades industriais (MOHANTY et al., 2000). Esta crescente atividade antropogênica tem implicado na mudança da diversidade microbiana nos ecossistemas, bem como seu funcionamento, acarretando a extinção de espécies capazes de promover a manutenção destes ambientes e o equilíbrio ecológico (AZEVEDO, 1998). Por esse motivo, a bioindicação por meio de micro-organismos tem sido amplamente utilizada para monitorar e auxiliar na recuperação ambiental (HAINES et al., 2002).

O Rio Tietê desempenha papel estratégico do ponto de vista ambiental, visto que grande parte do seu território está inserido em área de mananciais, além disso, os municípios do Alto Tietê fazem parte da Reserva da Biosfera do Cinturão Verde da Cidade de São Paulo, ecossistema que abriga o Parque Estadual da Serra do Mar, a Área de Proteção Ambiental da Várzea do Rio Tietê, a Área de Proteção da Serra do Itapeti, o Parque Estadual Nascentes do Rio Tietê entre outras unidades de conservação com entorno que ainda guardam riquezas de espécies do bioma Mata Atlântica. Assim, é importante salientar que a Mata Atlântica é internacionalmente reconhecida como um dos cinco mais importantes *hotspots* – as áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas em todo o mundo (DEVKOTA; IMBERGER, 2012; MORTATTI et al., 2012; MYERS et al., 2000). Segundo dados CETESB (1995; 1999; 2001) os remanescentes na bacia hidrográfica do Alto Tietê são importantes para a manutenção dos mananciais existentes, porém, essa região apresenta um grande avanço das áreas industriais e urbanas, sendo que as ações antrópicas são as principais causas de perda de biodiversidade (CONNOR et al., 2002; FORYS et al., 2002; RICKMAN; CONNOR, 2003). O Rio Tietê tem sido sistematicamente contaminado com resíduos de indústrias e esgoto doméstico com sérios impactos sobre a fauna, flora e comunidade microbiana associada ao rio e à mata ciliar. Segundo Mortatti et al. (2010), existe uma elevada concentração na parte média da bacia de drenagem, quando comparada com as concentrações médias do fundo geoquímico natural, indicando que algumas regiões do Rio Tietê estão fortemente poluídas com Zn e de moderada para fortemente poluída para Ni, no sentido da foz. Este resultado mostra a necessidade de estudos a respeito dos impactos destes poluentes na biodiversidade microbiana neste ambiente, a qual poderia ainda ser utilizada como indicadores de qualidade do rio. Embora alguns estudos sobre os efeitos destes contaminantes sobre a fauna (ROCHA et al., 2011; SERIANI et al., 2015) e a presença de bactérias patogênicas (ABRAHAM et al., 2007) estejam sendo realizados, pouco ainda se sabe sobre a influência dos poluentes sobre as comunidades microbianas.

2.2 Avaliação de comunidades por métodos independentes de cultivo

2.2.1 Caracterização da comunidade bacteriana por T-RFLP

A análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) corresponde a uma técnica de caracterização (*fingerprinting*) de alto rendimento, utilizada para monitorar mudanças na estrutura e composição de comunidades microbianas (SCHÜTTE et al., 2008). A técnica consiste na amplificação de uma região comum para a

comunidade avaliada com um dos *primers* marcados, geralmente parte do gene 16S rRNA para a comunidade bacteriana, e posterior corte com enzimas de restrição (BREIDENBACH; CONRAD, 2015), sendo possível então detectar estes fragmentos terminais por meio da corrida em sequenciador capilar. O alinhamento dos picos terminais de T-RFLP entre os arquivos e o uso de métodos estatísticos multivariados permitem detectar mudanças na estrutura e composição das comunidades microbianas em resposta a variações temporais, espaciais ou resultantes de tratamentos (FREDRIKSSON; HERMANSSON; WILÉN, 2014). Embora o T-RFLP seja uma boa ferramenta para a comparação e estudo das comunidades microbianas o sequenciamento de DNA pode ser considerado como uma das mais importantes ferramentas de estudo dos sistemas biológicos (MARDIS, 2011; RONAGHI, 2001). A estratégia metagenômica constitui em uma derivação da genômica microbiana convencional, pois não há necessidade de se obter culturas puras para sequenciamento, revelando, portanto, os genomas contidos na comunidade e não em populações isoladas. Como resultado constitui uma importante ferramenta para determinação de hipóteses a respeito das inter-relações dos membros da comunidade. Estas investigações são possíveis atualmente graças à diminuição dos custos do sequenciamento e da evolução da bioinformática, a qual condiciona o processamento de um enorme número de dados (KUNIN et al., 2008; LOU et al., 2013).

2.2.2 Sequenciamento em larga escala por MiSeq Illumina

É sabido que cerca de 99% das linhagens bacterianas presentes no ambiente não são cultiváveis em condições padrão de laboratório (SATTELY; FISCHBACH; WALSH, 2008) sugerindo que inúmeros metabólitos codificados por estes micro-organismos continuam desconhecidos.

A estratégia metagenômica constitui em uma derivação da genômica microbiana convencional, pois não há necessidade de se obter culturas puras para sequenciamento, revelando, portanto, os genomas contidos na comunidade e não em populações isoladas. Como resultado constitui uma importante ferramenta para determinação de hipóteses a respeito das inter-relações dos membros da comunidade. Estas investigações são possíveis atualmente graças à diminuição dos custos do sequenciamento e da evolução da bioinformática, a qual condiciona o processamento de um enorme número de dados (KUNIN et al., 2008; LOU et al., 2013). A utilização destas abordagens metagenômicas e conformacionais permitem a ampla avaliação do potencial biossintético de um ambiente e de organismos íntegros a partir de informações dos genomas e com o advento dos sequenciamentos de nova geração (Next-generation Sequencing - NGS), pode-se obter grande

quantidade de informações de sequências altamente precisas, fazendo dessas ferramentas, um recurso valioso não apenas à pesquisa de campo mas também na avaliação de distúrbios clínicos causados por diversas alterações genéticas (YOHE et al., 2015). Essa nova linha emergente, também conhecida como sequenciamento em larga escala ou de alto rendimento (High-throughput sequencing) permitiu com maior facilidade e agilidade a realização de sequenciamento de exomas, mobilomas, resistomas, transcriptomas e quantificação de transcritos, sequenciamentos de genomas completos e ressequenciamento, tornando-as acessíveis a um número muito maior de pesquisadores (KIRCHER et al., 2009; LITCHFIELD et al., 2015; REDDY; SINGH, 2014; THUNG et al., 2014).

Os resultados obtidos pela plataforma Illumina podem reduzir os custos e aumentar a profundidade do sequenciamento por amostra. Esta plataforma, assim como as demais pertencentes aos sequenciamentos de nova geração, produz elevado número de sequências, porém, seus reads relativamente curtos representavam limitações para o estudo de comunidades microbianas, o que foi resolvido com o surgimento da plataforma MiSeq com reads pareados de 250 a 300 pb resultando em informações taxonômicas mais precisas e confiáveis (JEON et al., 2015; WANG et al., 2007). A tecnologia de sequenciamento por Illumina se baseia na formação de uma matriz, imobilizando as sequências molde em lâmina (“flow cell”) para amplificação por ponte em fase sólida com nucleotídeos não marcados, gerando cerca de 1000 cópias próximas a cada molde, permitindo assim, a realização do sequenciamento por síntese. Nesta etapa, desoxirribonucleotídeos marcados reversivelmente com molécula fluorescente são utilizados para a polimerização. Apenas um nucleotídeo por vez é adicionado em cada passo e incorporado à extremidade 3'. Os fluoróforos são iluminados por um laser vermelho para os nucleotídeos A e C e verde para G e T e captados por filtros diferentes para o reconhecimento dos quatro nucleotídeos, a marcação fluorescente e os terminadores 3' são então removidos para o próximo ciclo (SCHIRMER et al., 2015).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a comunidades bacteriana nas águas da Bacia do Rio Tietê e correlacioná-las com parâmetros físico-químicos.

Para se alcançar os objetivos gerais, os objetivos específicos que compõem este projeto foram:

- i) Avaliar a variação nos parâmetros físico-químicos de diferentes pontos da Bacia do Rio Tietê;
- ii) Obter sequência parcial do gene 16S rRNA de bactérias presentes em diferentes pontos do Rio Tietê e seus afluentes;
- iii) Avaliar as comunidades por meio da técnica de T-RFLP;
- iv) Identificar a comunidade bacteriana da Bacia do Rio Tietê por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, utilizando a plataforma MiSeq - Illumina;
- v) Estimar a variação da diversidade e riqueza de bactérias da Bacia do Rio Tietê e correlacionar esta variação aos parâmetros físico-químicos e época de coleta.

Os pontos amostrados foram escolhidos de modo a representar as áreas mais contrastantes de acordo com a presença de áreas metropolitanas, com forte impacto antropogênico nas características físico-química do Rio Tietê, da sua nascente até a foz. Além disso, estes pontos compreendem pontos de avaliação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), órgão parceiro que forneceu as amostras utilizadas no presente trabalho.

4.2 Parâmetros físico-químicos de qualidade das águas

Os resultados físico-químicos apresentados neste trabalho fazem parte dos “Relatórios de Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo” redigidos e publicados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e encontram-se disponíveis no website (www.cetesb.sp.gov.br). A empresa segue o predisposto pela Resolução CONAMA 357/05. O Índice de Qualidade da Água (IQA) também realizado pela CETESB, considera os parâmetros coliformes fecais, Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O), fósforo total, nitrogênio total, Oxigênio Dissolvido (O.D.), pH, resíduo total, temperatura e turbidez e se utiliza da seguinte fórmula:

$$IQA = \prod_{i=1}^n q_i^{w_i}$$

Onde:

IQA = Índice de

Qualidade da Água que representa um valor entre 0 e 100.

qi = qualidade do iésimo-parâmetro, entre 0 e 100, obtido pela curva média de variação de qualidade em função de sua concentração ou média.

wi = peso correspondente ao iésimo-parâmetro, entre 0 e 1, atribuído em função da importância para a conformação global de qualidade, sendo:

$$\sum_{i=1}^n w_i = 1$$

Onde:

n = número de variáveis contidas no cálculo de IQA.

Os valores de IQA entre 0 e 100 são agrupados de acordo com as categorias baseadas nas ponderações apresentadas na tabela 1, onde Péssimo corresponde aos valores de 0 a 19, Ruim de 20 a 36, Regular de 37 a 51, Bom de 52 a 79 e Ótimo de 80 a 100.

Para as análises de Componentes Principais e Redundância foram avaliados os parâmetros alumínio total, condutividade, Carbono Orgânico Total (C.O.T.), Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O.), ferro total e dissolvido, fósforo total, nitrato, nitrogênio amoniacal, oxigênio dissolvido (O.D.), pH, potássio, sódio, temperatura e turbidez.

Tabela 1- Ponderações das categorias de IQA.

Categoria	Ponderação
ÓTIMA	$79 < IQA \leq 100$
BOA	$51 < IQA \leq 79$
REGULAR	$36 < IQA \leq 51$
RUIM	$19 < IQA \leq 36$
PÉSSIMA	$IQA \leq 19$

Para as análises de Componentes Principais e Redundância foram avaliados os parâmetros alumínio total, condutividade, Carbono Orgânico Total (C.O.T.), Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O.), ferro total e dissolvido, fósforo total, nitrato, nitrogênio amoniacal, oxigênio dissolvido (O.D.), pH, potássio, sódio, temperatura e turbidez.

4.3 Extração de DNA da microbiota aquática

Foram coletados 5 L de água em cada um dos pontos a serem estudados, no período entre Agosto à Novembro de 2013, representando a temporada de estiagem e Fevereiro à Abril de 2014, representando a temporada de cheias. As amostras foram compostas por filtragem de 1 L de água em membrana de 0,2 μ m Millipore® (Membrana GS em éster de celulose, 47 MM de diâmetro, branca, lisa - ©Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), em triplicata, os filtros foram trocados na medida em que sofreram saturação. Para a composição das amostras provenientes das regiões com altos níveis de saturantes, os filtros foram somados de maneira a completar um volume total de 1 L de água filtrada.

O DNA total dos organismos presentes na água foi extraído dos filtros com a utilização do PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Labs, Inc. Solana Beach, EUA). Os filtros foram congelados com nitrogênio líquido, macerados e então transferidos para microtubos fornecidos pelo Kit para a extração, seguindo as recomendações do fabricante.

4.4 Amplificação do gene 16S rRNA

Com o objetivo de verificar o sucesso da extração, foi realizada uma reação de amplificação do gene 16S rRNA de cada amostra obtida, utilizando os *primers* universais para

o domínio Bacteria, R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') (HEUER et al., 1997) e 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (NÜBEL et al., 1996). As condições de amplificação foram ajustadas para um volume final de 50 µL contendo: tampão da enzima 1 X, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de DNTPs, 0,1 µM de cada *primer*, 0,1U/µL de Taq DNA Polimerase. As reações sofreram desnaturação inicial a 94 °C por 7 minutos, seguida por 25 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

4.5 Análise de T-RFLP

Para a análise de T-RFLP os amplicons foram obtidos utilizando-se um dos *primers* (forward) marcado com a molécula fluorescente 6-carboxifluoresceína (FAM). Para amplificação do gene 16S rRNA de bactérias foram utilizados os *primers* FAM27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (OSBORNE et al., 2005) e 926R (5'-CCGTCAATTTCCTTTRAGTTT-3') (MUYZER et al., 1995). As reações sofreram desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 10 minutos (adaptado de YANG et al., 2013). Os produtos da PCR foram digeridos com a enzima de restrição HhaI (5U por reação) e a corrida dos fragmentos terminais foi realizada no equipamento 3500 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Jaguariúna, SP, em colaboração com o Dr. Itamar Soares de Melo e Dr. Fernando Dini Andreote. A análise dos picos foi ajustada para 100 unidades de fluorescência e realizada com auxílio dos programas GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems), Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) e Past (Paleontological STatistics) 2.17 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Fragmentos menores que 50 pb foram excluídos das análises.

4.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA por MiSeq Illumina

As amostras de DNA genômico total foram enviadas para MacroGen Korea para a construção de bibliotecas e realização da corrida, onde foram amplificadas com os *primers* (Forward 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW GCAG-3' e Reverse 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTAC HVGGGTATCTAATCC-3') específicos para a região hiper-variável V3-V4 do gene 16S rRNA para o domínio Bacteria. As reações foram submetidas a desnaturação a 95 °C por 3

minutos, seguida por 25 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos foram então purificados com Ampure Beads (AGENCOURT® AMPURE® XP) e ligados a adaptadores com a utilização do Nextera XT DNA Sample Preparation Kit, seguido da segunda reação de PCR sob as condições de 95 °C por 3 minutos, 8 ciclos sob as mesmas condições da reação anterior e nova purificação com Ampure Beads. Após a construção, as bibliotecas foram submetidas a quantificação, normalização e foram agrupadas, para a realização de desnaturação com NaOH, diluição em tampão de hibridização, desnaturação térmica, e, por fim, sequenciamento pela plataforma MiSeq (ILLUMINA, 2010; 2013).

4.6.1 Análise das sequências obtidas

A caracterização da comunidade microbiana por meio da análise do sequenciamento por MiSeq Illumina foi realizada de acordo com o método previamente descrito (PYLRO et al., 2014).

4.6.1.1 Seleção de sequências de acordo com a qualidade

Os filtros de qualidade e análises foram realizadas com o auxílio do programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) 1.8.0 e USEARCH 7 (REFERENCIA <http://drive5.com/uparse/>). Primeiramente, os arquivos *forward* e *reverse* gerados pelo sequenciamento *paired-end* foram alinhados e montado os contigs com o auxílio da ferramenta “*fastq-join*”, pertencente ao QIIME 1.8.0. Sequências que não apresentaram um alinhamento mínimo foram descartadas e as sequências aprovadas foram separadas de acordo com o tratamento, utilizando a ferramenta “*split_libraries_fastq.py*” por meio da lista de barcodes. Em etapa seguinte, utilizando o programa USEARCH 7, as amostras foram submetidas ao filtro Phred, no qual foram selecionadas apenas sequências com bases de pontuação superior a 20, ou seja, bases com a probabilidade máxima de 1% de erro (EWING et al., 1998). Além disso, as sequências que não apresentaram um tamanho mínimo de 240 nucleotídeos foram descartadas.

4.6.1.2 Preparo das sequências para a criação da matriz de UTO's

Após os filtros de qualidade, as sequências foram convertidas em formato compatível com USEARCH 7 utilizando BMP PERL SCRIPT (PYLRO et al., 2014). Em seguida com o auxílio do USEARCH 7 as amostras foram isentadas dos barcodes, singletons e chimeras (utilizando o banco de sequências do RDP Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>)).

4.6.1.3 Cluster, Alinhamento e Classificação

Foram criados clusters e construída uma tabela de UTOs, a qual pôde ser relacionada aos possíveis táxons correspondentes até o nível de 97%, utilizando a ferramenta “assign_taxonomy.py” do QIIME 1.8.0 que associa às sequências taxonomicamente classificadas pelo RDP. Após a determinação taxonômica, foi utilizada a ferramenta “align_seqs.py” (QIIME 1.8.0) para a realização do alinhamento das amostras utilizando sequências modelo presentes no banco de sequências do RDP. As regiões altamente variáveis foram removidas utilizando a ferramenta “filter_alignment.py” (QIIME 1.8.0). Enquanto a relação filogenética foi realizada utilizando a ferramenta “make_phylogeny.py”.

4.6.1.4 Estimativas de riqueza e diversidade

Por meio da ferramenta “summarize-table” (Biom - <http://biom-format.org/index.html>). Foi determinada a profundidade das análises de diversidade e riqueza. As análises subsequentes foram realizadas utilizando o programa QIIME 1.8.0. Primeiramente, as réplicas foram agrupadas com a ferramenta “collapse_samples.py”. Em seguida, com a ferramenta “core_diversity_analyses.py”, foram criadas as curvas de rarefação, as tabelas de frequência, gráficos de classificação e análise de PCoA. Os índices de riqueza Chao1 e de diversidade Shannon e Simpson foram calculados com “alpha_diversity.py”.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização físico-química da água

As Figuras 4 e 5 representam a variação dos parâmetros físico-químicos entre as amostras de cada temporada. O parâmetro condutividade apresentou a maior variação entre os valores extremos para ambas as amostragens (30 a 1.843 e 30 a 1.114) enquanto os valores obtidos para pH demonstraram menor variação, com maioria dos pontos apresentando valores próximos a 7.

Figura 4 – Variação dos parâmetros físico-químicos ao longo das amostras coletadas em 2013.

Nas extremidades estão representados os valores menores (esquerda) e maiores (direita) para cada parâmetro. Valores ao centro representam as médias. C.O.T = Carbono Orgânico Total; D.B.O. = Demanda Bioquímica de Oxigênio; N. amoniacal = Nitrogênio Amoniacal; O.D. = Oxigênio Dissolvido.

Embora a maioria dos parâmetros avaliados tenham apresentado valores diminuídos para a temporada 2014, de acordo com o teste de Tukey apenas o parâmetro temperatura apresentou diferença significativa de 2013 para 2014. A elevação da temperatura na temporada 2014 pode ser atribuída ao período de coleta, que representa a estação de cheias e coincide com o verão no Brasil. Devkota e Imberger (2012) avaliaram a região do Alto e Médio Tietê e também observaram diferença sazonal significativa na temperatura da água, com valores elevados para o período entre os meses de Janeiro à Abril.

Figura 5 – Variação dos parâmetros físico-químicos ao longo das amostras coletadas em 2014.

Nas extremidades estão representados os valores menores (esquerda) e maiores (direita) para cada parâmetro. Valores ao centro representam as médias. C.O.T = Carbono Orgânico Total; D.B.O. = Demanda Bioquímica de Oxigênio; N. amoniacal = Nitrogênio Amoniacal; O.D. = Oxigênio Dissolvido.

A Análise de Componentes Principais realizada com base nos parâmetros físico-químicos para ambas as amostragens indicou separação dos pontos de acordo com a qualidade da água. A Componente 1 representou 72,3% da explicação para a distribuição observada e foi responsável pela separação dos pontos com qualidade Ótima e Boa dos pontos com qualidade Ruim e Péssima, enquanto a Componente 2, com 9,3% de explicação, apresentou tendência de separação dos pontos com qualidade Boa, Regular e Ruim dos pontos com qualidade Ótima e Péssima (Figura 6). As variáveis ambientais das componentes 1 e 2 somadas, explicaram 81,6% da distribuição dos pontos amostrados e os parâmetros nitrogênio amoniacal e oxigênio dissolvido representaram os parâmetros mais significativos para a distribuição da Componente 1 enquanto turbidez e sódio melhor explicaram a componente 2.

Os pontos com qualidade de água ruim ou péssima tendem a apresentar valores elevados para os parâmetros alumínio total, condutividade, C.O.T., D.B.O., fósforo total, ferro e nitrogênio amoniacal e baixos valores para O.D., enquanto pontos com qualidade ótima e boa tendem a apresentar valores baixos para estes parâmetros. Valores mais baixos para turbidez e elevados para condutividade, potássio e sódio em relação aos outros pontos com a mesma qualidade, podem explicar a proximidade de TIET02500 (2013 e 2014) e TIET02600

(2014) com pontos apresentando qualidade de água ótima. O mesmo foi observado para TIET02400, TIET02450 e PINH04500 amostrados em 2014, que agruparam mais distantes dos demais pontos com qualidade péssima e apresentam valores mais elevados para ferro total e turbidez e diminuídos para condutividade, nitrogênio amoniacal, pH e sódio (Figura 6 e Tabela A2 - em anexo).

Figura 6 – Análise dos componentes principais (PCA) dos pontos de amostragem com base nas características físico-químicas.

Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as cores dos símbolos indicam a qualidade da água de origem, onde Azul = Ótimo; Verde = Bom; Amarelo = Regular; Vermelho = Ruim e Roxo = Péssimo; C.O.T. = Carbono Orgânico Total; D.B.O. = Demanda Bioquímica de Oxigênio; N. amoniacal = Nitrogênio Amoniacal; O.D. = Oxigênio Dissolvido.

Os pontos com qualidade de água inferior distribuem-se principalmente pelas UGRHs Alto Tietê; Piracicaba, Capivari, Jundiaí (PCJ) e Sorocaba Médio Tietê, ambas com atividade principal Industrial (Figura 1) e localizadas próximas às Regiões Metropolitanas (R.M.) de São Paulo e Campinas (Figura 7). Estas regiões abrangem os principais municípios do Estado de São Paulo, dentre eles Sumaré, Americana, Campinas, Pirapora do Bom Jesus, Santana do Parnaíba, Barueri, Cotia, Jandira, Carapicuíba, Osasco, São Paulo, todos os municípios do ABC, Guarulhos, Suzano, Mogi das Cruzes, Biritiba Mirim, Paraibuna e

Salesópolis. Os municípios que mais contribuem para a má qualidade desta região estão na grande São Paulo, com um adensamento urbano dentre os maiores do mundo, abrigando população com aproximadamente 11 milhões de pessoas só na capital e 20 milhões se considerarmos toda a região metropolitana, sendo também o principal centro financeiro do Brasil, com grande quantidade de indústrias e somados à população da R. M. de Campinas (cerca de 3 milhões) representam mais de 50% de toda a população do Estado, que abriga atualmente cerca de 41 milhões de pessoas. Além da capital, as regiões de Guarulhos, Osasco, ABC, Barueri e Campinas contribuem significativamente com a elevada quantidade de poluição difusa, industrial e urbana despejada todos os dias nos afluentes do rio Tietê (Comitê da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê, (2009); Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), 2012; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011, 2013). Já os pontos com qualidade boa e ótima se concentram nas UGRHIs Tietê Batalha e Baixo Tietê, localizadas em regiões com atividade predominantemente agropecuária e com população de aproximadamente 492 mil e 728.9 mil habitantes, respectivamente (CETESB, 2014). Este resultado mostra que mesmo após o despejo de grande quantidade de efluentes não tratados, o Rio Tietê retorna às condições consideradas boas, de acordo com estes parâmetros físico-químicos. Entretanto, pouco se sabe sobre o impacto destes poluentes na comunidade bacteriana presente nestas regiões consideradas de qualidade boa.

Figura 7 – Regiões Metropolitanas do Estado de São Paulo.

R.M. = Região Metropolitana.

Fonte: Adaptado de Atlas do Senso Demográfico 2010 - (IBGE, 2013).

Os níveis de contaminantes observados ao longo do rio Tietê são decorrentes do despejo de efluentes domésticos e industriais não tratados (poluentes orgânicos altamente complexos), proveniente de esgotos sanitários, principalmente na região metropolitana de São

Paulo, bem como inúmeras substâncias inorgânicas de fontes industriais. Além disso, cargas poluidoras consideráveis de esgotos domésticos, agrícolas e atividades agroindustriais continuam sendo despejadas ao longo do curso do rio (ROCHA et al., 2011).

5.2 Avaliação da Comunidade Bacteriana por T-RFLP

Os dados de T-RFLP gerados foram filtrados de acordo com o programa GeneMapper® 4.1, excluindo-se os fragmentos terminais menores que 50 pb e salvos em arquivo Excel. A planilha gerada também foi avaliada e os fragmentos terminais muito raros, que não apresentaram reprodutibilidade em pelo menos 2 das 3 réplicas de pelo menos uma amostra, também foram excluídos das análises. Foram obtidos 385 fragmentos terminais de restrição (TRFs – *Terminal Restriction Fragments*) representando a temporada de estiagem em 2013 e 217 TRFs representando a temporada de cheias em 2014 (Figura 8).

Figura 8 – Frequência dos TRFs obtidos entre as temporadas amostradas.

Observa-se maior número de TRFs para a temporada 2013 (em azul) em comparação com a temporada 2014 (em vermelho).

Embora existam trabalhos indicando o aumento da riqueza microbiana em rios e reservatórios após precipitações, que aumentam a dispersão microbiana carreando espécies das margens para dentro dos corpos d'água (CRUMP et al., 2012; HELLBERG; CHU, 2015; KIM et al., 2013; KRISTEMANN et al., 2002) o menor número absoluto dos TRFs e menor abundância entre as amostras, observados para a temporada 2014 podem ser explicados pelas taxas de precipitação, uma vez que o mesmo volume de água foi filtrado para ambas amostragens, o período de cheias (2014) pode representar a dispersão da comunidade existente além de afetar a concentração e disponibilidade de nutrientes e outros compostos,

limitando o crescimento populacional (ÇARDAK; ÖZGÜR ÖZBEK; KEBAPÇIOĞLU, 2015). McLellan e Salmore (2003) também observaram maior dispersão de *Escherichia coli* durante as primeiras 8 horas após precipitações, contudo, densidades mais elevadas da bactéria foram observadas durante períodos de estiagem.

Filotipos regionalmente comuns, presentes em todas ou na maioria das amostras de um determinado grupo, representam a “comunidade core” deste ambiente e fornecem a base para a colonização das comunidades de ocorrência ocasional ou satélites (BESEMER et al., 2013; STALEY et al., 2014). Os TRFs presentes em 50% ou mais das amostras foram caracterizados como “core” e representam grupos de bactérias com metabolismo mais amplo, capazes de habitar tanto os ambientes com altos níveis de poluentes quanto os ambientes mais conservados e estão representados na Figura 9.

Figura 9 – Diagrama de Venn representando os TRFs core.

A temporada 2013 apresentou 28 TRFs core, representando 7,3% do total de TRFs obtidos para este período, enquanto 17 TRFs core (7,8% do total) foram obtidos para a temporada 2014. Apenas 4 TRFs foram compartilhados entre as temporadas indicando que as comunidades bacterianas entre os períodos amostrados em 2013 e 2014 devem apresentar estruturação diferenciada. Chow et al. (2013) e Alonso-Sáez et al. (2015) avaliaram comunidades microbianas marinhas e observaram diferenças sazonais entre as comunidades avaliadas e em ambos os trabalhos também foram encontrados grupos generalistas persistentes e dominantes.

Para avaliar os TRFs representando grupos bacterianos com maior especificidade as amostras foram agrupadas de acordo com a qualidade da água de origem. Os TRFs foram caracterizados como representativos da categoria a qual estão contidos, quando presentes em uma ou mais amostras pertencentes àquela categoria. A grande maioria dos TRFs representam grupos bacterianos capazes de colonizar ambos os ambientes, limpos e sujos, embora muitos

apresentem diferentes níveis de especificidade, com maior frequência em pontos limpos ou sujos (dados não apresentados). A temporada 2013 apresentou maior número total de TRFs, mas menor especificidade, com 36 TRFs (9,3%) presentes apenas em pontos com qualidade alta (boa e ótima) e 8 TRFs (2,0%) apenas em pontos com qualidade baixa (ruim e péssima), quando comparada com a temporada 2014, que apresentou 43 e 18 TRFs (19,8 e 8,3%), para pontos com qualidade alta e baixa, respectivamente. Além disso, foi observado uma maior especificidade por pontos com qualidade alta (36 e 43 TRFs) com relação aos pontos com qualidade baixa (8 e 18 TRFs), para ambas as temporadas (Figura 10).

Figura 10 – Diagrama de Venn representando TRFs compartilhados por qualidade de água.

Em A estão representados TRFs obtidos para a temporada 2013, em B para 2014. Os TRFs foram agrupados de acordo com a qualidade da água de origem.

TRFs presentes exclusivamente em pontos com qualidade de água baixa, podem estar relacionados principalmente com baixos níveis de oxigênio dissolvido. Como observado para o TRF 226, encontrado na temporada 2013, que esteve presente no ponto TIET02400 e em todos os pontos com qualidade péssima, mas ausente em PINH04500 (que apresenta O.D.= 1,5), indicando afinidade por níveis de oxigênio dissolvido inferiores a 1 (Tabela A2 – em anexo). Ainda, Byappanahalli et al. (2012) salientam características ambientais como a composição química da água, níveis de oxigênio dissolvido, turbidez, e a profundidade, como importantes fatores para a eliminação natural, por raios solares, de micro-organismos indicadores de contaminação fecal, onde, quanto maior a turbidez e a profundidade e menor o nível de oxigênio dissolvido, menores são as taxas de descontaminação.

A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) foi realizada para a avaliação das matrizes e do gradiente de distribuição dos grupos bacterianos. O valor obtido abaixo de 3

indicou como melhor modelo matemático a Análise de Redundância (RDA), que foi realizada com o auxílio do programa Canoco 4.5 (MENDES et al., 2012). Os resultados obtidos apresentaram tendência de agrupamentos dos pontos de acordo com a qualidade da água de origem. Para a temporada 2013 os eixos principais 1 e 2 somados, explicaram 33% da distribuição dos grupos e os parâmetros D.B.O., nitrato e turbidez foram os mais significativos para a estruturação das comunidades amostradas. (Figura 11A e Tabela A3 - em anexo). Já a temporada de 2014 apresentou melhor separação entre as amostras e maior explicação entre os eixos (63%), sendo os parâmetros principais para a estruturação das comunidades desta temporada, fósforo total, ferro dissolvido e turbidez (Figura 11B e Tabela A4 - em anexo), corroborando com Mallin et al. (2000) que observaram correlação positiva entre a abundância de bactérias entéricas e o parâmetro turbidez, além de uma forte correlação com nitrato.

Figura 11 – Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos.

Em **A** estão distribuídos pontos e parâmetros amostrados em 2013, em **B** estão distribuídos os pontos e parâmetros amostrados em 2014. Os TRFs foram agrupados de acordo com a qualidade da água de origem. C.O.T.= Carbono Orgânico Total; D.B.O.= Demanda Bioquímica de Oxigênio; O.D.= Oxigênio Dissolvido.

A figura B1 (em anexo) representa ambas as temporadas em uma única RDA. Embora a explicação da distribuição seja diminuída neste agrupamento, chegando apenas a 27,8%, a separação entre as temporadas fica evidente, sendo representada pelo eixo principal

1, seguida da separação pela qualidade da água de origem, representada pelo eixo principal 2. As variáveis ambientais que melhor explicaram a distribuição das comunidades agrupadas, sob análise estatística de $p < 0,05$, foram temperatura (11%) e oxigênio dissolvido (9%), representando mais uma vez parâmetros importantes para a estruturação das comunidades bacterianas avaliadas.

As comparações dos perfis bacterianos entre as categorias de qualidade de água e entre as temporadas, realizadas pela análise de similaridade (ANOSIM), reforçam os resultados obtidos pela RDA, apresentando maior diferenciação entre os grupos diferentes para a temporada 2014, como Ótima14/Péssima-14 (0,87) e menor diferenciação para a mesma comparação em 2013, como Ótima13/Péssima13 (0,45). Além disso, comparações entre as temporadas revelaram maior diferenciação entre as comunidades bacterianas presentes em pontos com qualidade inferior, como Péssima13/Péssima-14 (0,81) em relação aos pontos com qualidade superior, como Ótima13/Ótima-14 (0,55) (Tabela2).

Tabela 2 – Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os agrupamentos e as temporadas amostradas.

			(Continuação)		
Comparações	Valor de R	Valor de p	Comparações	Valor de R	Valor de p
Ótima-13/Regular-13	-0,0164	0,5354	Ótima-14/Boa-13	0,5861	<0,05
Ruim-14/Péssima-14	0,0454	0,2735	Boa-14/Ruim-13	0,6116	<0,05
Boa-13/Regular-13	0,0703	0,3635	Ruim-13/Ruim-14	0,6423	<0,05
Ótima-13/Boa-13	0,0784	0,0673	Ótima-13/Regular-14	0,6448	<0,05
Boa-13/Ruim-13	0,0833	0,0578	Regular-13/Péssima-13	0,6633	<0,05
Boa-14/Regular-14	0,1440	0,1111	Ótima-13/Péssima-14	0,7105	<0,05
Regular-13/Ruim-13	0,1677	0,1391	Boa-14/Péssima-13	0,7147	<0,05
Ótima-13/Ruim-13	0,2101	<0,05	Regular-14/Ruim-13	0,7253	<0,05
Boa-14/Ruim-14	0,3830	<0,05	Ótima-14/Ruim-13	0,7451	<0,05
Ruim-13/Péssima-13	0,3969	<0,05	Regular-13/Ruim-14	0,7628	<0,05
Regular-14/Ruim-14	0,4193	<0,05	Regular-13/Regular-14	0,7636	<0,05
Ótima-13/Ruim-14	0,4242	<0,05	Ruim-14/Péssima-13	0,7663	<0,05
Ótima-14/Boa-14	0,4314	<0,05	Ótima-14/Regular-14	0,7722	<0,05
Boa-13/Péssima-13	0,4508	<0,05	Boa-13/Péssima-14	0,7858	<0,05
Ótima-13/Péssima-13	0,4576	<0,05	Ruim-13/Péssima-14	0,7929	<0,05
Boa-13/Boa-14	0,4637	<0,05	Péssima-13/Péssima-14	0,8146	<0,05
Ótima-13/Boa-14	0,5010	<0,05	Ótima-14/Péssima-13	0,8156	<0,05
Boa-13/Ruim-14	0,5283	<0,05	Regular-14/Péssima-13	0,8397	<0,05
Ótima-13/Ótima-14	0,5587	<0,05	Ótima-14/Ruim-14	0,8671	<0,05
Boa-13/Regular-14	0,5621	<0,05	Ótima-14/Péssima-14	0,8703	<0,05
Regular-14/Péssima-14	0,5651	<0,05	Regular-13/Boa-14	0,9034	<0,05
Boa-14/Péssima-14	0,5673	<0,05	Regular-13/Péssima-14	0,9574	<0,05
			Regular-13/Ótima-14	0,9955	<0,05

Valores de R próximos a 1 representam maior diferenciação, próximos a 0, maior similaridade. Valores de p representam significância estatística.

Os pontos qualidade Regular-13 apresentaram alta diferenciação com relação à todos os grupos da temporada 2014 e alta similaridade com grupos de qualidade superior amostrados em 2013, contudo, as comparações podem ter sofrido interferência do baixo número de amostras para esta categoria, tendo apenas SORO02100 em 2013 e SORO02100 com CMDC02900 em 2014.

Os índices de diversidade e estimadores de riqueza gerados com auxílio do programa Past 2.17 revelaram diferenças entre as temporadas amostradas, com exceção dos valores obtidos para IQA e (*Eveness*), que não apresentaram diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey. A temporada 2013 apresentou maior riqueza de grupos bacterianos e maior diversidade com relação à temporada 2014, de acordo com o estimador de riqueza Chao-1 e os índices de diversidade Simpson 1-D e Shannon-H, ao contrário da dominância, que foi maior em 2014 (Figura 12).

Figura 12 – Índices e estimadores entre as temporadas amostradas.

* representam diferença significativa entre os dois grupos de acordo com o teste de Tukey.

Para a temporada 2013, apenas os valores de IQA foram significativamente diferentes. Embora tenha sido observado que pontos com qualidade inferior apresentaram maior riqueza e diversidade e menor dominância com relação aos pontos com qualidade de água superior, estas diferenças não foram significativas (Figura 13). O ponto PATO02800 foi o ponto com maior riqueza e diversidade e menor dominância, para esta temporada, enquanto TITR02800

representou o ponto com menor riqueza e diversidade e com maior valor de dominância, ambos com qualidade de água superior (boa e ótima, respectivamente) (Tabela A5).

Figura 13 – Índices e estimadores obtidos para a temporada 2013.

* representam diferença significativa entre os dois grupos de acordo com o teste de Tukey.

De acordo com o teste de Tukey, todos os estimadores e índices apresentaram diferença significativa entre os grupos de qualidade superior e inferior, para a temporada 2014 (Figura 14). A riqueza de grupos bacterianos e a diversidade, segundo o estimador Chao-1 e os índices Simpson 1-D e Shannon-H, foram maiores em pontos com qualidade superior (Regular, Boa e Ótima) com relação ao grupo representando pontos com qualidade ruim e péssima. O ponto com maior riqueza e diversidade e menor dominância para a temporada 2014 foi ESGT02050, com qualidade de água Boa, enquanto BQGU03850 representou o ponto com menor diversidade e riqueza e maior dominância e apresenta qualidade de água Péssima, apresentando, portanto, relação contrária à observada para a temporada 2013 cujos pontos com maior e menor riqueza e diversidade apresentaram qualidade de água semelhante.

Os valores para dominância apresentaram correlação negativa aos índices de diversidade Simpon 1-D e Shannon-H tanto em 2013 quanto em 2014. Tal correlação era esperada, uma vez que a diversidade tende a ser menor em comunidades com grupos dominantes.

Com exceção ao Índice de Qualidade das Águas, valores para estimadores e índices apresentaram relação inversa entre as temporadas amostradas. A temporada 2013 apresentou valores de riqueza, diversidade e eveness maiores para pontos com qualidade de água Ruim e Péssima e menores para pontos com qualidade Ótima, Boa e Regular, enquanto a temporada 2014 apresentou maiores valores para pontos com qualidade Ótima, Boa e Regular e menores para Ruim e Péssima. Essa inversão reforça a hipótese de que ocorram diferenças na estruturação das comunidades entre os períodos amostrados em 2013 e 2014.

Figura 14 – Índices e estimadores obtidos para a temporada 2014.

* representa diferença significativa entre os dois grupos de acordo com o teste de Tukey.

Nos estudos de ecologia de córregos e rios os padrões da biodiversidade presentes têm sido extensivamente verificados com relação à continuidade longitudinal que estes ambientes apresentam, como descrito no Conceito do Rio Continuo (River Continuum Concept – RCC), que enfatiza mudanças ambientais e ecológicas à jusante e prevê os picos de biodiversidade em riachos de tamanho médio, onde ocorre maior heterogeneidade ambiental (BESEMER et al., 2013; VANNOTE et al., 1980). Estudos com peixes e invertebrados têm suportado este conceito, demonstrando o aumento da diversidade local das cabeceiras para jusante dos riachos estudados (ALTERMATT et al., 2013; FINN et al., 2011; MUNEEPEERAKUL et al., 2008). Contudo, no presente trabalho a observação do efeito da continuidade pode ter sido prejudicada

pela inconsistência da qualidade das águas e pelos diferentes tipos e níveis de compostos orgânicos e químicos despejados nos afluentes, embora nem mesmo os pontos com caracterização físico-química muito próxima, como TIET04200 com TIPI04900 e TITR02100 com TITR02800, tenham apresentado continuidade crescente de riqueza ou diversidade (Figura 3 e Tabela A5 - em anexo). A vazão do corpo d'água, e a interação com a comunidade ribeirinha pode ter influência maior sobre estas comunidades avaliadas, com o efeito positivo das barragens sobre a riqueza e a diversidade das comunidades bacterianas logo a jusante. Esta hipótese pode ser constatada por meio da análise dos pontos TIPI04900 com TIRG02900, JCGU03900 com TIET02600 e TIPR02990 com TIET2700 que apresentaram maior número de grupos bacterianos e maior riqueza, para ambas as temporadas e localizam-se a montante e jusante das barragens de Pirapora, Ibitinga e Promissão, respectivamente (Figura 3 e Tabela A5 - em anexo). A construção das barragens pode alterar significativamente a hidrologia do rio e a ecologia aquática à jusante e à montante das barragens, alterando o ambiente físico, químico e biológico (HELLAND-HANSEN; HOLTEDAHL; LIYE, 1995). Estas mudanças podem alterar drasticamente os micro-organismos aquáticos presentes nos reservatórios, especialmente organismos mais sensíveis como o bacterioplankton (DUMESTRE et al., 2001; RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2013). Além disso, a sedimentação causada pelas barragens apresenta mudanças na proporção de bactérias de vida livre e bactérias particuladas, o que pode implicar em mudanças na composição e capacidade metabólica das comunidades de ambos os lados (BESEMER et al., 2007; DELONG et al., 1993; KARNER; HERNDL, 1992). A reposta das bactérias às mudanças ambientais não ocorre apenas pelas mudanças nos filotipos existentes, mas também pelo rearranjo funcional dos táxons presentes (COMTE; DEL GIORGIO, 2011). Yan et al. (2015) descrevem ainda a influência das mudanças ambientais geradas pelo represamento sobre a comunidade microbiana a montante da barragem avaliada, demonstrando diferenças entre a comunidade presente em águas represadas e as demais regiões a montante do rio. Ruiz-González et al. (2013), por sua vez, observaram aumento significativo de grupos específicos como Alphaproteobacteria e Actinobacteria após os reservatórios. Segundo Dumestre et al. (2001) a aeração causada pelas quedas geradas pelas barragens pode favorecer a oxidação biológica dos compostos reduzidos originados nos reservatórios.

5.3 Caracterização da Comunidade Bacteriana por MiSeq Illumina

Com base nos IQAs e resultados obtidos pela técnica de T-RFLP (diversidade e riqueza), 14 pontos contrastantes foram escolhidos para a caracterização das comunidades bacterianas

por sequenciamento em larga escala e 56 amostras foram sequenciadas em “multiplexing” utilizando-se a plataforma MiSeq Illumina. Os pontos JPEP03600 e PATO02900 não apresentaram repetições pela baixa quantidade de DNA, não passando pelo teste de qualidade para a construção das bibliotecas (Tabela3).

Tabela 3 – Pontos avaliados por Illumina e número de sequências após filtragem.

Pontos	Rep.	Macrogen	Joined	Split	Filtrados
BQGU3850-14	3	1.841.094	285.504	285.321	163.017
TIRG2900-13	3	1.881.414	137.827	137.695	87.720
TIRG2900-14	3	1.562.802	224.959	224.831	130.563
TIET4200-13	3	1.907.418	255.037	254.784	157.514
TIET4200-14	3	1.656.376	202.196	202.078	120.077
JUNA4900-14	3	1.613.860	154.568	154.496	90.514
TATU4850-14	3	1.583.544	259.865	259.534	147.769
PINH4500-13	3	1.587.640	203.230	203.074	112.684
PINH4500-14	3	1.223.564	124.805	124.742	74.646
TIPI4900-14	2	895.766	133.913	133.833	80.091
TAMT4900-14	3	1.654.240	232.354	232.276	131.134
TIET2450-13	3	1.803.194	159.394	159.331	109.035
TIET2450-14	3	1.957.772	174.684	174.601	96.340
TIET2400-13	3	1.620.654	144.273	144.220	99.246
TIET2400-14	2	1.217.170	123.580	123.530	68.532
CPIV2700-13	2	1.071.622	78.427	78.341	43.360
RGRA2990-14	3	1.670.150	237.798	237.697	137.175
JPEP3600-13	3	1.658.906	181.737	181.663	97.242
JPEP3600-14	1	583.714	68.288	68.252	34.349
PATO2900-13	3	1.700.614	187.649	187.584	112.888
PATO2900-14	1	599.360	64.997	64.960	36.226
Total:	56	31.290.874	3.635.085	3.632.843	2.130.122

Os valores apresentados representam o número de sequências obtidas para cada ponto, somando-se os valores obtidos para cada repetição. Os pontos foram organizados de acordo com a qualidade da água.

Foram geradas 31.290.874 sequências iniciais, embora, nem todas apresentaram qualidade e tamanho necessários para serem utilizadas nas análises taxonômicas e ecológicas. Após o alinhamento das sequências *forward* e *reverse* do sequenciamento *paired-end*, foram gerados 3.635.085 sequências consenso (contigs), das quais 2.130.122 (58,59% do total de sequências aprovadas nos contigs) passaram pelos métodos de filtragem e foram utilizadas para as demais análises. A redução do número de *reads* no processo de geração dos contigs é esperada uma vez que as sequências *forward* e *reverse* são unidas em apenas um contig, embora em condições perfeitas fossem esperados obter-se metade do número inicial, em muitos casos a existência de bases com qualidade inferior, principalmente nas extremidades, associada à uma

taxa de erro do sequenciamento, reduz a taxa de acerto no alinhamento entre as sequências *forward* e *reverse* e consequentemente, a realização dos contigs. Sequências erradas podem ser geradas durante a amplificação por PCR, devido a hibridação não específica dos *primers* (KURATA et al., 2004), temperatura de anelamento baixa (ISHII; FUKUI, 2001) e reanelamento do *template* (SUZUKI; GIOVANNONI, 1996) e embora um método de resolução para o não pareamento das regiões de sobreposição de sequências geradas por *paired-end* tenha sido proposto, este método não é capaz de corrigir os erros nas sequências presentes em regiões que não se sobrepõe (JEON et al., 2015).

As curvas de rarefação foram construídas ao nível de 97% de similaridade e apresentaram tendência à estabilização. Embora os pontos TIET02450-14 e TIET02400-14 tenham apresentado menor estabilização de sequências, seguidos por PATO02900-14, JPEP03600-14, TIET04200-13 e TIET04200-14, os demais pontos avaliados apresentaram estabilização próxima, indicando que o esforço amostral foi suficiente para avaliação da comunidade bacteriana dos pontos amostrados (Figura 15).

Figura 15 – Curvas de rarefação construídas com o auxílio do programa QIIME, indicando o efeito do esforço no sequenciamento.

Estimativas realizadas com o auxílio do programa QIIME a 97% de similaridade.

A figura 16 apresenta os valores estimados de riqueza de acordo com Chao-1. Os pontos que apresentaram maior riqueza foram PATO02900-14, TIET02450-14, TIET02400-14 e JPEP03600-14. Pontos avaliados em ambas as temporadas apresentaram maior riqueza em 2014, com exceção do ponto PINH04500 que apresentou maior riqueza em 2013 e TIRG02900 que apresentou valores bem próximos para ambas as amostragens, indicando relação oposta ao

observado para os dados de T-RFLP cuja maior riqueza foi observada para a temporada de 2013.

Figura 16 – Estimativas de riqueza por Chao-1 entre os pontos avaliados.

Estimativas de riqueza realizadas com o auxílio do programa QIIME a 97% de similaridade.

Os valores para os 15 parâmetros físico-químicos avaliados no presente trabalho foram divididos em categorias e suas influências sobre a riqueza das comunidades foi avaliada com o auxílio do programa QIIME. O parâmetro temperatura apresentou maior influência sobre a riqueza das comunidades avaliadas, sendo a maior riqueza observada entre o intervalo de 25 a 27 °C, temperatura ideal para a grande maioria dos micro-organismos ambientais, enquanto a menor riqueza foi observada para o intervalo entre 30 a 33 °C (Figura 17A). Já o parâmetro oxigênio dissolvido não apresentou relação tão clara sobre a riqueza dos pontos avaliados, sendo a maior riqueza observada para o intervalo entre 1 a 3 mg.L⁻¹, embora tenha evidenciado a influência negativa dos níveis inferiores a 1 mg.L⁻¹ sobre a riqueza avaliada (Figura 17B). O mesmo pôde ser observado para a demanda bioquímica de oxigênio, que apresentou maior riqueza nos pontos com níveis mais baixos (Figura 17C). A riqueza de acordo com o parâmetro fósforo total apresentou valores bem próximos para ambos os intervalos apresentados, contudo, assim como a D.B.O., indicou maior riqueza nos pontos apresentando níveis menos elevados para este indicador (Figura 17D). Já o parâmetro nitrogênio amoniacal apresentou a melhor

explicação sobre a riqueza dos pontos avaliados, tendo relação inversa à riqueza observada (Figura 17E). De acordo com Schindler e Vallentyne (2008) a deposição de nitrogênio e as cargas de fósforo relacionados à disposição de esgotos estão afetando ecossistemas aquáticos naturais em todo o mundo e segundo Scofield et al. (2015) a temperatura e a concentração de nutrientes são descritas como os principais fatores para a regulação do metabolismo de bactérias aquáticas. Em seus experimentos nas águas de lagoas costeiras do sudeste brasileiro, a elevação de apenas 1 °C resultou no aumento em 4% nas taxas de respiração do bacterioplankton, diminuição de 0,9% na produção e redução de 4% na eficiência do crescimento bacteriano. Além disso, temperaturas mais elevadas podem ainda reduzir a eficiência de reações enzimáticas, aumentando os custos metabólicos da manutenção e reparo celular, reduzindo a eficiência do crescimento microbiano (HALL; COTNER, 2007).

Figura 17 – Estimativas de riquezas correlacionadas aos parâmetros físicos e químicos da água.

Estimativas de riqueza correlacionadas aos parâmetros físico-químicos, realizadas com o auxílio do programa QIIME a 97% de similaridade.

Os índices de diversidade de Simpson e Shannon-Winner e os valores de dominância gerados com base na matriz de sequenciamento estão apresentados na Tabela 4. Para a temporada 2013 os menores índices de diversidade foram observados para os pontos com qualidade de água boa (JPEP03600 e PATO02900, respectivamente) de acordo com ambos os estimadores, e maior diversidade para pontos com qualidade de água inferior, sendo os pontos mais diversos CPIV02700 (qualidade ruim) de acordo com Simpson e TIET04200 (qualidade

péssima) de acordo com o índice de Shannon-Winner. Já para a temporada 2014 os índices foram concordantes e menor e maior diversidade foi observada para os pontos TATU04850 e TIET02400, respectivamente, ambos com qualidade de água péssima. Além disso, a qualidade da água parece exercer relação inversa a diversidade avaliada. Pontos amostrados em ambas as temporadas que apresentaram diminuição da qualidade da água como TIET02400, TIET02450, JPEP03600 e PATO02900, apresentam aumento da diversidade, enquanto o ponto TIRG02900 apresentou aumento da qualidade da água e diminuição da diversidade observada.

Tabela 4 – Índices de diversidade.

Pontos	IQA		Dominância*		Simpson*		Shannon-H*	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	---	14	---	0,0632	---	0,937	---	5,578
TIRG02900	14	21	0,0396	0,0750	0,960	0,925	6,396	5,768
TIET04200	15	15	0,0515	0,0491	0,948	0,951	6,680	6,467
JUNA04900	---	16	---	0,0216	---	0,978	---	6,696
TATU04850	---	16	---	0,2619	---	0,738	---	4,070
PINH04500	17	16	0,0415	0,0354	0,958	0,965	6,421	6,269
TIPI04900	---	18	---	0,0641	---	0,936	---	5,926
TAMT04900	---	19	---	0,0285	---	0,971	---	6,610
TIET02450	25	19	0,0526	0,0137	0,947	0,986	5,690	7,852
TIET02400	27	19	0,0416	0,0103	0,958	0,990	5,801	7,946
CPIV02700	28	---	0,0263	---	0,974	---	6,557	---
RGRA02990	---	31	---	0,0735	---	0,927	---	5,633
JPEP03600	76	70	0,2123	0,0309	0,788	0,969	4,409	7,118
PATO02900	78	54	0,1063	0,0649	0,894	0,935	5,079	6,593

*Valores extremos estão apresentados em negrito.

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) 3D realizada por meio do programa QIIME demonstrou agrupamento das amostras de acordo com a qualidade da água e local de amostragem. Foram apresentados 3 agrupamentos principais, sendo o primeiro representativo das comunidades presentes nas águas com qualidade Boa (PATO02900 e JPEP03600), o segundo, composto por pontos com qualidade de água ruim e péssima localizados na parte superior da bacia (BQGU03850, TAMT04900, PINH04500, TIET04200, TIPI04900 e TIRG02900) juntamente com os pontos RGRA02990 e TATU04850 coletados mais distantes e que se posicionam nas extremidades do agrupamento, e o terceiro e último grupo composto por pontos também com qualidade ruim e péssima localizados mais ao norte, representado por JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700. Embora alguns dos pontos apresentem qualidade de água diferente, estão ligados entre si, os rios Baquirivu-Guaçu (BQGU03850), Tamanduateí (TAMT04900) e Pinheiros (PINH04500) deságuam no rio Tietê anteriormente ou imediatamente (no caso do Pinheiros) ao ponto TIET4200, que flui até o Reservatório de

Pirapora (TIPI04900) e segue até o Reservatório de Rasgão (TIRG02900). Já no terceiro grupo, o Rio Jundiaí (JUNA04900) deságua no rio Tietê num ponto anterior ao TIET02400, que flui até TIET02450 e por sua vez, recebe o Rio Capivari (CPIV02700) na região próxima à confluência entre os rios Sorocaba e Tietê (Figura 18 e Figura 3) (CETESB, 2014).

Figura 18 – Análise de Coordenadas Principais realizada com a matriz de seqüenciamento em larga escala.

PCoA representando a similaridade entre os pontos avaliados. As cores indicam a qualidade da água, onde Verde= Bom; Vermelho= Ruim e Roxo= Péssima.

A análise dos Filos bacterianos observados ao longo dos pontos amostrados apresentou diferenças na abundância dos filos presentes em pontos com qualidade de água ruim e péssima dos pontos com qualidade boa (Figura 19). Filos não classificados corresponderam a 1,6% e os filos mais abundantes foram Proteobacteria (51,8%), Bacteroidetes (29,4%), Actinobacteria (5,7%) e Firmicutes (4,3%), respectivamente. Os pontos com qualidade de água boa apresentaram maiores taxas de Bacteroidetes e menores de Proteobacteria, indicando relação contrária aos pontos com qualidade de água ruim e péssima. O filo Actinobacteria seguiu os agrupamentos observados na PCoA para os pontos com qualidade ruim e péssima, apresentando maior abundância em JUNA04900, TIET02400, TIET02500 e CPIV02700 e menor em BQGU03850, TAMT04900, PINH04500, TIET04200, TIPI04900, TIRG02900, RGRA2990 e TATU04850, enquanto Firmicutes apresentou relação contrária, com maior

abundância nos pontos BQGU03850, TAMT04900, PINH04500, TIET04200, TIPI04900, TIRG02900, RGRA02990 e TATU04850 e menor em JUNA04900, TIET02400, TIET02500 e CPIV02700. Os pontos JPEP03600 e PATO02900 apresentaram níveis similares aos observados em JUNA04900, TIET02400, TIET02500 e CPIV02700 para Actinobacteria e Firmicutes. O filo Proteobacteria representou o maior e mais diversificado grupo entre os procariontes, compreendendo a maior parte das bactérias gram-negativas conhecidas e desempenha grande importância biológica, uma vez que inclui elevado número de patógenos humanos, animais e vegetais já descobertos (GUPTA, 2000). Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria são caracterizados como os grupos mais abundantes em diversos trabalhos, sendo encontradas em diferentes ambientes, incluindo ecossistemas aquáticos (BOLHUIS et al., 2014; OLIVEIRA; MARGIS, 2015; WANG et al., 2012).

Figura 19 – Abundância relativa dos Filos bacterianos.

As classes de Proteobacteria mais abundantes ao longo das amostras foram Betaproteobacteria (21,2%), Epsilonproteobacteria (18,5%) e Gammaproteobacteria (5,5%), enquanto Alphaproteobacteria e Deltaproteobacteria juntas, representaram 6,5% no total de amostras (Figura B2 - em anexo), Korajkic et al. (2015) em seu trabalho com águas inoculadas com esgotos também observaram níveis altos destas classes. Embora Epsilonproteobacteria tenha sido mais abundante em seus resultados, seguida por Gammaproteobacteria e

Betaproteobacteria, já Liu et al. (2012b) trabalharam com águas do rio Dongjiang, na China, e observaram Alpha, Beta e Gammaproteobacteria como os filos mais abundantes, seguidos por Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia e Firmicutes.

As classes Flavobacteriia (10,1%), Bacteroidia (8,1%), Cytophagia (6,4%) e Sphingobacteriia (4,7%) representaram o filo Bacteroidetes (Figura B3 – em anexo), enquanto o filo Actinobacteria foi representado basicamente pela classe de mesmo nome, correspondendo a 5,7% do total (Figura B4 – em anexo). Por fim, o filo Firmicutes foi representado pelas classes Clostridia (3,6%), Bacilli (0,4%) e Erysipelotrichi (0,4%) (Figura B5 – em anexo). A classe Cytophagia apresentou abundância mais elevada em pontos com qualidade de água boa, enquanto Clostridia foi mais abundante em pontos com qualidade de água ruim e péssima. Zhou et al. (2014) descrevem a classe Cytophagia como fermentativa acidogênica e as bactérias pertencentes a este grupo são descritas entre as mais abundantes no processo de hidrólise e fermentação de matéria orgânica, frequentemente relacionadas à remoção de nitrogênio e fósforo (WEISSBRODT et al., 2014; WU et al., 2013), tendo sido observadas em alta densidade também por Llorens-Marès; Auguet e Casamayor (2012), em seu trabalho com micro-organismos dos sedimentos de ambientes aquáticos oligotróficos.

Embora seja quase impossível determinar a fisiologia de uma Classe bacteriana, pela ampla diversidade metabólica dos micro-organismos, diversos gêneros da classe Clostridia são descritos como hidrolisadores anaeróbios primários ou secundários e são amplamente encontrados em ambientes com baixa concentração de oxigênio como lodos, sedimentos e reatores de biogás (ČATER et al., 2015; KRAUSE et al., 2008; PENG et al., 2014; TOUROVA et al., 2014), este fato poderia explicar maior abundância deste grupo entre as amostras com qualidade de água ruim, cujos níveis de oxigênio dissolvido são menores aos observados para os pontos com qualidade de água boa.

Com relação às ordens de bactérias encontradas nas amostras, foi observado um efeito do local, sendo observada uma maior similaridade entre os pontos JPEP03600 e PATO02900 (com qualidade de água boa) e o terceiro grupo descrito na PCoA, composto pelos pontos JUNA4900, TIET2400, TIET2500 e CPIV2700 que apresentaram baixa abundância das ordens Campylobacterales, Bacteroidales e Clostridiales e alta abundância de Burkholderiales e Actinomycetales, embora tenham demonstrado diferenças de acordo com a qualidade da água para as ordens Cytophagales (em maior abundância entre os pontos limpos) e Rhodocyclales (mais abundante entre os pontos sujos). O segundo agrupamento, composto pelos pontos BQGU03850, TAMT04900, PINH04500, TIET04200, TIPI04900, TIRG02900, RGRA02990 e TATU04850 demonstrou relação inversa, apresentando maior abundância das ordens

Campylobacterales, Bacteroidales e Clostridiales e menor de Burkholderiales e Actinomycetales (Figura 20), 5,4% das sequências não foram classificadas ao nível de ordem. Os grupos Campylobacterales, Bacteroidales e Clostridiales são descritos como grupos taxonômicos associados às comunidades fecais devido a elevada concentração de organismos pertencentes à estes grupos em fezes de mamíferos e suas evidências de co-evolução com hospedeiros animais (HARWOOD et al., 2014; HELLEIN et al., 2011; KORAJKIC et al., 2014; 2015), este fato justifica a elevada amostragem destes grupos entre os pontos pertencentes à parte superior da bacia do Rio Tietê, localizados mais próximos ou inseridos na Região Metropolitana de São Paulo. Estes pontos apresentam o maior adensamento populacional do estado e despeja diariamente grandes quantidades de esgoto doméstico nos afluentes do rio, com exceção do ponto RGRA02900 que se localiza mais ao norte e apresentou níveis menores de Campylobacterales e maiores de Burkholderiales e do ponto TATU04850, no Ribeirão Tatu, que também se localiza em região mais afastada dos demais e apresentou níveis ainda maiores de Campylobacterales. O Ribeirão Tatu cobre 75% da área urbana de Limeira, cidade com a maior concentração de produção de máquinas-ferramenta da América Latina, maior indústria refinadora de açúcar da América do Sul, grande destaque na produção de sucos cítricos, glutamato monossódico e um número significativo de indústrias voltadas para a produção de jóias, semi-jóias e bijuterias, resultando em grande contaminação orgânica e química (FAZZA, 2007).

Burkholderiales é descrita por Korajkic et al. (2015) como parte da comunidade habitual de ambientes aquáticos e pode ser frequentemente observada em grande abundância em estudos avaliando comunidades de sistemas aquáticos (CRESPO-MEDINA et al., 2014; FUKUSHIMA et al., 2015; STALEY et al., 2015; WANG et al., 2012) enquanto Rhodocyclales, caracterizada como a quinta ordem mais abundante no total de amostras (8%) e predominantemente observada em pontos com qualidade de água ruim ou péssima, abrange o grupo das bactérias relacionadas ao Rhodocyclus da subclasse 2 de Betaproteobacteria que são sugeridas como as responsáveis primárias pela remoção de fósforo do ambiente (BOND et al., 1995).

A abundância relativa das famílias bacterianas está apresentada na figura B6 (em anexo) e apresenta tendência similar à observada para as ordens. Para este nível taxonômico 14,2% das sequências não puderam ser classificadas.

Figura 20- Abundância relativa das Ordens bacterianas observadas.

Estão representados os percentuais das ordens mais abundantes ao longo dos pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom.

As figuras 21A e 22A apresentam os gêneros microbianos mais abundantes para as temporadas 2013 e 2014 e corroboram com os agrupamentos apresentados pelas PCoA's demonstrados nas figuras 21B e 22B, respectivamente. A abundância relativa dos gêneros seguiu os agrupamentos descritos para a PCoA da figura 18, com separação dos pontos localizados na parte superior da bacia do rio Tietê (BQGU03850, TAMT04900, PINH04500, TIET04200, TIPI04900, TIRG02900) juntamente com TIRG02900 e RGRA02990 dos demais pontos amostrados, enquanto os pontos localizados mais ao norte (JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700) apresentaram maior similaridade aos pontos com qualidade de água boa (JPEP03600 e PATO02900). Os gêneros *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Cloacibacterium*, *Prevotella* e *Sulfurospirillum*, apresentaram maior abundância entre os pontos com qualidade de água ruim e péssima, muitos deles com prevalência entre os pontos localizados na parte superior da Bacia do rio Tietê juntamente com TIRG02900 e RGRA02990, já o gênero "*Candidatus Rodoluna*" foi mais abundante entre os pontos com qualidade de água boa e embora os pontos JPEP03600 e PATO02900, com qualidade de água boa e os pontos JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700, com qualidade ruim e péssima, tenham apresentado semelhanças com relação à abundância elevada dos gêneros *Flavobacterium*, *Limnohabitans*, *Polynucleobacter* e *Sediminibacterium* e menor abundância para *Arcobacter*, o

gênero *Mycobacterium* foi observado em grande abundância apenas entre os pontos JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700.

Figura 21- Abundancia relativa dos Gêneros bacterianos e distribuição dos pontos em 2013.

Em A estão representados os percentuais dos gêneros mais abundantes ao longo dos pontos avaliados e em B os agrupamentos por PCoA observados para a temporada 2013. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Boa. Em B a qualidade da água está representada pela cor dos *plots*, onde Roxo= Péssima; Vermelho= Ruim e Verde= Boa.

Os gêneros *Arcobacter* com *Sulfurospirillum* e *Bacteroides* com *Prevotella*, observados em maior abundância nos pontos com qualidade de água inferior, pertencem às ordens Campylobacterales e Bacteroidales, respectivamente, ambas previamente descritas como indicadoras de contaminação fecal (HARWOOD et al., 2014; HELLEIN et al., 2011; KORAJKIC et al., 2014; 2015), não obstante, bactérias destes gêneros podem ainda representar interesse médico, sendo caracterizadas como patógenos de humanos e animais, causando infecções como otite, sinusite, do trato respiratório, sistema nervoso, central, do trato abdominal e urogenital. Muitas delas apresentando microaerofilia, o que justifica sua baixa abundância nos pontos com qualidade de água boa, cujos níveis de oxigênio dissolvido são elevados e o despejo de esgotos domésticos e industriais é reduzido (ALAUZET et al., 2010; LANCASTER; SIMON, 2002; LEHNER; TASARA; STEPHAN, 2005; LUIJTEN et al., 2003; WEXLER, 2007).

O gênero *Cloacibacterium*, o qual foi descrito em 2006 a partir de um isolado de esgoto doméstico (ALLEN et al., 2006) apresentou maior prevalência em pontos com qualidade de água ruim e péssima. Este gênero é descrito como parte da comunidade presente em intestinos de animais de sangue quente e marinhos, sendo frequentemente encontrados em lodos, córregos e rios contaminados (HUANG et al., 2014; HYUN et al., 2014; MANN et al., 2014;

URBANIAK et al., 2014). Já os micro-organismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, observado em abundância entre JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700, são descritos como os principais agentes causadores de linfadenite granulomatosa, inflamação intestinal crônica em ruminantes, tuberculose e hanseníase (EVERMAN et al., 2015; MANN et al., 2014; MENDUM et al., 2015; POOJA et al., 2014).

Flavobacterium, *Limnohabitans* e *Polynucleobacter*, em maior abundância nos pontos com qualidade de água boa com JUNA04900, TIET02400, TIET02450 e CPIV02700, são descritos como integrantes de sedimentos e ambientes aquáticos não perturbados, compreendendo parte do bacterioplankton. Bactérias do gênero *Flavobacterium* são largamente encontradas em ambientes aquáticos dulcícolas, sendo algumas espécies, relacionadas à doenças infecciosas em peixes de águas temperadas, também encontradas em ambientes antárticos (MCCAMMON; BOWMAN, 2000; STARLIPER, 2011), já *Limnohabitans*, descritas como importantes micro-organismos nos ecossistemas aquáticos devido sua alta capacidade de absorção dos substratos e crescimento, podem ser encontradas nas regiões de nêuston, epilímnio e hipolímnio, demonstrando sua capacidade em habitar tanto ambientes ricos em oxigênio quanto ambientes anóxicos (BUCK et al., 2009; HÖRTNAGL et al., 2010; KASALICKÝ et al., 2013; SALCHER; PERNTHALER; POSCH, 2010; SIMEK et al., 2001), por fim, o gênero *Polynucleobacter* assim como *Limnohabitans*, é representado por bactérias anaeróbias facultativas e representa parte importante do bacterioplankton, sendo encontrado em sistemas de água doce, como lagos, lagoas e córregos, também reportado como endossimbionte de ciliados dulcícolas (HAHN et al., 2011; 2012; JEZBERA et al., 2011; VANNINI et al., 2007), diferente dos anteriores, o gênero *Sediminibacterium* é um gênero bacteriano mais recente, descrito em 2008 por Qu e YUAN (2008) com bactérias tipo isoladas de sedimentos eutróficos. Compreende espécies presentes em diversos ambientes naturais e artificiais, sendo encontradas em solos, sedimentos eutróficos, lodo ativado e rios oligotróficos (AYARZA; MAZZELLA; ERIJMAN, 2015; KANG et al., 2014; KIM et al., 2013b).

“*Candidatus Rodoluna*” apresentou maior abundância entre os pontos com qualidade de água boa (JPEP03600 e PATO02900). Este gênero abrange bactérias do bacterioplankton e é bastante recente, descrito por Hahn et al. (2014) com bactérias isoladas de um lago de água doce, embora já tenha sido proposto anteriormente pelo mesmo autor, com outros representantes, também de ambientes dulcícolas (HAHN, 2009). São bactérias aeróbias, o que explica sua ausência nos pontos com qualidade de água ruim e péssima, onde os níveis de oxigênio dissolvido tendem a ser menores.

A figura B7 (em anexo) apresenta os gêneros mais abundantes comparados por temporadas e reforça a diferença na estruturação das comunidades avaliadas entre os períodos de 2013 e 2014.

Figura 22- Abundancia relativa dos Gêneros bacterianos e distribuição dos pontos em 2014.

Em A estão representados os percentuais dos gêneros mais abundantes ao longo dos pontos avaliados e em B os agrupamentos por PCoA observados para a temporada 2014. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom. Em B a qualidade da água está representada pela cor dos *plots*, onde Roxo= Péssima; Vermelho= Ruim e Verde= Boa.

A figura 23 apresenta os gêneros raros observados apenas em pontos com qualidade de água boa. *Allochromatium*, *Sphingomonas* e *Spirochaeta* foram os mais abundantes ou frequentes entre as amostras, sendo o gênero *Allochromatium*, representado por cerca de cinco espécies isoladas a partir de água doce, água salobra ou habitats marinhos, muitas delas fototróficas obrigatórias (WEISSGERBER et al., 2011), já o gênero *Sphingomonas*, representa maior diversidade fisiológica, ecológica e filogenética e possui representantes em diferentes ambientes, sua amostragem apenas em pontos com qualidade de água limpa pode ser explicada por sua aerofilia obrigatória (KAMPFER et al., 2015; MARBJERG; GAINI; JUSTESEN, 2015; ZHU et al., 2015), enquanto o gênero *Spirochaeta*, assim como *Sphingomonas*, é composto por espécies capazes de habitar diferentes ambientes, sendo descritas em intestinos de cupins e em sedimentos hipersalinos, marinhos e dulcícolas, abrigando inclusive espécies termófilas e psicrófilas, com grande maioria caracterizada como anaeróbias estritas ou facultativas (AKSENOVA et al., 1992; DRÖGE et al., 2006; LILBURN et al., 2001; MIYAZAKI et al., 2014; SHIVANI et al., 2015; ZHILINA et al., 1996). Foi observada uma baixa distribuição deste gênero entre as amostras (0,1% em cada ponto) devendo estar relacionada à ocorrência ocasional advinda dos sedimentos dos ambientes amostrados.

Adicionalmente, bactérias pertencentes aos grupos *Azospirillum*, *Cellvibrio* e *Nitrospira* são descritas como importantes micro-organismos ambientais relacionados ao ciclo do nitrogênio, realizando importante papel em processos como a fixação, oxidação e nitrificação e embora encontradas em baixa abundância, podem estar realizando processos fisiológicos fundamentais para a manutenção dos ambientes avaliados pelos pontos com melhor qualidade de água (KOCH et al., 2014; KOUL et al., 2015; SUAREZ et al., 2014).

Figura 23- Gêneros raros observados em pontos limpos.

Estão representados os percentuais dos gêneros raros observados apenas em pontos com qualidade de água boa. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem.

Os gêneros presentes em 6 ou mais pontos com qualidade de água ruim ou péssima mas ausentes em pontos com qualidade de água boa, estão apresentados na figura 24. Com exceção de *Azospira*, *Sulfuricurvum*, *Rheinheimera* e *Propionicimonas*, que segundo dados da literatura representam bactérias ambientais comumente encontradas em solos, sedimentos, águas ou em associação com plantas. Todos estes gêneros possuem representantes descritos como simbioses de animais homeotérmicos, compondo parte da comunidade do trato gastrointestinal ou atuando como patógenos oportunistas (BAE et al., 2007; CHEN et al., 2015; DERRIEN et al., 2004; ELOE-FADROSH et al., 2015; FERRARIO et al., 2014; HARWOOD et al., 2014; KIM et al., 2014; LEE; HAN; YIM, 2015; LI et al., 2015; LINDH et al., 2015; MANN et al., 2014; NIELSEN et al., 2012; QIN et al., 2015), indicando contaminação fecal e reforçando os dados sobre a má qualidade dos pontos avaliados, acarretada pelo despejo diário de grande quantidade de esgotos não tratados nos afluentes do rio Tietê.

Figura 24- Gêneros raros observados apenas em pontos sujos.

Estão representados os percentuais dos gêneros raros observados em 6 ou mais pontos com qualidade de água ruim mas ausentes nos pontos com qualidade de água boa. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo e R= Ruim.

As diferenças observadas na estruturação das comunidades de pontos limpos e sujos são esperadas, devido aos vários níveis de contaminação por diferentes compostos despejados diariamente nos afluentes, resultando na colonização dos diferentes grupos bacterianos capazes de habitá-los. A presença e abundância de alguns desses grupos está frequentemente relacionada aos níveis de nutrientes como N, P e oxigênio dissolvido, por exemplo. Compostos nitrogenados, cada vez mais despejados no ambiente devido ao crescimento econômico e populacional acabam atingindo as águas doce, subterrâneas e marinhas e causam a deterioração contínua desses ecossistemas, levando à eutrofização (GALLOWAY et al., 2008; OTAWA et al., 2006; QIN et al., 2010). Os principais fatores que levam à eutrofização podem ser divididos em 3 categorias: 1- fatores físico naturais como temperatura e incidência luminosa ideais; 2- fatores químicos como concentração de nutrientes (principalmente N e P) e 3- fatores biológicos como composição e estrutura do ecossistema aquático, levando ao crescimento descontrolado de cianobactérias e algas eucarióticas que se utilizam dos altos níveis da matéria orgânica, multiplicando-se descontroladamente no ambiente.

A ocorrência da eutrofização pode ainda ter influência de outros fatores como topografia, localização geográfica, morfologia do aquífero e ocorrência industrial regional (CONLEY, 2000; JIANG et al., 2011). O passo seguinte, e mais extremo, é a estagnação e “morte do ambiente”, causada pela queda dos níveis de oxigênio gerada como consequência do crescimento excessivo seguido do esgotamento dos nutrientes e da morte dos organismos fototróficos. Além disso, a penetração da luz e consequentemente, a geração de oxigênio por fotossíntese, são

diminuídas com o aumento da turbidez. A principal fonte de nitrogênio e fósforo em estações de tratamento de esgotos, por exemplo, provém de matéria fecal, resíduos industriais e produtos de limpeza como detergentes sintéticos (ARVIN; JENKINS, 1985) e a descontaminação por desnitrificação tradicional ocorre em condições anaeróbicas ou condições anóxicas (devido a inibição gerada pela presença do oxigênio na reação que utiliza nitrato ou nitrito como aceptor final de elétrons) através de uma sequência de intermediários (nitrato, nitrito, óxido nítrico e óxido nitroso), finalmente terminando com a liberação de gás nitrogênio (ADAV et al., 2010; KASPAR, 1982; VAN RIJN et al., 2006; WAKI et al., 2009), embora existam também bactérias desnitrificadoras aeróbicas, capazes de utilizar tanto nitrato quanto oxigênio como aceptor de elétrons (HUANG et al., 2015).

Após grandes discussões sobre qual nutriente é o principal responsável por limitar a produtividade em lagos e rios, e sabendo-se que alguns micro-organismos como as Cyanobactérias diazotróficas são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, pesquisadores descrevem o fósforo como o elemento chave para o controle da eutrofização (ANSARI et al., 2011; KORTSTEE et al., 1994; NIXON et al., 1996). Casos bem sucedidos de controle da eutrofização em águas doce envolvem primeiramente, a redução na entrada de fósforo de fontes externas e a reciclagem dos níveis internos presentes nos sedimentos (ANSARI et al., 2011; WITHERS; JARVIE, 2008). Como muitos municípios dependem dos rios para o abastecimento de água potável, o excesso de nutrientes pode resultar no aumento dos custos no tratamento, principalmente pelo encurtamento da vida útil dos filtros, além disso, “blooms” de algas e cianobactérias podem causar problemas com odor e sabor e elevar os níveis de cianotoxinas na água (DAVIS; KOOP, 2006; MAIER et al., 2001). Regiões costeiras captadoras de grandes rios que deságuam no mar também são afetadas pela eutrofização, que apresenta efeitos graves sobre a qualidade das águas através da mudança e aumento nas taxas de nutrientes destes ambientes (WEHR; DESCY, 1998). Por fim, o controle da eutrofização dos rios está principalmente relacionado à interligação das práticas de uso da terra com as concentrações de nutrientes liberados nos aquíferos, incluindo tanto as fontes pontuais quanto difusas (DODDS, 2006; JARVIE et al., 2012).

Os efluentes de esgoto humano e pecuária, por exemplo, podem ser tratados pelos métodos terciários disponíveis como instalações para desnitrificação e precipitação de fósforo, reduzindo as cargas de N e P despejadas nos ambientes lóticos (GARNIER et al., 2005; MCINTYRE et al., 2003). No entanto, as fontes difusas de nutrientes, como a deposição atmosférica e o escoamento de terras agrícolas, continuam representando fatores difíceis de controlar (FRY et al., 2011). Para as grandes bacias com aportes de nutrientes vindos

predominantemente de fontes difusas, reduções significativas na carga de nutrientes exigiria modificação em larga escala das práticas de uso da terra, tais como faixas de proteção ciliares, terraceamento de áreas cultiváveis e o uso apenas de quantidades estritamente necessárias de fertilizantes, que seriam eficazes como um objetivo a longo prazo (LIU et al., 2012a).

O controle da entrada de nutrientes depositados nos sedimentos somado ao controle da descarga proveniente da captação acelera a recuperação dos sistemas eutrofizados (WEHR; DESCY, 1998). Assim como a aeração, que também representa uma estratégia importantíssima para a recuperação destes ambientes, uma vez que o oxigênio dissolvido é um dos parâmetros que mais afetam o comportamento ambiental dos rios, devido aos processos como a respiração da vida aquática, biodegradação da matéria orgânica nos sedimentos e uma série de outras reações químicas que consomem oxigênio e reduzem o oxigênio dissolvido. Podendo ainda minimizar a liberação de fósforo, ferro, manganês e sulfetos dos sedimentos profundos e diminuir o acúmulo de matéria orgânica não decomposta e compostos dependentes de oxigênio, como amônia. Não obstante, na presença de oxigênio os fosfatos solúveis se ligam rapidamente a outros minerais (geralmente óxido de ferro), e deixam de estar disponíveis para as plantas. Quando o oxigênio não está presente os óxidos de ferro se tornam mais solúveis e os fósforos ligados também entram na coluna d'água (TEKILE; KIM; KIM, 2015). Tais condições são comuns na maioria dos grandes rios do mundo e nem sempre é fácil identificar as principais causas da eutrofização. Informações sobre a relevância ecológica das fontes e como elas são modificadas pelos processos nos aquíferos são necessárias para a determinação precisa das estratégias de redução do despejo nas bacias hidrográficas (WITHERS; JARVIE, 2008).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com base na matriz de T-RFLP e o sequenciamento em larga escala por MiSeq – Illumina das comunidades microbianas presentes na Bacia do Rio Tietê, juntamente com a avaliação dos parâmetros físico-químicos presentes, permitiram concluir que:

- De acordo com as curvas de rarefação o esforço amostral foi satisfatório para a avaliação da comunidade bacteriana do Rio Tietê;
- A abundância do filo Bacteroidetes foi maior em pontos com qualidade de água boa enquanto Proteobacteria foi apresentado em maior abundância para pontos com qualidade ruim e péssima;
- A estruturação da comunidade bacteriana do Rio Tietê foi primariamente dependente do local e secundariamente da qualidade da água;
- A estruturação da comunidade bacteriana do Rio Tietê é dependente da época de amostragem, associada ao local de amostragem e a fatores físico-químicos da água;
- A temperatura foi um fator determinante na riqueza e diversidade bacteriana do Rio Tietê;
- A presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal nos pontos com qualidade de água ruim e péssima é resultado da degradação destes ambientes e salienta a necessidade de políticas públicas para a descontaminação dos mesmos.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAM, W. R.; MACEDO, A. J.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tietê River downstream of São Paulo in Brazil. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 35, n. 4, p. 339–347, 2007.
- ADAV, S. S.; LEE, D. J.; LAI, J. Y. Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 773–778, 2010.
- AKSENOVA, H. Y.; RAINEY, F. A.; JANSSEN, P. H.; ZAVARZIN, G. A.; MORGAN, H. W. *Spirochaeta thermophila* sp. nov., an Obligately Anaerobic, Polysaccharolytic, Extremely Thermophilic Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 175–177, 1992.
- ALAUZET, C.; MORY, F.; TEYSSIER, C.; HALLAGE, H.; CARLIER, J. P.; GROLLIER, G.; LOZNIIEWSKI, a. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 60–64, 2010.
- ALLEN, T. D.; LAWSON, P. A.; COLLINS, M. D.; FALSEN, E.; TANNER, R. S. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family Flavobacteriaceae isolated from municipal wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1311–1316, 2006.
- ALONSO-SÁEZ, L.; DÍAZ-PÉREZ, L.; MORÁN, X. A. G. The hidden seasonality of the rare biosphere in coastal marine bacterioplankton. **Environmental Microbiology**, p. 1–29, 2015.
- ALTERMATT, F.; SEYMOUR, M.; MARTINEZ, N. River network properties shape a diversity and community similarity patterns of aquatic insect communities across major drainage basins. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 2249–2260, 2013.
- ANSARI, A. A.; GILL, S. S.; LANZA, G. R.; RAST, W. **Eutrophication: causes, consequences and control**. New York: Springer, 2011. 394 p.
- ARVIN, E.; JENKINS, D. Biological removal of phosphorus from wastewaters. **Critical Reviews Environmental Control**, v. 15, p. 25–64, 1985.
- AYARZA, J. M.; MAZZELLA, M. A.; ERIJMAN, L. Expression of stress-related proteins in *Sediminibacterium* sp. growing under planktonic conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 1–7, 2015.
- AZEVEDO, J. L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAE, H. S.; RASH, B. A.; RAINEY, F. A.; NOBRE, M. F.; TIAGO, I.; DA COSTA, M. S.; MOE, W. M. Description of *Azospira restricta* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from groundwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1521–1526, 2007.

BESEMER, K.; MOESENEDER, M. M.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J.; PEDUZZI, P. Complexity of Bacterial Communities in a River-Floodplain System Edited by Foxit Reader. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 2, p. 609–620, 2007.

BESEMER, K.; SINGER, G.; QUINCE, C.; BERTUZZO, E.; SLOAN, W.; BATTIN, T. J. Headwaters are critical reservoirs of microbial diversity for fluvial networks. **Proceedings of The Royal Society**, v. 280, p. 1–8, 2013.

BILLER, S. J.; BERUBE, P. M.; LINDELL, D.; CHISHOLM, S. W. Prochlorococcus: the structure and function of collective diversity. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2015.

BOLHUIS, H.; SCHLUEPMANN, H.; KRISTALIJN, J.; SULAIMAN, Z.; MARSHALL, D. J. Molecular analysis of bacterial diversity in mudflats along the salinity gradient of an acidified tropical Bornean estuary (South East Asia). **Aquatic Biosystems**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2014.

BOND, P. L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1910–1916, 1995.

BREIDENBACH, B.; CONRAD, R. Seasonal dynamics of bacterial and archaeal methanogenic communities in flooded rice fields and effect of drainage. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–16, 2015.

BUCK, U.; GROSSART, H. P.; AMANN, R.; PERNTHALER, J. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1854–1865, 2009.

BYAPPANAHALLI, M. N.; NEVERS, M. B.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z. R.; HARWOOD, V. J. Enterococci in the environment. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 76, n. 4, p. 685–706, 2012.

ÇARDAK, M.; ÖZGÜR ÖZBEK, E.; KEBAPÇIOĞLU, T. Seasonal abundance and diversity of culturable heterotrophic bacteria in relation to environmental factors in the Gulf of Antalya, Eastern Mediterranean, Turkey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 569–582, 2015.

ČATER, M.; FANEDL, L.; MALOVRH, Š.; MARINŠEK LOGAR, R. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 261–269, 2015.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. Série de relatório, 2 e 3.** São Paulo: CETESB, 1995. 286 p.

CETESB. **Estabelecimento de valores de referência de qualidade e de intervenção para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. documentos ambientais 1 e 2.** São Paulo: CETESB, 1999.

CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo.** São Paulo: CETESB, 2001. 73 p.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.** São Paulo: CETESB, 2012. 370 p.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.** São Paulo: CETESB, 2014. 434 p.

CHEN, N.; YANG, J.-S.; QU, J.-H.; LI, H.-F.; LIU, W.-J.; LI, B.-Z.; WANG, E. T.; YUAN, H.-L. Sediment prokaryote communities in different sites of eutrophic Lake Taihu and their interactions with environmental factors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 883–896, 2015.

CHOW, C.-E. T.; SACHDEVA, R.; CRAM, J. A.; STEELE, J. A.; NEEDHAM, D. M.; PATEL, A.; PARADA, A. E.; FUHRMAN, J. A. Temporal variability and coherence of euphotic zone bacterial communities over a decade in the Southern California Bight. **The ISME journal**, v. 7, n. 12, p. 1–15, 2013.

COMTE, J.; DEL GIORGIO, P. A. Composition influences the pathway but not the outcome of the metabolic response of bacterioplankton to resource shifts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1–9, 2011.

CONLEY, D. J. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management. **Hydrobiologia**, v. 410, p. 87–96, 2000.

CONNOR, E. F.; HAFERNIK, J.; LEVY, J.; MOORE, V. L.; RICKMAN, J. K. Insect conservation in an urban biodiversity hotspot: The San Francisco Bay Area. **Journal of Insect Conservation**, v. 6, p. 247–259, 2002.

CRESPO-MEDINA, M.; TWING, K. I.; KUBO, M. D. Y.; HOEHLER, T. M.; CARDACE, D.; MCCOLLOM, T.; SCHRENK, M. O. Insights into environmental controls on microbial communities in a continental serpentinite aquifer using a microcosm-based approach. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–9, 2014.

CRUMP, B. C.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; KLING, G. W. Microbial diversity in arctic freshwaters is structured by inoculation of microbes from soils. **The ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1629–1639, 2012.

DAVIS, J. R.; KOOP, K. Eutrophication in Australian rivers, reservoirs and estuaries - A southern hemisphere perspective on the science and its implications. **Hydrobiologia**, v. 559, n. 1, p. 23–76, 2006.

DELONG, E. F.; FRANKS, D. G.; ALLDREDGE, A. L. Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. **Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 5, p. 924–934, 1993.

DERRIEN, M.; VAUGHAN, E. E.; PLUGGE, C. M.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1469–1476, 2004.

DEVKOTA, B.; IMBERGER, J. Upper and Middle Tiete River Basin dam-hydraulic system, travel time and temperature modeling. **Journal of Hydrology**, v. 475, p. 12–25, 2012.

DODDS, W. K. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. **Limnology and Oceanography**, v. 51, p. 671–680, 2006.

DRÖGE, S.; FRÖHLICH, J.; RADEK, R.; KÖNIG, H. *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 392–397, 2006.

DUMESTRE, J. F.; CASAMAYOR, E. O.; MASSANA, R.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 26, n. 3, p. 209–221, 2001.

DURHAM, B. P.; SHARMA, S.; LUO, H.; SMITH, C. B.; AMIN, S. A.; BENDER, S. J.; DEARTH, S. P.; VAN MOOY, B. A. S.; CAMPAGNA, S. R.; KUJAWINSKI, E. B.; ARMBRUST, E. V.; MORAN, M. A. Cryptic carbon and sulfur cycling between surface ocean plankton. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. 453–457, 2015.

ELOE-FADROSH, E. A.; BRADY, A.; CRABTREE, J.; DRABEK, E. F.; MA, B.; MAHURKAR, A.; RAVEL, J.; HAVERKAMP, M.; FIORINO, A.; BOTELHO, C.; ANDREYEVA, I.; HIBBERD, P. L.; FRASER, M. Functional Dynamics of the Gut Microbiome in Elderly People during Probiotic Consumption. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2015.

EVERMAN, J. L.; ECKSTEIN, T. M.; ROUSSEY, J.; COUSSENS, P.; BANNANTINE, J. P.; BERMUDEZ, L. E. Characterization of the inflammatory phenotype of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using a novel cell culture passage model. **Microbiology**, p. 1–37, 2015.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, p. 175–185, 1998.

FAZZA, E. V. **Avaliação da água e do sedimento das microbacias dos ribeirões Graminha e águas da serra da cidade de Limeira - SP**. 2007. 168 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade de Campinas, 2007.

FERRARIO, C.; TAVERNITI, V.; MILANI, C.; FIORE, W.; LAUREATI, M.; NONI, I. De; STUKNYTE, M.; CHOUAIA, B.; RISO, P.; GUGLIELMETTI, S. Modulation of Fecal Clostridiales Bacteria and Butyrate by Probiotic Intervention with *Lactobacillus paracasei* DG Varies among Healthy Adults. **The Journal of Nutrition**, p. 1787–1796, 2014.

FINN, D. S.; BONADA, N.; MÚRRIA, C.; HUGHES, J. M. Small but mighty: headwaters are vital to stream network biodiversity at two levels of organization. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 30, n. 4, p. 963–980, 2011.

FORYS, E. A.; ALLEN, C. R.; WOJCIK, D. P. Influence of the proximity and amount of human development and roads on the occurrence of the red imported fire ant in the lower Florida Keys. **Biological Conservation**, v. 108, p. 27–33, 2002.

FREDRIKSSON, N. J.; HERMANSSON, M.; WILÉN, B. Tools for T-RFLP data analysis using Excel. **BMC Bioinformatics**, v. 15, p. 1–18, 2014.

FRY, B.; ROGERS, K.; BARRY, B.; BARR, N.; DUDLEY, B. Eutrophication indicators in the Hutt River Estuary, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 45, n. 4, p. 665–677, 2011.

FUKUSHIMA, J.; TOJO, F.; ASANO, R.; KOBAYASHI, Y.; SHIMURA, Y.; OKANO, K.; MIYATA, N. Complete Genome Sequence of the Unclassified Iron-Oxidizing, Chemolithoautotrophic Burkholderiales Bacterium GJ-E10, Isolated from an Acidic River. **Genome Announcements**, v. 3, n. 1, p. 5–6, 2015.

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J. R.; MARTINELLI, L. A.; SEITZINGER, S. P.; SUTTON, M. A. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5878, p. 889–892, 2008.

GARNIER, J.; NÉMERY, J.; BILLEN, G.; THÉRY, S. Nutrient dynamics and control of eutrophication in the Marne River system: Modelling the role of exchangeable phosphorus. **Journal of Hydrology**, v. 304, p. 397–412, 2005.

GUPTA, R. S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 367–402, 2000.

HAHN, M.; SCHMIDT, J.; TAIPALE, S. J.; DOOLITTLE, W. F.; KOLL, U. *Rhodoluna laticola* gen. nov., sp. nov., a planktonic freshwater bacterium with stream-lined genome. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 3254–3263, 2014.

HAHN, M. W. Description of seven candidate species affiliated with the phylum Actinobacteria, representing planktonic freshwater bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 112–117, 2009.

HAHN, M. W.; LANG, E.; BRANDT, U.; SPRÖER, C. *Polynucleobacter acidiphobus* sp. nov., a representative of an abundant group of planktonic freshwater bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 788–794, 2011.

HAHN, M. W.; MINASYAN, A.; LANG, E.; KOLL, U.; SPRÖER, C. *Polynucleobacter difficilis* sp. nov., a planktonic freshwater bacterium affiliated with subcluster B1 of the genus *Polynucleobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 376–383, 2012.

HAINES, J. R.; HERRMANN, R.; LEE, K.; COBANLI, S.; BLAISE, C. Microbial population analysis as a measure of ecosystem restoration. **Biorremediation Journal**, v. 6, p. 283–296, 2002.

HALL, E. K.; COTNER, J. B. Interactive effect of temperature and resources on carbon cycling by freshwater bacterioplankton communities. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 49, p. 35–45, 2007.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9–18, 2001.

HARWOOD, V. J.; STALEY, C.; BADGLEY, B. D.; BORGES, K.; KORAJKIC, A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: Relationships between pathogens and human health outcomes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 1–40, 2014.

HELLAND-HANSEN, E.; HOLTEDAHN, T.; LIYE, K. A. **Hydropower development**. 1st ed. Trondheim: Norwegian Institute of Technology Press, 1995. 3 v. 593 p.

HELLBERG, R. S.; CHU, E. Effects of climate change on the persistence and dispersal of foodborne bacterial pathogens in the outdoor environment: A review. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–25, 2015.

HELLEIN, K. N.; BATTIE, C.; TAUCHMAN, E.; LUND, D.; OYARZABAL, O. A.; LEPO, J. E. Culture-based indicators of fecal contamination and molecular microbial indicators rarely correlate with *Campylobacter* spp. in recreational waters. **Journal of Water and Health**, v. 9, p. 695–707, 2011.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HÖRTNAGL, P.; PÉREZ, M. T.; ZEDER, M.; SOMMARUGA, R. The bacterial community composition of the surface microlayer in a high mountain lake. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 458–467, 2010.

HUANG, F.; GE, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; TIAN, H.; ZHAO, L.; HE, Y.; ZHANG, X. A fullerene colloidal suspension stimulates the growth and denitrification ability of wastewater treatment sludge-derived bacteria. **Chemosphere**, v. 108, p. 411–417, 2014.

HUANG, T.-L.; ZHOU, S.-L.; ZHANG, H.-H.; ZHOU, N.; GUO, L.; DI, S.-Y.; ZHOU, Z.-Z. Nitrogen Removal from Micro-Polluted Reservoir Water by Indigenous Aerobic Denitrifiers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8008–8026, 2015.

HYUN, D.-W.; SHIN, N.-R.; KIM, M.-S.; KIM, P. S.; KIM, J. Y.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. *Cloacibacterium haliotis* sp. nov., isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 72–77, 2014.

IBGE. **Indicadores sociais municipais : uma análise dos resultados do universo do censo demográfico 2010**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. 151 p.

IBGE. **Atlas do senso demográfico 2010**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. 1–156 p.

ILLUMINA. Illumina Sequencing Technology. **Image Rochester NY**, v. 21, p. 1–5, 2010.

ILLUMINA. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. **Illumina Inc**, p. 1–12, 2013.

ISHII, K.; FUKUI, M. Optimization of Annealing Temperature to Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3753–3755, 2001.

JARVIE, H. P.; SHARPLEY, A. N.; SCOTT, J. T.; HAGGARD, B. E.; BOWES, M. J.; MASSEY, L. B. Within-river phosphorus retention: Accounting for a missing piece in the watershed phosphorus puzzle. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 24, p. 13284–13292, 2012.

JEON, Y.-S.; PARK, S.-C.; LIM, J.; CHUN, J.; KIM, B.-S. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 60–69, 2015.

JEZBERA, J.; JEZBEROVÁ, J.; BRANDT, U.; HAHN, M. W. Ubiquity of Polynucleobacter necessarius subspecies asymbioticus results from ecological diversification. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 922–931, 2011.

JIANG, C. L.; ZHU, L. Q.; HU, X. Q.; CHENG, J. Y.; XIE, M. . **Reasons and control of eutrophication in new reservoirs**. In: Eutrophication: Causes, Consequences and Control; Berlin, Germany: Springer, 2011. p. 325–340.

JMR-ENGEORPS. **Situação dos recursos hídricos do estado de são paulo**. São Paulo: Secretaria Estadual de Saneamento e Recursos Hídricos - Coordenadoria de Recursos Hídricos, 2011. 206 p.

KAMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; MCINROY, J. A.; GLAESER, S. P. Sphingomonas zeae sp. nov., isolated from the stem of Zea mays. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 1–22, 2015.

KANG, H.; KIM, H.; LEE, B. II; JOUNG, Y.; JOH, K. Sediminibacterium goheungense sp. nov., isolated from a freshwater reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1328–1333, 2014.

KARNER, M.; HERNDL, G. J. Extracellular enzymatic activity and secondary production in free-living and marine-snow-associated bacteria. **Marine Biology**, v. 113, n. 2, p. 341–347, 1992.

KASALICKÝ, V.; JEZBERA, J.; HAHN, M. W.; ŠIMEK, K. The Diversity of the Limnohabitans Genus, an Important Group of Freshwater Bacterioplankton, by Characterization of 35 Isolated Strains. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2013.

KASPAR, H. F. Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: Detoxication mechanism. **Archives of Microbiology**, v. 133, p. 126–130, 1982.

KASTING, J. F.; SIEFERT, J. L. Life and the evolution of earth's atmosphere. **Science**, v. 296, p. 1066–1068, 2002.

KIM, J. Y.; LEE, H.; LEE, J. E.; CHUNG, M.-S.; KO, G. P. Identification of Human and Animal Fecal Contamination after Rainfall in the Han River, Korea. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 2, p. 187–194, 2013a.

KIM, M.; KIM, J.; KUEHN, L. A.; BONO, J. L.; BERRY, E. D.; KALCHAYANAND, N.; FREETLY, H. C.; BENSON, K.; WELLS, J. E. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, p. 683–694, 2014.

KIM, Y. J.; NGUYEN, N. L.; WEON, H. Y.; YANG, D. C. *Sediminibacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field, and emended descriptions of the genus *Sediminibacterium* and of *Sediminibacterium salmoneum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 905–912, 2013b.

KIRCHER, M.; STENZEL, U.; KELSO, J. Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies. **Genome biology**, v. 10, n. 8, p. R83, 2009.

KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga - Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 91–100, 2002.

KOCH, H.; GALUSHKO, A.; ALBERTSEN, M.; SCHINTLMEISTER, A.; SPIECK, E.; RICHTER, A.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation. **Science**, v. 345, p. 1052–1054, 2014.

KORAJKIC, A.; MCMINN, B. R.; SHANKS, O. C.; SIVAGANESAN, M.; FOUT, G. S.; ASHBOLT, N. J. Biotic interactions and sunlight affect persistence of fecal indicator bacteria and microbial source tracking genetic markers in the upper mississippi river. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 13, p. 3952–3961, 2014.

KORAJKIC, A.; PARFREY, L. W.; MCMINN, B. R.; BAEZA, Y. V.; VANTEUREN, W.; KNIGHT, R.; SHANKS, O. C. Changes in bacterial and eukaryotic communities during sewage decomposition in Mississippi river water. **Water Research**, v. 69, p. 30–39, 2015.

KORTSTEE, G. J. J.; APPELDOORN, K. J.; BONTING, C. F. C.; NIEL, E. W. J.; VEEN, H. W. Biology of polyphosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 137–153, 1994.

KOUL, V.; TRIPATHI, C.; ADHOLEYA, A.; KOCHAR, M. Nitric oxide metabolism and indole acetic acid biosynthesis cross-talk in *Azospirillum brasilense* SM. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 3, p. 174–185, 2015.

KRAUSE, L.; DIAZ, N. N.; EDWARDS, R. A.; GARTEMANN, K. H.; KRÖMEKE, H.; NEUWEGER, H.; PÜHLER, A.; RUNTE, K. J.; SCHLÜTER, A.; STOYE, J.; SZCZEPANOWSKI, R.; TAUCH, A.; GOESMANN, A. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 91–101, 2008.

KRISTEMANN, T.; CLASSE, T.; KOCH, C.; DANGENDORF, F.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M.; FISCHER, R. Microbial Load of Drinking Water Reservoir Tributaries during Extreme Rainfall and Runoff. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2188–2197, 2002.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 72, n. 4, p. 557–578, 2008.

KURATA, S.; KANAGAWA, T.; MAGARIYAMA, Y.; TAKATSU, K. Y.; YOKOMAKU, T.; KAMAGATA, Y. Reevaluation and Reduction of a PCR Bias Caused by Reannealing of Templates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7545–7549, 2004.

LANCASTER, C. R. D.; SIMON, J. Succinate:quinone oxidoreductases: An overview. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1553, p. 1–6, 2002.

LEE, S.-M.; HAN, H. W.; YIM, S. Y. Beneficial effects of soy milk and fiber on high cholesterol diet-induced alteration of gut microbiota and inflammatory gene expression in rats. **Food & Function**, v. 6, p. 492–500, 2015.

LEHNER, A.; TASARA, T.; STEPHAN, R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 127–135, 2005.

LI, X.; RUI, J.; XIONG, J.; LI, J.; HE, Z.; ZHOU, J.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. Functional Potential of Soil Microbial Communities in the Maize Rhizosphere. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. 1–9, 2014.

LI, Z.; WRIGHT, A.-D. G.; LIU, H.; FAN, Z.; YANG, F.; ZHANG, Z.; LI, G. Response of the Rumen Microbiota of Sika Deer (*Cervus nippon*) Fed Different Concentrations of Tannin Rich Plants. **Plos One**, v. 10, p. 1–14, 2015.

LILBURN, T. G.; KIM, K. S.; OSTROM, N. E.; BYZEK, K. R.; LEADBETTER, J. R.; BREZNAK, J. a. Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science**, v. 292, p. 2495–2498, 2001.

LINDH, M. V.; FIGUEROA, D.; SJÖSTEDT, J.; BALTAR, F.; LUNDIN, D.; ANDERSSON, A.; LEGRAND, C.; PINHASSI, J. Transplant experiments uncover Baltic Sea basin-specific responses in bacterioplankton community composition and metabolic activities. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–18, 2015.

LITCHFIELD, K.; SUMMERSGILL, B.; YOST, S.; SULTANA, R.; LABRECHE, K.; DUDAKIA, D.; RENWICK, A.; SEAL, S.; AL-SAAD, R.; BRODERICK, P.; TURNER, N. C.; HOULSTON, R. S.; HUDDART, R.; SHIPLEY, J.; TURNBULL, C. Whole-exome

sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. **Nature communications**, v. 6, p. 1–8, 2015.

LIU, L.; LIU, D.; JOHNSON, D. M.; YI, Z.; HUANG, Y. Effects of vertical mixing on phytoplankton blooms in Xiangxi Bay of Three Gorges Reservoir: Implications for management. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2121–2130, 2012a.

LIU, Z.; HUANG, S.; SUN, G.; XU, Z.; XU, M. Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 30–44, 2012b.

LLORENS-MARÈS, T.; AUGUET, J. C.; CASAMAYOR, E. O. Winter to spring changes in the slush bacterial community composition of a high-mountain lake (Lake Redon, Pyrenees). **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, p. 50–56, 2012.

LOU, D. I.; HUSSMANN, J. A.; MCBEE, R. M.; ACEVEDO, A.; ANDINO, R.; PRESS, W. H.; SAWYER, S. L. High-throughput DNA sequencing errors are reduced by orders of magnitude using circle sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 49, p. 19872–19877, 2013.

LUIJTEN, M. L. G. C.; DE WEERT, J.; SMIDT, H.; BOSCHER, H. T. S.; DE VOS, W. M.; SCHRAA, G.; STAMS, a. J. M. Description of *Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* a *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 787–793, 2003.

MAIER, H. R.; BURCH, M. D.; BORMANS, M. Flow management strategies to control blooms of the cyanobacterium, *Anabaena circinalis*, in the River Murray at Morgan, South Australia. **Regulated Rivers-Research and Management**, v. 17, n. 6, p. 637–650, 2001.

MALLIN, M. A.; WILLIAMS, K. E.; ESHAM, E. C.; LOWE, R. P. Effect of Human Development on Bacteriological Water Quality in Coastal Watersheds. **Ecological Applications**, v. 10, p. 1047–1056, 2000.

MANN, E.; DZIECIOL, M.; METZLER-ZEBELI, B. U.; WAGNER, M.; SCHMITZ-ESSER, S. Microbiomes of unreactive and pathologically altered ileocecal lymph nodes of slaughter pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 193–203, 2014.

MARBJERG, L. H.; GAINI, S.; JUSTESEN, U. S. First Report of *Sphingomonas koreensis* as a Human Pathogen in a Patient with Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1028–1030, 2015.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198–203, 2011.

MCCAMMON, S. A.; BOWMAN, J. P. Taxonomy of antarctic *Flavobacterium* species: Description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov. and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] *salegens* as *Salegentibacter salegen*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1055–1063, 2000.

MCINTYRE, N. R.; WAGENER, T.; WHEATER, H. S.; CHAPRA, S. C. Risk-based modelling of surface water quality: A case study of the Charles River, Massachusetts. **Journal of Hydrology**, v. 274, p. 225–247, 2003.

MCLELLAN, S. L.; SALMORE, A. K. Evidence for localized bacterial loading as the cause of chronic beach closings in a freshwater marina. **Water Research**, v. 37, p. 2700–2708, 2003.

MENDES, L. W.; TAKETANI, R. G.; NAVARRETE, A. A.; TSAI, S. M. Shifts in phylogenetic diversity of archaeal communities in mangrove sediments at different sites and depths in southeastern Brazil. **Research in Microbiology**, v. 163, p. 366–377, 2012.

MENDUM, T. A.; WU, H.; KIERZEK, A. M.; STEWART, G. R. Lipid metabolism and Type VII secretion systems dominate the genome scale virulence profile of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1–14, 2015.

MIYAZAKI, M.; SAKAI, S.; YAMANAKA, Y.; SAITO, Y.; TAKAI, K.; IMACHI, H. *Spirochaeta psychrophila* sp. nov., a psychrophilic spirochaete isolated from subseafloor sediment, and emended description of the genus *Spirochaeta*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2798–2804, 2014.

MOHANTY, S. R.; BHARATI, K.; DEEPA, N.; RAO, V. R.; ADHYA, T. K. Influence of heavy metals on methane oxidation in tropical rice soils. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 47, p. 277–284, 2000.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on earth and in the ocean?. **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2011.

MORTATTI, J.; DE MORAES, G. M.; PROBST, J.-L. Heavy metal distribution in recent sediments along the Tietê River basin (São Paulo , Brazil). **Geochemical Journal**, v. 46, p. 13–19, 2012.

MORTATTI, J.; HISSLER, C.; PROBST, J.-L. Heavy Metal Distribution in the Bottom Sediments Along Tietê River Basin. **Geologia USP Série Científica**, v. 10, p. 3–11, 2010.

MUNEEPEERAKUL, R.; BERTUZZO, E.; LYNCH, H. J.; FAGAN, W. F.; RINALDO, A.; RODRIGUEZ-ITURBE, I. Neutral metacommunity models predict fish diversity patterns in Mississippi-Missouri basin. **Nature**, v. 453, p. 220–222, 2008.

MUYZER, G.; TESKE, A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 165–172, 1995.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NIELSEN, J. L.; NGUYEN, H.; MEYER, R. L.; NIELSEN, P. H. Identification of glucose-fermenting bacteria in a full-scale enhanced biological phosphorus removal plant by stable isotope probing. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, p. 1818–1825, 2012.

NIXON, S. W.; AMMERMAN, J. W.; ATKINSON, L. P.; BEROUNSKY, V. M.; BILLEN, G.; BOICOURT, W. C.; BOYNTON, W. R.; CHURCH, T. M.; M., D. D.; ELMGREN, R. The fate of nitrogen and phosphorus at the land–sea margin of the north Atlantic ocean. **Biogeochemistry**, v. 35, p. 141–180, 1996.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636–5643, 1996.

OLIVEIRA, L. F. V.; MARGIS, R. The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. **Plos One**, v. 10, p. 1–11, 2015.

OSBORNE, C. A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 183–187, 2005.

OTAWA, K.; ASANO, R.; OHBA, Y.; SASAKI, T.; KAWAMURA, E.; KOYAMA, F.; NAKAMURA, S.; NAKAI, Y. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1985–1996, 2006.

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

PENG, X.; BÖRNER, R. A.; NGES, I. A.; LIU, J. Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 567–571, 2014.

POOJA, V.; VANISHREE, M.; RAVIKUMAR, S.; KONERU, A.; HUNASGI, S.; SUREKHA, R. Evaluation of the orofacial lesions in treated leprosy patients. **Jornal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 3, p. 386–389, 2014.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; MORAIS, D. K.; CLARK, I. M.; HIRSCH, P. R.; TÓTOLA, M. R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, 2014.

QIN, B.; ZHU, G.; GAO, G.; ZHANG, Y.; LI, W.; PAERL, H. W.; CARMICHAEL, W. W. A drinking water crisis in Lake Taihu, China: Linkage to climatic variability and lake management. **Environmental Management**, v. 45, n. 1, p. 105–112, 2010.

QIN, J.; YANG, T.; WANG, H.; FENG, T.; LIU, X. Potential Predictors for Serofast State after Treatment among HIV-Negative Persons with Syphilis in China : A Systematic Review and Meta-Analysis. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, n. 2, p. 155–169, 2015.

QU, J. H.; YUAN, H. L. *Sediminibacterium salmoneum* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2191–2194, 2008.

REDDY, B.; SINGH, K. M. Insights into resistome and stress responses genes in *Bubalus bubalis* rumen through metagenomic analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 6405–6417, 2014.

RICKMAN, J. K.; CONNOR, E. F. The effect of urbanization on the quality of remnant habitats for leaf-mining Lepidoptera on *Quercus agrifolia*. **Ecography**, v. 26, p. 777–787, 2003.

RIKHVANOV, E. G.; VARAKINA, N. N.; SOZINOV, D. Y.; VOINIKOV, V. K. Association of bacteria and yeasts in hot springs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4292–4293, 1999.

ROCHA, P. S.; BERNECKER, C.; STRECKER, R.; MARIANI, C. F.; POMPÊO, M. L. M.; STORCH, V.; HOLLERT, H.; BRAUNBECK, T. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1951–1959, 2011.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, n. 650, p. 3–11, 2001.

RUIZ-GONZÁLEZ, C.; PROIA, L.; FERRERA, I.; GASOL, J. M.; SABATER, S. Effects of large river dam regulation on bacterioplankton community structure. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, n. 2, p. 316–331, 2013.

SALCHER, M. M.; PERNTHALER, J.; POSCH, T. Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake. **Limnology and Oceanography**, v. 55, n. 2, p. 846–856, 2010.

SATTELY, E. S.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. **Natural product reports**, v. 25, p. 757–793, 2008.

SCHINDLER, D. W.; VALLENTYNE, J. R. **The algal bowl: overfertilization of the world's freshwaters and estuaries**. Edmonton: University of Alberta Press, 2008. v. 123, p. 334.

SCHIRMER, M.; IJAZ, U. Z.; D'AMORE, R.; HALL, N.; SLOAN, W. T.; QUINCE, C. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. **Nucleic Acids Research**, n. 7, p. 1–16, 2015.

SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORNEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 365–380, 2008.

SCOFIELD, V.; JACQUES, S. M. S.; GUIMARÃES, J. R. D.; FARJALLA, V. F. Potential changes in bacterial metabolism associated with increased water temperature and nutrient inputs in tropical humic lagoons. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

SERIANI, R.; ABESSA, D. M. S.; MOREIRA, L. B.; CABRERA, J. P. G.; SANCHES, J. Q.; SILVA, C. L. S.; AMORIM, F. A.; RIVERO, D. H. R. F.; SILVA, F. L.; FITORRA, L. S.;

CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MACCHIONE, M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Ecotoxicology and Environmental Safety In vitro mucus transportability , cytogenotoxicity , and hematological changes as non-destructive physiological biomarkers in fish chronically exposed to metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 162–168, 2015.

SHIVANI, Y.; SUBHASH, Y.; TUSHAR, L.; SASIKALA, C.; RAMANA, C. V. Spirochaeta lutea sp. nov., isolated from marine habitats and emended description of the genus Spirochaeta. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 110–114, 2015.

SIMEK, K.; PERNTHALER, J.; WEINBAUER, M. G.; DOLAN, J. R.; NEDOMA, J.; MASIN, M.; HORNAK, K.; HORNAK, K. Changes in Bacterial Community Composition and Dynamics and Viral Mortality Rates Associated with Enhanced Flagellate Grazing in a Mesoeutrophic Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2723–2733, 2001.

STALEY, C.; GOULD, T. J.; WANG, P.; PHILLIPS, J.; COTNER, J. B.; SADOWSKY, M. J. Core functional traits of bacterial communities in the Upper Mississippi River show limited variation in response to land cover. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–11, 2014.

STALEY, C.; GOULD, T. J.; WANG, P.; PHILLIPS, J.; COTNER, J. B.; SADOWSKY, M. J. Species sorting dynamics and sediment resuspension alter the core bacterial community of the Upper Mississippi River. **Microbial Ecology**, p. 435–445, 2015.

STARLIPER, C. E. Bacterial coldwater disease of fishes caused by Flavobacterium psychrophilum. **Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 2, p. 97–108, 2011.

SUAREZ, C.; RATERING, S.; KRAMER, I.; SCHNELL, S. Cellvibrio diazotrophicus sp. nov., a nitrogen-fixing bacteria isolated from the rhizosphere of salt meadow plants and emended description of the genus Cellvibrio. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 481–484, 2014.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 625–630, 1996.

TEKILE, A.; KIM, I.; KIM, J. Mini-review on river eutrophication and bottom improvement techniques, with special emphasis on the Nakdong River. **Journal of Environmental Sciences**, v. 30, p. 113–121, 2015.

THUNG, D. T.; LIGT, J. De; VISSERS, L. E. M.; STEEHOUWER, M.; KROON, M.; VRIES, P. De; SLAGBOOM, E. P.; YE, K.; VELTMAN, J. A.; HEHIR-KWA, J. Y. Mobster : accurate detection of mobile element insertions in next generation sequencing data. **Genome Biology**, v. 15, p. 1–11, 2014.

TIETÊ, C. D. B. D. A. Plano da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê. In: **Plano da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê**. 1. ed. São Paulo: Fundação de Apoio à Universidade de São Paulo, 2009. p. 201.

TOUROVA, T. P.; GRECHNIKOVA, M. A.; KUZNETSOV, B. B.; SOROKIN, D. Y. Phylogenetic diversity of bacteria in soda lake stratified sediments. **Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 869–879, 2014.

TRÜPER, H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, v. 1, p. 227–236, 1992.

URBANIAK, C.; MCMILLAN, A.; ANGELINI, M.; GLOOR, G. B.; SUMARAH, M.; BURTON, J. P.; REID, G. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2014.

VAN RIJN, J.; TAL, Y.; SCHREIER, H. J. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. **Aquacultural Engineering**, v. 34, n. 3, p. 364–376, 2006.

VANNINI, C.; PÖCKL, M.; PETRONI, G.; WU, Q. L.; LANG, E.; STACKEBRANDT, E.; SCHRALLHAMMER, M.; RICHARDSON, P. M.; HAHN, M. W. Endosymbiosis in statu nascendi: Close phylogenetic relationship between obligately endosymbiotic and obligately free-living Polynucleobacter strains (Betaproteobacteria). **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 347–359, 2007.

VANNOTE, R. L.; MINSHALL, G. W.; CUMMINS, K. W.; SEDELL, J. R.; CUSHING, C. E. The River Continuum Concept. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 37, p. 130–137, 1980.

WAKI, M.; YASUDA, T.; YOKOYAMA, H.; HANAJIMA, D.; OGINO, A.; SUZUKI, K.; YAMAGISHI, T.; SUWA, Y.; TANAKA, Y. Nitrogen removal by co-occurring methane oxidation, denitrification, aerobic ammonium oxidation, and anammox. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 977–985, 2009.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R.; AL, W. E. T. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy □ †. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WANG, Y.; SHENG, H. F.; HE, Y.; WU, J. Y.; JIANG, Y. X.; TAM, N. F. Y.; ZHOU, H. W. Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8264–8271, 2012.

WEHR, J. D.; DESCY, J.-P. Use Of Phytoplankton In Large River Management. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 741–749, 1998.

WEISSBRODT, D. G.; MAILLARD, J.; BROVELLI, A.; CHABRELIE, A.; MAY, J.; HOLLIGER, C. Multilevel correlations in the biological phosphorus removal process: From bacterial enrichment to conductivity-based metabolic batch tests and polyphosphatase assays. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111, n. 12, p. 2421–2435, 2014.

WEISSGERBER, T.; ZIGANN, Re.; BRUCE, D.; CHANG, Y.; DETTER, J. C.; HAN, C.; HAUSER, L.; JEFFRIES, C. D.; LAND, M.; MUNK, A. C.; TAPIA, R.; DAHL, C. Complete genome sequence of *Allochromatium vinosum* DSM 180. **Standasds in Genomic Sciences**, v. 5, p. 311–330, 2011.

WEXLER, H. M. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 593–621, 2007.

WITHERS, P. J. A.; JARVIE, H. P. Delivery and cycling of phosphorus in rivers: A review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 379–395, 2008.

WU, D.; SHEN, Y.; DING, A.; MAHMOOD, Q.; LIU, S.; TU, Q. Effects of nanoscale zero-valent iron particles on biological nitrogen and phosphorus removal and microorganisms in activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 262, p. 649–655, 2013.

YAN, Q.; BI, Y.; DENG, Y.; HE, Z.; WU, L.; VAN NOSTRAND, J. D.; SHI, Z.; LI, J.; WANG, X.; HU, Z.; YU, Y.; ZHOU, J. Impacts of the Three Gorges Dam on microbial structure and potential function. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–9, 2015.

YANG, X.; HUANG, S.; WU, Q.; ZHANG, R.; LIU, G. Diversity and vertical distributions of sediment bacteria in an urban river contaminated by nutrients and heavy metals. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 7, n. 6, p. 851–859, 2013.

YOHE, S.; HAUGE, A.; BUNJER, K.; KEMMER, T.; BOWER, M.; SCHOMAKER, M.; ONSONGO, G.; WILSON, J.; ERDMANN, J.; ZHOU, Y.; DESHPANDE, A.; SPEARS, M. D. Clinical Validation of Targeted Next-Generation Sequencing for Inherited Disorders. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 139, p. 204–210, 2015.

ZHILINA, T. N.; ZAVARZIN, G. A.; RAINEY, F.; KEVBRIN, V. V.; KOSTRIKINA, N. A.; LYSENKO, a M. *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the Continental Soda Lakes in Central Asia and the East African Rift. **International journal of systematic bacteriology**, v. 46, n. 1, p. 305–312, 1996.

ZHOU, Z.; QIAO, W.; XING, C.; SHEN, X.; HU, D.; WANG, L. A micro-aerobic hydrolysis process for sludge in situ reduction: Performance and microbial community structure. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 452–456, 2014.

ZHU, L.; SI, M.; LI, C.; XIN, K.; CHEN, C.; SHI, X.; HUANG, R.; ZHAO, L.; SHEN, X.; ZHANG, L. *Sphingomonas gei* sp. nov., isolated from roots of *Geum aleppicum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 1160–1166, 2015.

TABELAS EM ANEXO

Tabela A1 – Pontos de amostragem e suas localizações geográficas.

UGRHI	Cód. CETESB	Corpo Hídrico	Latitude	Longitude
5	CMDC 02900	Rio Camanducacia	22 39 42	47 00 11
5	CPIV 02700	Rio Capivari	22 59 58	47 31 52
5	JUNA 04900	Rio Jundiá	23 12 36	47 17 28
5	TATU 04850	Ribeirão Tatu	22 39 36	47 21 09
6	NASCENTE	Rio Tietê	23 34 17	45 44 9,5
6	BQGU 03850	Rio Baquirivu-Guaçu	23 28 03	46 29 16
6	PINH 04500	Rio Pinheiros	23 35 38	46 41 37
6	TAMT 04900	Rio Tamanduateí	23 31 36	46 37 56
6	TIET 04200	Rio Tietê	23 31 11	46 44 47
6	TIPI 04900	Res. de Pirapora	23 23 27	46 59 41
10	SORO 02100	Rio Sorocaba	23 28 36	47 26 29
10	TIET 02400	Rio Tietê	23 05 12	47 40 41
10	TIET 02450	Rio Tietê	22 57 26	47 49 14
10	TIRG 02900	Res. de Rasgão	23 22 58	47 01 46
13	LENS 03950	Rio Lençóis	22 30 16	48 37 20
13	JCGU 03900	Rio Jacaré-Guaçu	21 49 33	48 49 57
13	JPEP 03600	Rio Jacaré-Pepira	22 04 24	48 29 12
13	RGRA 02990	Ribeirão Grande	22 15 39	48 48 35
13	TIET 02500	Rio Tietê	22 30 26	48 32 46
16	ESGT 02050	Córrego do Esgotão	21 27 44	49 35 01
16	TIET 02600	Rio Tietê	21 45 31	48 59 39
16	TIPR 02990	Res. de Promissão	21 17 50	49 46 57
18	ISOL 02995	Ilha Solteira	20 20 44	51 20 31
19	PARN 02100	Rio Paraná	20 47 27	51 37 24
19	PATO 02900	Ribeirão dos Patos	21 19 17	49 49 20
19	TIET 02700	Rio Tietê	21 17 49	49 47 42
19	TITR 02100	Res. 3 Irmãos	21 02 54	50 28 03
19	TITR 02800	Res. 3 Irmãos	20 39 35	51 08 48

Estão representados os 28 pontos de amostragem ao longo da Bacia do Rio Tietê e suas respectivas coordenadas geográficas, organizados por UGRHI's e por ordem alfabética, não sendo necessariamente a sequência dos cursos dos rios.

Tabela A2 – Caracterização físico-química dos pontos avaliados.

	IQA		Al total		C.O.T.		Condutividade		D.B.O. 5,20		Fe dissolvido	
Cód. CETESB	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	12	14	10,3	5,7	80,9	44,7	1843	1014	120	48	0,33	0,52
TATU04850	12	16	2,0	0,4	10,1	41,9	737	561	107	52	0,70	0,30
TIRG02900	14	21	1,5	1,9	46,6	20,9	646	475	136	23	0,89	0,50
TAMT04900	15	19	2,2	2,1	90,9	28,4	733	469	162	40	2,02	0,32
TIET04200	15	15	3,9	1,5	58,8	27,2	590	448	96	31	0,76	0,97
TIPI04900	15	18	1,6	2,1	49,2	23,9	633	399	99	26	0,43	1,30
PINH04500	17	16	0,6	10,1	38,0	17,4	522	309	55	46	0,44	0,40
TIET02450	25	19	8,0	8,7	10,9	19,5	552	225	13	33	0,10	0,10
JUNA04900	27	16	3,0	0,5	24,7	64,6	359	678	47	96	0,30	0,30
TIET02400	27	19	8,5	12,8	13,7	25,4	655	264,9	14	36	0,10	0,10
CPIV02700	28	34	17,0	0,3	6,9	20,7	209	410	34	18	0,40	0,30
RGRA02990	35	31	0,4	0,4	6,1	12,3	205	230	11	11	0,69	0,82
SORO02100	47	43	0,8	1,3	9,5	8,9	123,3	156,4	7	6	0,10	0,10
LENS03950	55	61	0,3	0,4	4,1	7,6	146	196	4	3	0,48	0,74
JCGU03900	59	58	0,2	0,3	3,9	7,5	72	70,6	2	2	0,48	0,86
CMDC02900	61	50	1,3	0,6	4,8	9,1	196	142	7	8	0,50	0,30
TIET02500	74	62	0,2	0,1	4,1	6,6	230	289	3	3	0,10	0,10
JPEP03600	76	70	0,1	0,2	1,5	5,7	45	100	2	2	0,47	1,21
PATO02900	78	54	0,1	0,1	2,7	10,4	95	90	2	3	0,85	1,50
NASCENTE	85	85	NA	0,1	NA	1,0	NA	30	NA	3	NA	0,01
TIET02600	89	53	0,1	0,1	4,8	4,4	175	237	2	2	0,06	0,02
TITR02100	91	91	0,1	0,1	3,7	3,3	147	155	2	2	0,02	0,04
TITR02800	91	89	0,1	0,1	5,2	5,7	158	149,1	2	2	0,01	0,02
ESGT02050	92	59	0,1	0,1	6,8	15,7	148	159	2	11	0,06	0,13
ISOL02995	92	93	0,1	0,1	1,6	2,0	51	47	2	2	0,02	0,02
TIET02700	92	88	0,1	0,1	3,4	3,2	149	180	2	2	0,01	0,01
TIPR02990	92	90	0,1	0,1	3,7	4,0	149	173	2	2	0,04	0,02
PARN02100	93	90	0,1	0,1	2,7	1,5	78	79,3	2	2	0,02	0,02

Os pontos estão organizados de acordo com os valores obtidos para o IQA para a temporada 2013. IQA = Índice de Qualidade de Água; C.O.T.= Carbono Orgânico Total; D.B.O.= Demanda Bioquímica de Oxigênio; NA = Não Avaliado.

Continuação - Tabela A2 – Caracterização físico-química dos pontos avaliados.

	Fe total		Fósforo Total		N. Amon.		Nitrato		O.D.	
Cód. CETESB	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	3,9	2,6	2,4	1,2	31,0	14,2	0,2	0,5	0,2	0,07
TATU04850	3,0	2,0	3,0	1,0	26,0	13,0	0,4	0,08	0,1	0,3
TIRG02900	2,9	3,3	3,1	1,2	19,1	12,6	0,2	0,2	0,5	1,0
TAMT04900	5,4	2,3	3,8	1,2	23,2	9,9	0,2	0,2	0,3	1,1
TIET04200	3,7	2,3	2,3	0,9	13,1	9,3	0,2	0,2	0,4	0,7
TIPI04900	2,1	3,1	2,5	1,3	19,3	9,8	0,2	0,2	0,6	0,3
PINH04500	1,8	5,2	2,2	0,5	17,1	4,7	0,2	0,2	1,5	0,7
TIET02450	7,9	4,2	1,4	1,3	17,9	3,2	0,7	1,8	0,7	1,8
JUNA04900	2,0	0,9	0,7	1,0	4,0	7,0	3,0	0,7	4,7	0,4
TIET02400	8,1	7,9	1,7	1,3	22,1	3,2	0,1	2,1	0,8	1,6
CPIV02700	8,5	0,3	0,3	0,4	3,0	5,0	1,0	3,0	3,2	2,8
RGRA02990	2,3	2,5	0,3	0,8	3,9	4,9	0,5	1,0	5,5	2,8
SORO02100	1,0	1,4	0,1	0,2	0,8	1,1	0,3	0,5	6,2	4,4
LENS03950	1,8	2,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,7	1,0	7,4	6,8
JCGU03900	1,6	2,2	0,09	0,1	0,1	0,1	1,1	1,1	5,7	5,5
CMDC02900	2,5	1,0	0,3	0,3	3,0	0,5	2,0	3,0	6,5	5,4
TIET02500	0,1	0,2	0,06	0,2	0,1	0,1	3,9	2,3	6,4	2,5
JPEP03600	1,5	2,9	0,02	0,08	0,1	0,3	0,7	1,2	7,8	6,9
PATO02900	1,7	2,3	0,08	0,4	0,1	0,2	1,2	1,0	7,1	2,4
NASCENTE	NA	0,01	NA	0,02	NA	0,2	NA	0,4	NA	7,5
TIET02600	0,07	0,08	0,007	0,02	0,1	0,2	2,2	1,0	5,7	1,2
TITR02100	0,04	0,08	0,007	0,02	0,1	0,1	0,08	1,0	7,5	7,0
TITR02800	0,02	0,01	0,007	0,02	0,1	0,1	0,7	1,0	8,8	5,7
ESGT02050	0,1	0,2	0,007	0,04	0,2	0,1	1,2	1,0	8,0	8,4
ISOL02995	0,02	0,03	0,007	0,02	0,1	0,1	0,3	0,3	7,4	7,4
TIET02700	0,02	0,02	0,01	0,02	0,1	0,1	1,0	1,0	7,9	5,4
TIPR02990	0,2	0,02	0,007	0,02	0,1	0,2	1,0	1,0	8,5	5,9
PARN02100	0,03	0,03	0,007	0,02	0,1	0,1	0,4	1,0	7,5	6,2

N. Amon. = Nitrogênio Amoniacal; O.D.= Oxigênio Dissolvido; NA = Não Avaliado.

Continuação - Tabela A2 – Caracterização físico-química dos pontos avaliados.

Cód. CETESB	pH.		Potássio		Sódio		Temperatura		Turbidez	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	8,0	7,8	27,5	46,0	65,0	75,5	21,8	24,3	71,3	41,5
TATU04850	7,3	7,2	11,0	9,0	73,0	56,0	21,0	24,0	70,3	49,1
TIRG02900	7,8	7,3	10,0	8,6	42,3	32,8	21,4	27,3	18,4	14,7
TAMT04900	7,3	7,2	13,7	9,5	74,3	47,8	21,3	24,3	47,6	14,5
TIET04200	7,0	7,1	10,7	9,9	44,4	42,2	19,3	26,4	33,9	18,7
TIPI04900	7,2	7,1	13,2	9,0	56,5	35,8	21,1	27,7	19,2	21,4
PINH04500	6,9	6,8	10,2	5,6	41,3	13,8	21,6	25,4	25,8	101,0
TIET02450	7,4	6,8	11,2	8,1	48,2	28,2	20,2	26,8	24,0	180,0
JUNA 04900	7,2	7,1	10,0	18,0	43,0	92,0	22,0	31,0	52,0	47,0
TIET02400	7,4	6,7	11,0	10,1	45,0	36,9	20,2	25,5	17,0	150,0
CPIV02700	7,3	8,1	10,0	5,0	26,0	18,0	22,0	33,0	23,0	24,0
RGRA 02990	7,2	7,2	3,4	3,3	21,4	15,7	22,0	27,6	67,0	31,0
SORO02100	7,0	6,8	4,1	3,6	16,5	9,9	18,8	26,5	12,0	24,0
LENS03950	7,4	7,4	2,4	2,4	22,0	25,5	21,0	25,1	59,0	42,0
JCGU03900	7,1	6,9	2,4	2,9	6,8	4,7	24,2	26,9	31,0	25,0
CMDC02900	7,0	6,9	4,5	5,0	14,0	19,0	24,0	25,0	22,0	62,0
TIET02500	7,3	7,0	6,8	8,0	29,0	32,3	21,5	28,0	1,8	4,3
JPEP03600	7,1	7,2	1,3	1,9	1,4	1,3	20,2	25,6	14,0	23,0
PATO02900	7,0	6,6	3,9	4,3	10,0	16,0	21,1	25,6	3,5	17,0
NASCENTE	NA	5,8	NA	4,0	NA	NA	NA	18,9	NA	1,0
TIET02600	7,3	7,0	5,0	7,1	24,3	28,8	27,5	28,0	2,0	2,6
TITR02100	7,7	7,7	4,0	4,5	16,5	17,8	23,9	28,5	1,9	2,3
TITR02800	8,7	7,6	4,2	4,6	18,0	17,9	24,7	28,0	2,2	1,0
ESGT02050	7,7	8,8	4,5	4,6	16,0	19,3	22,3	28,6	1,4	66,0
ISOL02995	7,5	7,9	1,5	1,6	2,5	2,5	22,7	28,3	1,1	1,3
TIET02700	7,8	7,0	4,6	4,9	16,7	20,0	22,8	27,5	3,3	1,6
TIPR02990	8,2	7,0	4,6	4,9	16,4	20,9	23,3	27,5	1,3	0,9
PARN02100	7,4	7,3	1,8	1,7	3,4	3,4	24,3	28,0	0,9	1,8

NA = Não Avaliado.

Tabela A3 - Efeitos marginais das variáveis ambientais para 2013.

Variáveis	Nº	λA	P
D.B.O. 5,20	9	18%	<0,05
Nitrato	6	5%	<0,05
Turbidez	2	4%	<0,05
Fe Total	15	4%	<0,05
Temperatura	3	3%	<0,05
Fósforo Total	10	3%	<0,05
Sódio	4	4%	<0,05
C.O.T.	13	2%	<0,05
pH.	11	2%	<0,05
O.D.	8	2%	<0,05
Potássio	5	2%	<0,05
N. amoniacal	7	4%	<0,05
Al Total	12	3%	<0,05
Condutividade	1	2%	<0,05
Fe Dissolvido	14	2%	<0,05

Efeitos marginais das variáveis ambientais de acordo com o teste de Permutação de Monte Carlo.

Tabela A4 - Efeitos marginais das variáveis ambientais para 2014.

Variáveis	Nº	λA	P
Fósforo Total	10	31%	<0,05
Fe Dissolvido	14	12%	<0,05
Turbidez	2	8%	<0,05
Temperatura	3	4%	<0,05
Nitrato	6	4%	<0,05
pH.	11	3%	<0,05
N Amoniacal	7	3%	<0,05
Sódio	4	3%	<0,05
C.O.T.	13	4%	<0,05
O.D.	8	2%	<0,05
Al Total	12	1%	<0,05
Potássio	5	1%	<0,05
Condutividade	1	2%	<0,05
Fe Total	15	1%	<0,05
D.B.O. 5	9	1%	<0,05

Efeitos marginais das variáveis ambientais de acordo com o teste de Permutação de Monte Carlo.

Tabela A5 – Índices de diversidade e estimadores de riqueza estimados por T-RFLP.

Código CETESB	Chao-1		Dominância		Simpson 1-D		Shannon-H		Evenness		Equitabilidade	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	73	19	0,0244	0,1105	0,9756	0,8895	3,902	2,402	0,6787	0,6477	0,9096	0,8478
TATU04850	74	60	0,0206	0,0386	0,9795	0,9615	4,024	3,522	0,7582	0,5767	0,9356	0,8649
TIRG02900	101	37	0,0178	0,0533	0,9823	0,9468	4,232	3,194	0,6871	0,6639	0,9186	0,8864
TAMT04900	68	21	0,0296	0,0874	0,9704	0,9126	3,787	2,605	0,6503	0,6659	0,8979	0,8651
TIET04200	71	59	0,0230	0,0376	0,9770	0,9624	3,921	3,568	0,7159	0,6063	0,9215	0,8769
TIP04900	75	35	0,0246	0,0515	0,9754	0,9486	3,900	3,166	0,6600	0,6894	0,9033	0,8949
PINH04500	102	43	0,0170	0,0532	0,9830	0,9469	4,290	3,226	0,7218	0,5900	0,9294	0,8595
TIET02450	69	27	0,0285	0,0800	0,9716	0,9200	3,790	2,834	0,6488	0,6461	0,8975	0,8651
JUNA04900	80	51	0,0318	0,0387	0,9682	0,9613	3,853	3,493	0,5926	0,6485	0,8792	0,8888
TIET02400	102	37	0,0191	0,0538	0,9810	0,9462	4,211	3,192	0,6674	0,6871	0,9124	0,8950
CPIV02700	89	43	0,0200	0,0472	0,9800	0,9528	4,070	3,323	0,6635	0,6546	0,9081	0,8866
RGRA02990	93	39	0,0185	0,0997	0,9815	0,9003	4,169	2,876	0,6991	0,4935	0,9209	0,7993
SORO02100	84	38	0,0261	0,0550	0,9740	0,9450	3,918	3,190	0,6020	0,6847	0,8853	0,8942
LENS03950	81	47	0,0228	0,0405	0,9773	0,9595	3,938	3,417	0,6376	0,6514	0,8974	0,8882
JCGU03900	72	37	0,0295	0,0539	0,9705	0,9462	3,826	3,211	0,6557	0,6769	0,8999	0,8912
CMDC02900	63	30	0,0316	0,0690	0,9684	0,9310	3,665	2,957	0,6203	0,6416	0,8847	0,8695
TIET02500	76	60	0,0286	0,0303	0,9714	0,9698	3,782	3,717	0,5790	0,6919	0,8738	0,9098
JPEP03600	61	53	0,0272	0,0445	0,9728	0,9556	3,803	3,399	0,7356	0,5651	0,9253	0,8563
PATO02900	188	37	0,0096	0,0627	0,9904	0,9373	4,831	3,075	0,6665	0,6064	0,9225	0,8594
NASCENTE	68	48	0,0249	0,0421	0,9751	0,9579	3,836	3,380	0,6818	0,6556	0,9092	0,8891
TIET02600	75	56	0,0249	0,0384	0,9752	0,9616	3,938	3,546	0,6843	0,6453	0,9119	0,8887
TITR02100	70	62	0,0299	0,0250	0,9701	0,9750	3,772	3,839	0,6352	0,7504	0,8904	0,9304
TITR02800	49	62	0,0375	0,0275	0,9625	0,9725	3,474	3,786	0,6780	0,7174	0,8994	0,9193
ESGT02050	72	66	0,0301	0,0246	0,9699	0,9754	3,761	3,867	0,6028	0,7304	0,8810	0,9248
ISOL02995	110	58	0,0174	0,0300	0,9826	0,9700	4,282	3,686	0,6830	0,6951	0,9183	0,9102
TIET02700	78	63	0,0278	0,0272	0,9722	0,9729	3,840	3,821	0,5995	0,7314	0,8824	0,9243
TIPR02990	52	53	0,0357	0,0301	0,9644	0,9700	3,568	3,678	0,6884	0,7693	0,9052	0,9334
PARN02100	102	42	0,0196	0,0401	0,9804	0,9599	4,223	3,427	0,6747	0,7355	0,9140	0,9175

Os valores apresentados representam as médias entre as triplicadas de cada ponto. Valores extremos estão apresentados em negrito.

FIGURAS EM ANEXO

Figura B1 - Análise de Redundância representando as matrizes de T-RFLP e as variáveis ambientais para ambas as temporadas.

Observa-se separação entre as temporadas, pelo eixo principal 1, seguida de separação por qualidade da água de origem, pelo eixo principal 2. Os sufixos 13 e 14 indicam a temporada de amostragem. C.O.T.= Carbono Orgânico Total; D.B.O.= Demanda Bioquímica de Oxigênio; O.D.= Oxigênio Dissolvido.

Figura B2 - Classes pertencentes ao Filo Proteobacteria.

Estão representados os percentuais das classes mais abundantes de Proteobactérias ao longo dos pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Pessimo; R= Ruim e B= Bom.

Figura B3 - Classes pertencentes ao Filo Bacteroidetes.

Estão representados os percentuais das classes mais abundantes de Bacteroidetes ao longo dos pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Pessimo; R= Ruim e B= Bom.

Figura B4 - Classes pertencentes ao Filo Actinobacteria.

Estão representados os percentuais das classes mais abundantes de Actinobactérias ao longo dos pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom.

Figura B5 - Classes pertencentes ao Filo Firmicutes.

Estão representados os percentuais das classes mais abundantes de Firmicutes ao longo dos pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom.

Figura B6 - Abundância relativa das Famílias observadas.

Estão representados os percentuais das famílias mais abundantes entre os pontos avaliados. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom.

Figura B7 - Representação dos Gêneros mais abundantes entre as temporadas.

Estão representados os percentuais dos gêneros mais abundantes ao longo dos pontos avaliados entre as temporadas 2013 e 2014. Os números após o nome dos pontos indicam a temporada de amostragem e as letras logo em seguida indicam a qualidade da água de origem, onde P= Péssimo; R= Ruim e B= Bom.