MABEL PATRICIA ORTIZ VERA

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SEDIMENTO
E DA ÁGUA DO RIO TIETÊ**

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

MABEL PATRICIA ORTIZ VERA

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SEDIMENTO
E DA ÁGUA DO RIO TIETÊ**

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 não autorizada pelo autor

Ortiz Vera, Mabel Patricia.

Caracterização da comunidade fúngica do sedimento e da água do Rio Tietê / Mabel Patricia Ortiz Vera. – São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Wellington Luiz de Araujo.

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 fungal community from Tietê River sediment and water.

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

ICB/SBIB0164/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mabel Patrícia Ortiz Vera.

Título da Dissertação: Caracterização da comunidade fúngica do sedimento e da água do Rio Tietê.

Orientador(a): Prof. Dr. Wellington Luiz de Araujo.

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 : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 667/14 referente ao projeto intitulado: “*Diversidade Metagenômica de fungos do sedimento e da água do Rio Tiête*” sob a responsabilidade de **Mabel Patricia Ortiz Vera**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 27 de maio de 2014.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICO

À minha família....

Pelo amor, carinho e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe, meu pai, meu tio e Fredy, por todo o apoio, força incentivadora, confiança e amor.

A meus irmãos Juan, Sebastian e Andrea. Andrea, apesar da distância sempre juntas, obrigada por estar sempre me acompanhando em todas as situações, nas mais importantes e felizes e também nas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela orientação, paciência, conselhos e pelas oportunidades oferecidas.

A todos os integrantes e amigos do LABMEM, por todas as conversas, cafezinhos e amizade.

Aos meus amigos Tatiana, Jorge, Jose, Angie, por todas as risadas, por seus conselhos, apoio, pela ajuda e incentivo nos momentos que mais precisei.

À Universidade de São Paulo, ao CNPQ e pró-reitoria de pesquisa pelo financiamento.

A toda a equipe da CETESB pelas coletas e ajuda.

A todas as pessoas que de sempre confiaram em mim, e me deram seu apoio sempre que precisei.

Finalmente agradeço a vida e a Deus, pela oportunidade que me deu.

RESUMO

ORTIZ VERA, M. P. **Caracterização da comunidade fúngica do sedimento e da água do Rio Tietê**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Fungos aquáticos constituem o maior grupo microbiano decompositor de substâncias orgânicas e em ecossistemas aquáticos desempenham um papel fundamental no processo de autodepuração do ambiente. O Brasil é tido como um dos países com a maior biodiversidade, porém, quando comparado ao microbioma de animais, plantas e solos, existem poucos estudos sobre a diversidade microbiana em ambientes aquáticos. O Rio Tietê desempenha um papel estratégico do ponto de vista ambiental, passando por áreas de preservação, de agropecuária e áreas intensamente urbanizadas e industrializadas. Nestas áreas de intensa atuação humana, o rio sofre um grande impacto decorrente dos efluentes lançados em seu corpo de água. Assim, o objetivo do presente trabalho foi de caracterizar a diversidade de fungos da água e do sedimento da Bacia do Rio Tietê por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo e verificar o impacto dos níveis de poluentes sobre esta comunidade. Para tanto, a diversidade fúngica foi avaliada por meio de T-RFLP de 30 locais (Rio Tietê e afluentes) entre Agosto e Novembro de 2013, e Fevereiro à Abril de 2014 para diversidade da água e 10 locais entre agosto a outubro de 2013 e julho a setembro de 2014 para diversidade no sedimento. Para amostras de água, foram observados 451 e 442 fragmentos terminais de restrição (TRFs – Terminal Restriction Fragments) na primeira e na segunda coleta, respectivamente. Para o sedimento, foram observados 349 e 354 TRFs para a primeira e segunda coleta, respectivamente. As análises demonstraram uma maior especificidade e diversidade em amostras de qualidade boa e ótima tanto na água como no sedimento. As análises de Redundância (RDA) demonstraram o agrupamento das amostras de acordo com o índice de qualidade de água, sendo os parâmetros de pH, temperatura, nitrato e D.O. os mais significativos para a estruturação das comunidades da água; e cádmio, níquel e zinco para o sedimento. Por meio de isolamento foi observado que a comunidade fúngica cultivável é predominantemente Ascomycota (94%) tanto no corpo de água como no sedimento do Rio Tietê. Os resultados demonstraram que existe correlação entre os parâmetros ambientais avaliados e a estruturação da comunidade, confirmando que a alteração da qualidade da água modifica de forma significativa a diversidade microbiana do Rio Tietê e de seus afluentes.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. Diversidade fúngica. Qualidade do corpo d'água. Ambientes aquíferos.

ABSTRACT

ORTIZ VERA, M. P. **Characterization of fungal community from Tietê River sediment and water**, 2015. 89 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Aquatic fungi are the most decomposer microbial group of organic substances, representing a diverse phylogenetically group in aquatic ecosystems, developing a key role in nutrient cycling, energy flow and biological equilibrium, contributing to the aquatic environment depuration process. Brazil is considered one of the countries with the highest biodiversity, hence, few studies exist about microbial diversity in aquatic environments and the damage and consequences of pollution on diversity and operation of fungal species in those ecosystems. Since it plays a strategic role from an environmental point of view, the Tiete River was studied in order to characterize the diversity of water fungi and the sediment of the river basin through independent and dependent culture techniques and correlate them to environmental variables. Therefore, the fungal diversity was evaluated in 30 points of water during two periods between August and November of 2013, and February to April of 2014 and 10 sediment points, performing the first collection from August to October of 2013 and the second one from July to September of 2014. 451 and 442 restriction terminal fragments (TRFs - Terminal Restriction Fragments) were obtained for the first and second collection of water respectively, and 349 and 354 TRFs for the first and second sediment collection. Analysis showed greater specificity and diversity on excellent and good quality samples in both water and sediment. The redundancy analyses (RDA) showed the grouping of samples according to water quality index, being the pH, temperature, nitrate and DO the most significant parameters for the structuring of water communities; and cadmium, nickel and zinc the most significant for the structuring of sediment communities. It was observed that the cultivable fungal community is predominantly Ascomycota (94%) in both water and sediment. The results showed a correlation of such parameters in community structure and confirming that the change of these parameters may modify the structure of the fungal community in Tiete River waterbody.

Keywords: Microbial ecology. Fungal diversity. Waterbody quality. Aquifers environments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do tratamento de esgotos domésticos no Estado de São Paulo – 2009 a 2014.....	19
Figura 2 – Uso das águas-doces e classes de enquadramento.....	20
Figura 3 – Bacias e Regiões Hidrográficas do estado de São Paulo divididas por Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs).....	21
Figura 4 – Classificação das UGRHIs do Estado de São Paulo por vocação.....	22
Figura 5 – Pontos de amostragem de águas ao longo da Bacia do Rio Tietê.....	30
Figura 6 – Pontos de amostragem do sedimento ao longo da Bacia do Rio Tietê.....	31
Figura 7 – Classificação de contaminantes químicos no sedimento – CQS.....	33
Figura 8 – Caracterização físico-química dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA).....	38
Figura 9 – Variação dos parâmetros físico-químicos em 2013.....	39
Figura 10 – Variação dos parâmetros físico-químicos em 2014.....	40
Figura 11 – Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de fungos da água do Rio Tietê.....	42
Figura 12 – Frequência dos TR-Fs obtidos entre as épocas amostradas.....	44
Figura 13 – Diagrama de Venn representando os TRFs core.....	45
Figura 14 – Diagrama de Venn representando TRFs compartilhados por qualidade de água.....	45
Figura 15 – Distribuição dos TRFs ao longo do Rio Tietê por ponto de amostragem.....	47
Figura 16 – Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo índice de qualidade de água.....	49

Figura 17 – Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos – IQA	51
Figura 18 – Criterio de Qualidade do Sedimento dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA).....	53
Figura 19 – Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de fungos do sedimento do Rio Tietê.....	54
Figura 20 – Frequência dos TR-Fs obtidos entre as épocas amostradas.....	55
Figura 21 – Diagrama de Venn representando os TRFs core no sedimento.....	56
Figura 22 – Diagrama de Venn representando TRFs compartilhados por qualidade do sedimento.....	56
Figura 23 – Distribuição dos TRFs nos pontos de amostragem do Rio Tietê.....	58
Figura 24 – Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo criterio de qualidade do sedimento.....	59
Figura 25 – Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos – CQS.....	60
Figura 26 – População fúngica presente nas amostras de água nas duas temporadas avaliadas.....	61
Figura 27 - População fúngica presente nas amostras de sedimento nas duas temporadas avaliadas.....	62
Figura 28 – Sequenciamento dos isolados a partir de água e do sedimento.....	63

Figuras em apêndice

Figura A – Caracterização dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA)	82
Figura B – Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros toxicológicos – IVA.....	83

Figuras em anexo

Figura C – Intensidades de chuva mensais e anuais no Estado de São Paulo em 2013.....88

Figura D – Variação da intensidade de chuva em cada UGRHI em relação às suas respectivas médias históricas.....89

Figura E – Intensidades de chuva mensais e anuais no Estado de São Paulo em 2014.....89

Figura F– Variação da intensidade de chuva em cada UGRHI em relação às suas respectivas médias históricas.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ponderações dos status de IQA.....	32
Tabela 2 - Ponderações dos status de IVA.....	32
Tabela 3 – Volume aproximado de chuvas por UGRHI durante os meses de amostragem.....	36
Tabela 4 – Volume aproximado de chuvas por UGRHI durante os meses de amostragem.....	37

Tabelas em apêndice

Tabela A – Pontos de amostragem de águas.....	75
Tabela B – Pontos incluídos na análise de IVA.....	76
Tabela C – Pontos de amostragem de sedimentos.....	76
Tabela D – Caracterização físico – química dos pontos avaliados - IQA.....	77
Tabela E – Caracterização de contaminantes químicos tóxicos dos pontos avaliados - IVA.....	79
Tabela F – Efeitos marginais das variáveis ambientais - IQA para 2013.....	83
Tabela G – Efeitos marginais das variáveis ambientais - IQA para 2014.....	84
Tabela H – Efeitos marginais das variáveis ambientais - IVA para 2013.....	84
Tabela I – Efeitos marginais das variáveis ambientais - IVA para 2014.....	85
Tabela J – Caracterização físico – química e tóxicológicos dos pontos avaliados do sedimento – CQS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Águas
BDA	Batata Dextrose Ágar
C.O.T.	Carbono Orgânico Total
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CQS	Criterio de Qualidade do Sedimento
D.B.O.	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCA	De-trended Correspondence Analysis
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IET	Índice de Estado Trófico
ITS	Internal Transcribed Sequences
IPMCA	Índice de variáveis mínimas para a preservação da vida aquática
IQA	Índice de Qualidade da Água
IVA	Índice de Preservação da vida aquática
O.D.	Oxigênio Dissolvido
PCA	Principal Component Analysis
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDA	Redundancy Analysis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism
TRFs	Terminal Restriction Fragments
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O Rio Tietê	17
<i>2.1.1 Enquadramento dos corpos d'água</i>	<i>19</i>
<i>2.2.1 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHIs</i>	<i>20</i>
2.2 Avaliação da comunidade microbiana	23
2.3 Fungos e o ambiente aquático	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 JUSTIFICATIVA	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1 Pontos de coletas	29
5.2 Parâmetros físico-químicos e hidrobiológicos das águas	31
5.3 Parâmetros físico-químico do sedimento	33
5.4 Extração do DNA total das amostras	33
<i>5.4.1 Extração de DNA fúngico presente no Ambiente Aquático</i>	<i>33</i>
<i>5.4.2 Extração de DNA fúngico presente no sedimento</i>	<i>34</i>
5.5 Determinação da estrutura das comunidades de fungos por T-RFLP	34
5.6 Análise dos dados de T-RFLP	34
5.7 Isolamento de fungos cultiváveis do sedimento e da água do Rio Tietê	35
6 RESULTADOS	36
6.1 Índices pluviométricos	36
6.2 Parâmetros físico-químicos e hidrobiológicos das águas	37
<i>6.2.1 Índice de Qualidade de Água - IQA</i>	<i>37</i>
6.3 Determinação da estrutura das comunidades fúngicas da água por T-RFLP	41
<i>6.3.1 Análise de correspondência DCA</i>	<i>50</i>
6.4 Parâmetros físico-químicos e toxicológicos do sedimento	52
6.5 Determinação da estrutura das comunidades fúngicas do sedimento por T-RFLP	53
<i>6.5.1 Análise de correspondência DCA</i>	<i>60</i>
6.6 Comunidade fúngica cultivável da água e sedimento da Bacia do Rio Tietê	61
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE – Informações adicionais	75
ANEXO – Informação suplementar	87

1 INTRODUÇÃO

A presença de diversos seres vivos está ligada à atividade metabólica proveniente dos micro-organismos (LOVELOCK, 1988; STOLZ et al., 1989; TRÜPER, 1992). Estes micro-organismos são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas, atuando principalmente em processos como a ciclagem de carbono, a fixação biológica do nitrogênio, desnitrificação, produção de metano, redução de sulfato, transformação de metais e de diferentes moléculas (AZEVEDO, 1998; HAINES et al., 2002). Além disso, os micro-organismos participam de inúmeros processos complexos, dentre eles, a fotossíntese, ciclos biogeoquímicos, conservação da fertilidade e estrutura de solos (STOLZ et al., 1989; TRÜPER, 1992).

A comunidade microbiana de ambientes dulcícolas representa um conjunto funcional diverso composto por bactérias, fungos e arqueias, os quais são responsáveis por processos chaves para toda a atividade e manutenção do ecossistema aquático. Estes micro-organismos são vitais para o funcionamento deste ambiente, e mudanças drásticas em sua estrutura ou composição podem resultar em alterações inesperadas no fluxo de nutrientes e na saúde biótica no ecossistema (BUCCI et al., 2014). A atividade humana tem impacto importante na diversidade microbiana do ambiente, bem como seu funcionamento. Isto consequentemente pode resultar na extinção de espécies capazes de promover a manutenção e equilíbrio destes ambientes (AZEVEDO, 1998; BRITO et al., 2015). Dessa forma, o descarte de efluentes não tratados podem contribuir para a rápida alteração desses ecossistemas. Adicionalmente, pode ocorrer um acúmulo de metais pesados no ambiente, prejudicando a qualidade das águas e atividades dependentes do seu uso, como doméstica, agrícola e a atividade industrial (MOHANTY et al., 2000).

O rio Tietê nasce na Serra do Mar, em uma área preservada de Mata Atlântica no município de Salesópolis, SP, porém, apesar de sua proximidade com o Oceano Atlântico, flui para o interior do estado de São Paulo, percorrendo 1.150 km até desaguar no rio Paraná. É importante salientar que a Mata Atlântica é internacionalmente reconhecida como um dos cinco mais importantes hotspots, os quais correspondem às áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas em todo o mundo (MYERS et al., 2000). Em seu trajeto original, o rio Tietê cruzava florestas latifoliadas tropicais semidecíduas, matas ciliares e várzeas, além de trechos de cerrados e cerradões. Entretanto, devido ao crescimento da população e consequente ocupação do solo, essas áreas naturais foram sendo reduzidas, tendo, as formações vegetais primitivas, sido substituídas por pastagens e culturas de interesse

agropecuário. Neste contexto, o Rio Tietê desempenha papel estratégico do ponto de vista ambiental, visto que grande parte do seu território está inserido em área de mananciais.

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; RICKMAN; CONNOR, 2003; WOJCIK et al., 2002).

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a diversidade microbiana de solos e em associação com plantas de importância agrícola e/ou ambiental. Entretanto, ambientes aquáticos (água e sedimento) têm sido negligenciados no Brasil, resultando na ausência de conhecimento deste ambiente, bem como a possibilidade de exploração da diversidade de bactérias e fungos. Aliado a esta pouca atenção, corpos d'água doce tem recebido grande quantidade de detritos provenientes de atividades humanas, levando a alterações nas condições físico-químicas e biológicas, mesmo antes que a sua diversidade biológica tenha sido descrita. Neste contexto, tem sido observado que a fauna e flora de rios que sofrem forte ação antropogênica têm sido estudadas, e em alguns casos, espécies vegetais e animais não sobrevivem às condições impostas pelo homem a estes rios e lagoas. Entretanto, a forma como a comunidade microbiana responde a estas alterações é pouco estudada. Assim, 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.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Rio Tietê

O Rio Tietê é considerado a coluna dorsal do estado de São Paulo, através dele foi possível transportar pessoas e mercadorias, transformando o rio em uma estrada fluvial e permitindo o desenvolvimento de inúmeras cidades ao longo do seu eixo, em especial o crescimento e à expansão urbana, territorial e industrial da cidade de São Paulo e sua Região Metropolitana. Este crescimento, fez com esta região se tornasse um dos maiores aglomerados urbanos do planeta, e para adequação a este crescimento da cidade, o Rio Tietê foi retificado, represado, parte de suas águas foi bombeada e sua importância como fonte elétrica foi superposta aos demais usos (PAGANINI, 2008).

O Rio Tietê nasce da Serra do Mar a apenas 22 quilômetros do Oceano Atlântico, porém ele avança para o interior, atravessando 1.150 quilômetros até desaguar no rio Paraná (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 1991). Grande parte do seu território está inserido em área de mananciais, pelo que desempenha um papel estratégico do ponto de vista ambiental, além disso, no Alto Tietê os municípios 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. Salientando a importância da Mata Atlântica, internacionalmente reconhecida como um dos cinco mais importantes hotspots (MYERS et al., 2000).

Uma vez que o Rio Tietê passa por diversas cidades, entre elas a cidade de São Paulo, este rio tem sido sistematicamente contaminado com resíduos de indústrias e esgoto doméstico causando sérios impactos sobre a fauna, flora e comunidades microbianas associadas ao rio e à mata ciliar. 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. Resaltando a necessidade de estudos a respeito dos impactos destes poluentes na diversidade microbiana neste ambiente, permitindo a sua utilização como indicadores de qualidade da água do rio (MORTATTI et al., 2010).

Desde o início o Rio Tietê sempre foi utilizado como receptor dos esgotos produzidos na cidade de São Paulo, sendo encontrado no século XVII, mas os primeiros relatos que indicam alteração na cor e turbidez das águas se refriam aos efeitos da exploração do ouro e do ferro. Já no século XX, a água do Tietê apresentava sinais severos de poluição ocasionado pelo rápido desenvolvimento urbano e a falta de planejamento para eliminação de efluentes, destinando o rio unicamente como fonte elétrica e deixando de lado a utilidade da água para abastecimento público (PAGANINI, 2008). Hoje em dia o estado de São Paulo tem uma população estimada de 44.035.304 habitantes, só na cidade de São Paulo a população estimativa é de 11.895.893 habitantes e ainda hoje não existe um tratamento eficiente dos efluentes despejado no rio (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010).

Na região de Mogi das Cruzes a poucos quilômetros da nascente é visível o início do processo de degradação do Tietê, procedente dos efluentes in natura, ou parcialmente tratados, oriundos da indústria e das residências. Já na cidade de São Paulo o Rio Tietê é um rio morto, sem qualquer tipo de vida aquática (plantas e animais). O governo do Estado de São Paulo, por meio da Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos, vem ampliando os índices de coleta e tratamento de esgoto gradativamente. No entanto, nos últimos três anos, houve uma redução do ritmo de evolução do índice de tratamento dos esgotos domésticos (Figura 1). Durante seu trajeto, ao chegar no interior do estado a quantidade de esgoto lançado é significativamente menor, permitindo uma recuperação gradativa do rio (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014).

Figura 1. Evolução do tratamento de esgotos domésticos no Estado de São Paulo – 2009 a 2014.

Apresentação da evolução do tratamento de esgotos domésticos em São Paulo. Em azul está representado a porcentagem de esgoto tratado, em vermelho está representada a porcentagem de esgoto sem tratar. Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).

2.1.1 Enquadramento dos corpos d'água

Com o contínuo aumento da demanda da água para diferentes usos, tornou-se frequente a ocorrência de conflitos entre os diferentes usuários dos recursos hídricos, sendo necessária a gestão integrada do uso, controle e conservação dos recursos hídricos. Um dos instrumentos de gestão implementados foi o enquadramento dos recursos d'água de acordo com classes de usos preponderantes (PAGANINI, 2008). Dentro do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SINGREH) é estabelecido o pacto acordado pela sociedade, levando em conta as prioridades de uso da água e a classe do enquadramento, buscando “assegurar às águas qualidade compatível com os usos mais exigentes a que forem destinadas” e a “diminuir os custos de combate à poluição das águas, mediante ações preventivas permanentes” (Art. 9º, Lei nº 9.433, de 1997). A resolução CONAMA nº 357/2005 estabelece as classes de enquadramento a partir do nível de poluição dentro de 4 classes (figura 2), sendo a classe 1 com os menores níveis e a classe 4 com os maiores índices de poluição (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009).

Figura 2. Uso das águas-doces e classes de enquadramento

Usos		ESPECIAL	1	2	3	4
PRESERVAÇÃO DO DAS COMUNIDADES AQUÁTICAS		●				
PROTEÇÃO DAS COMUNIDADES AQUÁTICAS			●	●		
ABASTECIMENTO PARA CONSUMO HUMANO		● Após desinfecção	● Após tratamento simplificado	● Após tratamento convencional	● Após tratamento convencional ou avançado	
RECREAÇÃO		○	○	● Contato primário	● Contato secundário	
IRRIGAÇÃO		○	● Hortaliças consumidas cruas	● Hortaliças, frutíferas, parques	● Culturas arbóreas, cereais, forrageiras	
AQUICULTURA E PESCA		○	○	● Aquicultura	● Pesca	
DESSEDENTAÇÃO DE ANIMAIS		○	○	○	●	
NAVEGAÇÃO		○	○	○	○	●
HARMONIA PAISAGÍSTICA		○	○	○	○	●

Associação entre as classes de enquadramento e os usos respectivos a que se destinam as águas doces.
Fonte: Implementação do Enquadramento em Bacias Hidrográficas (ANA, 2009).

2.2.1 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHIs

Com o objetivo de possibilitar o gerenciamento dos diferentes tipos de usos e promover a recuperação ambiental, o Estado de São Paulo instituiu o Plano Estadual de Recursos Hídricos, através da Lei nº9034/94, dividindo o território paulista em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs) facilitando o manejo e administração (figura 3). A bacia hidrográfica do rio Tietê está dividida em seis UGRHIs, sendo, Alto Tietê (UGRHI 6), Tietê-Sorocaba (UGRHI 10), Piracicava-Capivari-Jundiaí (UGRHI 5), Tietê-Jacaré (UGRHI 13), Tietê-Batalha (UGRHI 16) e Baixo Tietê (UGRHI 19), as quais abrangem todo o percurso do rio e encontram-se caracterizadas de acordo com sua vocação econômica (figura 4) (PAGANINI, 2008).

Figura 3. Bacias e Regiões Hidrográficas do estado de São Paulo divididas por Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIs).

Apresentação das 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). Tons em vermelho/rosa representam a Bacia do Rio Tietê. Fonte: Secretaria Estadual de Saneamento e Recursos Hídricos (JMR-ENGECECORPS, 2011).

Figura 4. Classificação das UGRHs do Estado de São Paulo por vocação

Com exceção da Nascente, pontos com qualidade de água inferior encontram-se concentrados em UGRHs de caráter Industrial enquanto pontos com qualidade ótima concentram-se na parte final do rio, pertencente à UGRHs de caráter Agropecuário. Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).

Depois de atingir níveis críticos de qualidade, em 1992 foi gerado um documento contendo 1,2 milhões de assinaturas em favor da despoluição do rio, surgindo o maior programa de saneamento ambiental brasileiro, o Projeto Tietê. Seu objetivo era dotar de estrutura sanitária, construção de coletores, interceptores, estações elevatórias e de tratamento de esgotos. Durante a primeira etapa do projeto (1992-1998) foram inauguradas três novas estações de tratamento de esgoto e foram construídos 1,5 km de redes coletoras, reduzindo 120 km do trecho poluído, aumento o índice de esgoto coletado na Região Metropolitana de São Paulo de 70% para 80% e de esgoto tratado de 24% para 62%. Na segunda etapa compreendida entre o ano 2000 a 2008, o trabalho consistiu na ampliação dos índices de coleta de esgoto de 80% para 84% e do tratamento de 62% para 70%. A terceira etapa ainda está em andamento e com ela se espera uma ampliação da coleta de esgoto de 85% para 87% e obter um total de 84% de esgoto tratado (www.projetotietete.com.br). O Projeto Tietê tem ajudado na melhora significativa do rio, porém, ainda são despejadas diariamente 690 toneladas de esgoto ocasionando um agravamento da poluição. É por isso que são necessárias mais ações integradas que permitam diminuir o lançamento de esgotos domésticos, mudando e conscientizando à sociedade da importância do manejo e cuidado com os recursos hídricos.

2.2 Avaliação da comunidade microbiana

Como a maioria dos micro-organismos do ambiente não podem crescer em condições de laboratório, o desenvolvimento de métodos independentes de cultivo para o estudo da microbiota permitiu um grande avanço nos estudos de ecologia microbiana (OSBORN et al., 2000). Em relação aos fungos, estima-se que apenas 17% pode-se desenvolver em meios de cultura, sendo assim, os métodos independentes de cultivo constituem uma importante ferramenta que têm auxiliado no estudo destes micro-organismos (NANNIPIERI et al., 2003). O estudo das comunidades fúngicas aquáticas têm sido beneficiadas com o desenvolvimento de técnicas moleculares, ampliando a informação das comunidades em uma vasta gama de habitats como, águas profundas, ecossistemas hidrotermais, regiões costeiras, ambientes anóxicos, lagoas, rios e em associação com animais aquáticos, plantas ou algas (PANZER et al., 2015). A ecologia deste de fungos aquáticos é pouco conhecida, sendo muitas vezes negligenciado o papel ecológico destes micro-organismos nos sistemas de água doce. Atualmente a escassez de dados de sequencias moleculares dificulta os estudos comparativos sobre os fungos aquáticos e a construção de dados de referência, dificultando a caracterização de novas espécies (PANZER et al., 2015; WURZBACHER et al., 2014). Assim, os métodos moleculares estão sendo fortemente utilizados no estudos da comunidade microbiana, auxiliando no entendimento da função e diversidade dos micro-organismos no ambiente (RAO et al., 2013). Entre estas técnicas, destaca-se o PCR quantitativo (qPCR) (KRAUSS et al., 2011); a técnica de gel de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE), onde se obtém resultado a partir das alterações nas concentrações de guanina (G) e citosina (C) (WANG et al., 2015) e a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP - Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) por restrição com endonucleases específicas, além do sequenciamento em larga escala de produtos amplificados (OSBORN et al., 2000).

Ao longo dos anos, a análise de T-RFLP tem aumentado consideravelmente para estudar a estrutura e composição da comunidades fúngicas, sendo mais sensível que o método de DGGE e, adicionalmente a análise de T-RFLP pode ser aplicada como um método semi-quantitativo para se estimar a abundância relativa com base na altura ou área dos picos (WATANAROKANAPORN et al., 2014).

O princípio da técnica consiste na amplificação de uma região ou gene de interesse para a comunidade avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com um dos

primers marcados fluorescentemente. Posteriormente o gene é digerido com uma enzima de restrição e os fragmentos de restrição (T-RFs) são separados e detectados por eletroforese capilar em sequenciador de DNA automatizado (FREDRIKSSON; HERMANSSON; WILÉN, 2014; OSBORN et al., 2000). Sendo assim a técnica de T-RFLP é um método que permite a análise da composição e estrutura da comunidade microbiana de diferentes ambientes.

Em estudo recente, Rezende (2015) avaliou por meio de T-RFLP e seqüenciamento em larga escala (NGS –MiSeq Illumina) a diversidade, estrutura e composição da comunidade bacteriana presente no corpo e nos afluentes do Rio Tietê, da nascente à foz, correlacionando às variáveis ambientais com a comunidade bacteriana da água do Rio Tietê e de seus afluentes. Neste trabalho, o autor observou que esta comunidade bacteriana é composta principalmente por membros das ordens Campylobacterales, Burkholderiales e Flavobacteriales. Além disso, foi observado que a temperatura foi a principal variável ambiental atuando sobre a riqueza das comunidades avaliadas. A localização geográfica dos rios e suas conexões também representaram fatores importantes para a distribuição dos gêneros observados.

2.3 Fungos e o ambiente aquático

Com o aumento populacional, a atividade industrial tem aumentado rapidamente com a finalidade de melhorar as condições de vida das pessoas. Porém, este desenvolvimento trouxe um desequilíbrio ambiental, ocasionando desmatamentos e contaminação do ar, da água e dos solos. A poluição dos recursos hídricos é um problema global, oceanos, rios, lagoas, e mares, estão altamente poluídos com contaminantes orgânicos de origem residencial ou provenientes de rejeitos industriais, tais como solventes, inseticidas e pesticidas e por contaminantes inorgânicos como metais pesados, fertilizantes e rejeitos industriais ácidos (DHANKHAR; HOODA, 2011). À medida que diversas alterações ambientais ocorrem, a diversidade e equilíbrio dos ecossistemas são impactados, levando, a partir da década de 1990, um aumento no número de estudos sobre a manutenção e funcionamento dos ecossistemas, analisando diferentes grupos tróficos, a diversidade de espécies animais, plantas e micro-organismos, bem como os mecanismos pelos quais as mudanças ambientais podem afetar a diversidade e os processos ambientais (FERNANDES; PASCOAL; CÁSSIO, 2011). A diversidade microbiana pode sofrer mudanças, uma vez que a densidade e a diversidade são reguladas por fatores como foto-período, temperatura e demanda de nutrientes. Essas

variações podem ser determinantes para a distribuição de espécies de micro-organismos (RIKHVANOV et al., 1999). Os micro-organismos representam a maior biodiversidade da terra e por isso estão presentes em todos os ambientes terrestres desenvolvendo inúmeros processos vitais. Em águas doces, os micro-organismos atuam na decomposição de matéria orgânica e equilíbrio ambiental, podendo ser sensíveis às mudanças ocorridas no meio ambiente, como a temperatura e qualidade da água (BUCCI et al., 2014).

Os fungos são um grupo diverso de organismos que podem ser unicelulares (leveduras) ou filamentosos, capazes de formar micélio, podendo apresentar reprodução assexuada ou sexuada (BROCK, 2009), estão presentes em diferentes habitats como água doce e salgada, solo, parasitas de animais e plantas ou estabelecendo associações mutualísticas, sendo grandes produtores de metabólitos secundários de importância médica, agropecuária e industrial (CHEN et al., 2014).

Durante muito tempo se acreditava que os fungos tinham funções biológicas insignificantes nos sistemas aquáticos, no entanto diversos estudos têm demonstrado que as comunidades fúngicas aquáticas contribuem na mineralização e ciclagem, pela alta capacidade metabólica na captação de carbono e nutrientes pela hidrólises de agregados orgânicos (PANZER et al., 2015; WURZBACHER et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Os Fungos aquáticos constituem o maior grupo microbiano decompositor de substâncias orgânicas, produzindo enzimas hidrolíticas que degradam diferentes compostos. Estes fungos são filogeneticamente diversos neste ecossistema aquático, desenvolvendo um papel fundamental na ciclagem de nutrientes, fluxo de energia e equilíbrio biológico, a maioria são saprófitos, utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e energia contribuindo ao processo de autodepuração do ambiente aquático (FERNANDES; PASCOAL; CÁSSIO, 2011; GODLEWSKA et al., 2012).

De acordo com a morfologia e estilo de vida, os fungos aquáticos são divididos em quatro grupos: fungos inglodianos, encontrados frequentemente em ambientes lóticos com boa aeração, seus conídios apresentam uma adaptação à dispersão neste ambiente, sendo ramificados ou sigmoides, poucas espécies são encontradas no Brasil. Os fungos aeroaquáticos, geralmente encontrados em ambientes lênticos sobre folhas ou madeira, porém também encontrados em ambientes terrestres, possuem conídios helicoidais, que esporulam só quando o substrato é exposto ao ar, alguns gêneros já foram isolados no Brasil. Fungos aquático-terrestres, são encontrados na água acumulada em folhas, proveniente da chuva. Ainda nenhum gênero desse grupo foi ainda encontrado no Brasil. É finalmente, os fungos aquático-facultativos, representados por saprófitos de substratos vegetais submersos ou

terrestres, são denominados hifomicetos dematiáceos e são frequentemente encontrados no Brasil (AUGUSTO et al., 2012).

A pesquisa de fungos de água doce tem incidido sobre o seu papel na decomposição de resíduos como madeira, folhas, na adsorção de corantes e na produção de enzimas, ressaltando que são essenciais para a saúde, prosperidade, sustentabilidade e biodiversidade dos ecossistemas (DE SOUZA SEBASTIANES et al., 2013; ZELSKI et al., 2014). Em especial a classe de hyphomycetes aquáticos têm sido reconhecidos como agentes principais na decomposição dos detritos em grandes rios e riachos (PASCOAL; CÁSSIO, 2004). No entanto, esta decomposição também pode ser influenciada pela temperatura da água, sendo um controle chave na taxa de decomposição pelo metabolismo microbiano, a qual tende a aumentar em estações mais quentes (TAYLOR; CHAUVET, 2014). Adicionalmente tem sido demonstrado que os fungos aquáticos têm papel crucial na decomposição de restos vegetais alóctones (folhas, frutos, galhos e troncos) transformando-os em fonte alimentar para invertebrados (AUGUSTO et al., 2012).

Alguns estudos têm demonstrado o uso de fungos no monitoramento da hidrosfera como bioindicadores de poluentes e outras substâncias orgânicas acumuladas nas superfícies das águas, no entanto diversos grupos de fungos são ainda desconhecidos (GODLEWSKA et al., 2013; KRAUSS et al., 2011). O aumento da poluição e desequilíbrio do ecossistema, pode levar a uma perda de espécies fúngicas e de outros micro-organismos ainda não descritos (PASCOAL et al., 2010). De quase 1,5 milhões de espécies de fungos, só 100,000 foram descritas, assegurando que o verdadeiro potencial biotecnológico destes ainda está por ser conhecido (DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2015).

Apesar da importância dos fungos no ambiente aquático, poucos estudos sobre diversidade têm sido realizados nesse ambiente. À medida que diversas alterações ambientais ocorrem, a 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 de microrganismos. O conhecimento dos padrões de distribuições e os fatores ambientais que mais influenciam na comunidade fúngica são abordados em trabalhos do assunto relacionado. Mesmo assim, esses fatores ambientais e sua importância relativa sobre os micro-organismos ainda permanecem obscuros (WU et al, 2013). Dessa forma, se faz necessários trabalhos focados no conhecimento da diversidade de fungos e como variações ambientais podem afetar esta comunidade nos ecossistemas aquáticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade de fungos da água e do sedimento da Bacia do Rio Tietê por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo.

3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, o presente projeto apresenta os seguintes componentes:

- Selecionar pontos para análise da diversidade de fungos, a partir de análises físico-químicas realizadas pela CETESB;
- Avaliar a comunidade cultivável de fungos da bacia do Rio Tietê;
- Avaliar as comunidades fúngica por meio da técnica de fingerprint T-RFLP, por meio da amplificação da região ITS do rRNA;
- Comparar a variação da diversidade e riqueza de fungos do sedimento e água do Rio Tietê em dois anos (2013 e 2014) de avaliação;
- Avaliar a existência de correlação entre a diversidade de fungos e o perfil físico-químico do sedimento e da água da bacia do Rio Tietê.

4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que os estudos microbiológicos realizados no Rio Tietê, têm sido direcionados unicamente aos avaliadores da qualidade da água (coliformes totais e fecais), a análise da diversidade microbiana deste ambiente se faz imperativo para o conhecimento do impacto da poluição sobre esta comunidade biológica. Portanto o presente trabalho faz parte de um amplo estudo que envolve as áreas de Ecologia Microbiana, Genética de Microorganismos, Metagenômica, Proteômica e Metabolômica que buscam caracterizar a diversidade microbiana no Rio Tietê. A caracterização da diversidade de fungos e bactérias por métodos independentes de cultivo têm sido a base inicial para o desenvolvimento de pesquisas que incluem a construção de bibliotecas de grandes fragmentos (30-40 Kb) de DNA ambiental (metagenômico) para a prospecção de genes, metabólitos e funções metabólicas presente neste ambiente (sedimento e água). Este estudo disponibilizará este conhecimento para a sociedade, bem como para outros pesquisadores interessados na busca por genes com potencial aplicação na área de Biocombustíveis, Biopolímeros, Antibióticos e Biotransformação.

Neste contexto, a realização deste projeto é o resultado da interação entre o grupo de pesquisa do LABMEM (Departamento de Microbiologia, ICB/USP) e a CETESB, permitindo a contextualização dos resultados em um ambiente de preservação e monitoramento da qualidade ambiental. Em etapas anteriores, a comunidade bacteriana deste rio já foi analisada, permitindo observar que a temperatura foi o parâmetro que mais influenciou esta comunidade. Além disso, análises de metagenômica taxonômica e funcional têm sido realizadas, permitindo identificar as funções biológicas selecionadas em diferentes condições ambientais. O conhecimento destas funções permitirá a busca por genes específicos, visto que bibliotecas metagenômicas de grande fragmentos em fosmídeos já foram construídas. Assim tendo em vista a importância do Rio Tietê para o estado de São Paulo, e a oportunidade de utilizar esta comunidade microbiana para a busca por genes de interesse biotecnológico, o conhecimento da comunidade fúngica, objetivo do presente estudo, se faz necessário e de grande importância ambiental e biotecnológica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Pontos de coletas

Para amostras de água foram amostrados 30 pontos ao longo da Bacia do rio Tietê durante duas épocas (figura 5.), a primeira correspondente ao segundo período do ano 2013 entre agosto e outubro, e a segunda época de amostragem foi compreendida entre fevereiro e março de 2014. Para o sedimento foram amostrados sete pontos em 2013 e nove no ano 2014 (figura 6), sendo um total de dez pontos (6 pontos foram amostrados nos dois anos), as duas amostragens foram feitas no segundo período do ano, em 2013 compreendendo os meses de agosto a outubro e a segunda em 2014 nos meses de julho a setembro. Todas as amostragens de água e sedimento foram realizadas pela CETESB em triplicatas. Os pontos amostrados foram escolhidos de modo a representar as áreas mais contrastantes de acordo com a caracterização físico-química do Rio Tietê, da sua nascente até a foz e compreendem pontos de avaliação da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

Foram coletados 5L de água de cada ponto, a qual foi mantida em bombonas plásticas leitosas e 100gr de sedimento em frascos Schott Amber. As amostras foram mantidas a 4°C até seu processamento, o qual ocorreu em no máximo de 48 horas, dependendo do local de amostragem.

Figura 5. Pontos de amostragem de águas ao longo da Bacia do Rio Tietê.

1	TIET SOURCE	6	PINH 04500	11	PCAB 02192	16	TIET 02450	21	JPEP 03600	26	PATO 02900
2	BQGU 03850	7	JUNA 04900	12	TIRG 02900	17	TIBB 02900	22	JCGU 03900	27	TITR 02100
3	TAM 04900	8	CMDC 02900	13	TIET 02400	18	TIET 02500	23	TIET 02600	28	TITR 02800
4	TIET 04200	9	CPIV 02700	14	SORO 02100	19	LENS 03950	24	ESGT 02050	29	ISOL 02995
5	TIPI 04900	10	TATU 04850	15	SOIT 02900	20	RGRA 02990	25	TIET 02700	30	PARN 02100

Apresentação dos 30 pontos de amostragem ao longo da Bacia do Rio Tietê. As cores do mapa mostram a divisão e delimitação das 6 UGRHs correspondentes à Bacia do Rio Tietê. Os círculos coloridos indicam a o Índice de Qualidade da Água (IQA) segundo a média histórica, sendo: Azul= Ótimo; Verde= Bom; Amarelo= Regular; Vermelho= Ruim e Roxo= Péssimo.

Figura 6. Pontos de amostragem do sedimento ao longo da Bacia do Rio Tietê

Apresentação dos 10 pontos de amostragem ao longo da Bacia do Rio Tietê. As cores do mapa mostram a divisão e delimitação das 6 UGRHs correspondentes à Bacia do Rio Tietê. Os círculos coloridos indicam a o critério de qualidade do sedimento (CQS) segundo a média histórica, sendo: Azul= Ótimo; Verde= Bom; Amarelo= Regular; e Roxo= Péssimo.

5.2 Parâmetros físico-químicos e hidrobiológicos das águas

Os resultados físico-químicos e hidrobiológicos analisados e apresentados neste trabalho fazem parte dos “Relatórios de Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo” redigidos e publicados pela (CETESB), e encontram-se disponíveis no site da empresa (www.cetesb.sp.gov.br). A empresa segue o predisposto pela Resolução CONAMA 357/05.

- Índice de Qualidade da Água (IQA)

Todos os pontos amostrados foram comparados e avaliados pelo Índice de Qualidade da Água (IQA), considerando os parâmetros que refletem diretamente a qualidade das águas, como; Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O), fósforo total, nitrogênio amoniacal,

nitrogênio total, Oxigênio Dissolvido (O.D.), pH, temperatura, condutividade, nitrato e turbidez obtendo finalmente o valor IQA (Anexo A).

Os valores de IQA entre 0 e 100 são agrupados de acordo aos status Ótimo, Bom, Regular, Ruim e Péssimo e seguem as ponderações da Tabela 1.

Tabela 1 - Ponderações dos status 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	$< IQA \leq 19$

Índice de Qualidade da Água (IQA)

- Índice de Preservação da vida aquática (IVA)

O Índice de Preservação da vida aquática (IVA) é previsto para corpos d'água enquadrados nas classes 1, 2 e 3, partindo disso, só 19 amostras enquadradas em tais grupos foram avaliadas pelo IVA (Tabela 2A em apêndice). Foram consideradas as variáveis agrupadas no Índice de variáveis mínimas para a preservação da vida aquática (IPMCA), dentro dos quais se encontra, Oxigênio Dissolvido (O.D.), pH, cobre, zinco, chumbo, cromo, mercúrio, níquel e cádmio, e as variáveis aplicadas no Índice de Estado Trófico (IET), composto por fósforo total e clorofila, para finalmente obter o valor do IVA (Anexo B). Os valores de IVA entre $6,8 \leq IVA \leq 2,5$ são agrupados de acordo aos status Ótimo, Bom, Regular, Ruim e Péssimo e seguem as ponderações da Tabela 2.

Tabela 2 - Ponderações dos status de IVA.

Categoria	Ponderação
ÓTIMA	$IVA \leq 2,5$
BOA	$2,6 \leq IVA \leq 3,3$
REGULAR	$3,4 \leq IVA \leq 4,5$
RUIM	$4,6 \leq IVA \leq 6,7$
PÉSSIMA	$6,8 \leq IVA$

Índice de Preservação da vida aquática

5.3 Parâmetros físico-químico do sedimento

O sedimento é avaliado e classificado por meio de diferentes linhas que definem seu grau de qualidade. Neste trabalho será analisada a contaminação química complementado pela análise do fósforo total para avaliar o grau de qualidade e eutrofização dos corpos hídricos, denominado Critério de Qualidade do Sedimento (CQS). Foram consideradas as variáveis agrupadas no grupo de físico-químicos e toxicológicos. As substâncias químicas são classificadas em função da sua concentração baseado nos valores TEL (concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos biológicos adversos) e PEL (concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos biológicos adversos) adotados pela resolução CONAMA 454/12 (BRASIL, 2012), estabelecendo cinco classes de qualidade (figura 7.).

Figura 7. Classificação de contaminantes químicos no sedimento - CQS

Classificação de contaminantes químicos em cinco faixas de qualidade e sua relação com os critérios TEL e PEL. Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).

5.4 Extração do DNA total das amostras

5.4.1 Extração de DNA fúngico presente no Ambiente Aquático

Foram coletados 5L de água em cada um dos pontos a serem avaliados. As amostras foram compostas por filtragem de 1L de água em membrana de 1,2µm Millipore® (Membrana GS em éster de celulose, 47MM de diâmetro, branca, lisa - ©Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), em triplicata. O DNA total retido nestas membranas foi extraído utilizando o kit “Power Soil DNA Isolation Kit®” (MoBio Labs, Inc.Solana Beach, USA). Os filtros foram congelados com nitrogênio líquido, macerados e finalmente transferidos para microtubos fornecidos pelo Kit para a extração, seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade do DNA total extraído foi visualizado em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA).

5.4.2 Extração de DNA fúngico presente no sedimento

O DNA total das amostras de sedimento foi obtido por meio da utilização do kit Power Soil DNA Isolation Kit® (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. O resultado das extrações foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1mM EDTA).

5.5 Determinação da estrutura das comunidades de fungos por T-RFLP

Para a análise de T-RFLP os amplicons foram obtidos por PCR convencional, submetendo as amostras à amplificação da região ITS (internal transcribe sequences) utilizando um dos primers marcados com molécula fluorescente (FAM). O primer FAM-ITS1F (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4r (5' TCCTCCGCTTATTGATATC 3') foram utilizados em reações de PCR com volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de Go Taq® G2Hot Start Green Master Mix, 0,1 µL 10 µM de cada primer e 2,0 µL de DNA. O termociclador foi programado para as seguintes condições: 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 13 ciclos de 94 °C por 35 segundos, 55 °C por 55 segundos, 72 °C por 45 segundos, 13 ciclos de 94 °C por 35 segundos, 55 °C por 2 minutos, 72 °C por 45 segundos, 9 ciclos de 94 °C por 35 segundos, 55 °C por 3 minutos, 72 °C por 45 segundos e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram purificadas com álcool e os produtos digeridos com a enzima de restrição HaeIII (5 U/ µL). A corrida dos fragmentos terminais foi realizada no equipamento 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente (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.

5.6 Análise dos dados de T-RFLP

A leitura dos eletroferogramas foi realizada no programa GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems), fragmentos menores que 50pb foram excluídos das análises. Os resultados obtidos foram analisados nos programas estatísticos PAST 2.14 (Copyright Hammer and Harper 1999-2012), Canoco for Windows 4.51 (Copyright C 1997-2003 Biometris) e R 2.15.1 (Copyright C 2012 The R Foundation for Statistical Computing). Os métodos de análise de dados utilizados foram Análise de Componentes Principais (PCA), que possibilita

verificar os atributos que apresentam maiores influência na distribuição dos dados; Análise de Coordenadas Principais (PCoA) que preserva qualquer distância relativa entre os dados amostrados, o que o torna importante nas análises de beta-diversidade, enquanto que a PCA leva em consideração a distância Euclidiana das amostras; Análise de redundância (RDA), que usa regressão múltipla para a correlação de dados microbiológicos com dados ambientais.

Para avaliar a diversidade e riqueza dos diferentes locais, foram utilizados o estimador de riqueza Chao-1 e os índices de diversidade Simpson 1-D e Shannon-H com a prova de normalidade no programa R 2.15.1 pelo test de Shapiro. Adicionalmente foi empregado o test de ANOVA para à comparação das médias e finalmente o test Duncan para à separação dos grupos homogêneos.

5.7 Isolamento de fungos cultiváveis do sedimento e da água do Rio Tietê

A partir das amostras de água e sedimento foram feitas diluições seriadas em tampão PBS, as quais foram semeadas sobre o meio de cultura BDA (Difco®) suplementado com tetraciclina, e incubadas por até 20 dias a 28°C. Posteriormente, as colônias foram contadas e coletadas aleatoriamente. Em seguida, foi feita extração de DNA por meio da utilização do kit Wizard Genomic DNA purification Kit® (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido na extração foi submetido a reação de PCR convencional, utilizando os primer ITS1F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4r (5' TCCTCCGCTTATTGATATC 3'), para amplificação da região ITS. Após a amplificação, as amostras foram purificadas com álcool e os produtos foram sequenciados e comparados com a base de dados del NCBI (National Center for Biotechnology) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) via BLAST.

Foi feita uma coleção de fungos de água doce e sedimentos estocados em ultra-freezer -80°C, os quais foram catalogados, de acordo com o local de isolamento (pontos de coleta geo-referenciados) e origem (sedimento ou água), além de informações sobre a caracterização enzimática e identificação.

6 RESULTADOS

6.1 Índices pluviométricos

Um dos objetivos do presente trabalho foi comparar a variação da diversidade e riqueza de fungos na água e no sedimento da bacia do Rio Tietê em diferentes locais e épocas (2013 e 2014). Em função disso, a pluviosidade durante os períodos de coleta fez parte das avaliações, visto que este fator ambiental apresenta efeito significativo na vazão, e consequentemente na concentração de poluentes e nutrientes no Rio Tietê.

Em 2013 (Figura C e Figura D em anexo) foi observado que as chuvas no estado de São Paulo alcançaram um volume total de 1.363mm, ou seja, 5% inferior à média dos 18 anos anteriores (1.440mm). Porém, os meses de junho e julho apresentaram intensidades de chuva bastante superiores à média histórica, só o mês de junho apresentou um aumento de 109%. No período de estiagem, caracterizado pelas precipitações mensais inferiores a 100mm, foi observado que o mês de agosto foi anômalo com precipitação média menor que 10mm, 73% menor que a média histórica, nos meses seguintes o comportamento das chuvas se manteve dentro das médias (CETESB, 2013). Esta variação também ocorreu nas diferentes regiões do estado, em especial nas UGRHIs durante o período de amostragem (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados de volume aproximado de chuvas por UGRHIs durante os meses de amostragem (agosto, setembro e outubro) em 2013.

UGRHIs	Agosto	Setembro	Outubro
5	25 (10)*	70 (30)*	120 (110)*
6	40 (10)*	75 (70)*	120 (100)*
10	25 (10)*	55 (50)*	110 (70)*
13	25 (15)*	55 (30)*	110 (120)*
16	25 (5)*	50 (55)*	110 (110)*
18	25 (5)*	75 (60)*	90 (50)*

* entre parênteses: valor aproximado da média histórica.

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2013).

O ano 2014 o volume das chuvas foi inferior que a média, (Figura E e Figura F em anexo); neste contexto, 2014 foi considerado o 5º ano mais seco da história, com uma redução de 26% na precipitação anual. Durante o período de amostragem compreendido de fevereiro a março foi observada uma redução significativa nas precipitações nos meses de janeiro e

fevereiro (Tabela 4). Na maioria das UGRHIs os déficits superaram 20% na precipitação (CETESB, 2014).

Tabela 4 – Dados de volume aproximado de chuvas por UGRHI durante os meses de amostragem (fevereiro e março)

UGRHIs	Fevereiro	Março
5	185 (70)*	175 (150)*
6	205 (110)*	160 (80)*
10	165 (100)*	130 (100)*
13	200 (95)*	140 (125)*
16	190 (120)*	150 (150)*
18	175 (75)*	170 (75)*

* entre parênteses: valor aproximado da média histórica.

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).

Os resultados (Tabelas 3 e 4) mostram que houve diferença nos níveis de precipitação durante os períodos de amostragem, sendo observado uma maior precipitação em 2014 em relação aos períodos amostrados em 2013.

6.2 Parâmetros físico-químicos e hidrobiológicos das águas

6.2.1 *Índice de Qualidade de Água - IQA*

Com o contínuo aumento da demanda de água para diferentes aplicações, tornou-se necessário implementar um conjunto de ações para o controle do uso da água do Rio Tietê, as quais foram denominadas de Gerenciamento dos Recursos hídricos. Para isso, os parâmetros físico-químicos são analisados em cada UGRHI da bacia periodicamente. Assim, a tabela 4 (Anexo) apresenta os valores de cada parâmetro na data de cada coleta, em cada ponto, permitindo identificar os trechos críticos do corpo de água em relação ao IQA. Estes resultados demonstram que amostras com IQA nas categorias ruim e péssima predominam nas UGRHIs de vocação industrial (5, 6 e 10) e as categorias boa e ótima localizam-se, principalmente, nas UGRHIs de vocação agropecuária (16, 18 e 19) e em industrialização (13). A Análise de Componentes Principais realizada com base nestes parâmetros físico-químicos, para ambas as épocas de coleta, indicou agrupamento das amostras de acordo com o IQA. A Componente 1 explicou 69,7% da distribuição observada e foi responsável pela

separação dos pontos com qualidade Ótima e Boa dos pontos com status de qualidade Ruim e Péssima enquanto a Componente 2, com 10,3% de explicação, apresentou tendência de separação dos pontos com qualidade Ótima e Boa dos pontos com qualidade Regular, Ruim e Péssima (Figura 8). As variáveis ambientais das componentes 1 e 2 somadas, explicaram 80,0% da distribuição dos pontos amostrados e os parâmetros nitrogênio amoniacal, fósforo total e ferro total representaram os parâmetros mais significativos para a distribuição da Componente 1 enquanto o sódio explicou melhor a componente 2.

Figura 8. Caracterização físico-química dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA).

Analises de PCA realizada com os dados físico-químicos evidenciando a separação dos pontos de acordo com o IQA. Os círculos coloridos indicam a o Índice de Qualidade da Água (IQA).

As Figuras 9 e 10 representam a variação dos parâmetros físico-químicos entre as amostras de cada época. O parâmetro condutividade apresentou a maior variação entre os valores extremos para ambas as amostragens (30 a 1.843 e 47 a 1.014) enquanto os valores obtidos para pH demonstraram menor variação, com maioria dos pontos apresentando valores próximos a pH=7,0.

Figura 9. Variação dos parâmetros físico-químicos em 2013.

Para cada parâmetro estão representados os valores correspondentes, nas extremidades estão representados os valores menores (esquerda) e maiores (direita). Valores ao centro representam as médias. Al total = Alumino Total; Fe dissolvido = Ferro dissolvido; C.O.T = Carbono Orgânico Total; Fe total = Ferro Total; O.D. = Oxigênio Dissolvido; D.B.O. = Demanda Bioquímica de Oxigênio; N. amoniacal = Nitrogênio Amoniacal.

Figura 10. Variação dos parâmetros físico-químicos em 2014.

Para cada parâmetro estão representados os valores correspondentes, nas extremidades estão representados os valores menores (esquerda) e maiores (direita). Valores ao centro representam as médias. Al total = Alumino Total; Fe dissolvido = Ferro dissolvido; C.O.T = Carbono Orgânico Total; Fe total = Ferro Total; O.D. = Oxigênio Dissolvido; D.B.O. = Demanda Bioquímica de Oxigênio; N. amoniacal = Nitrogênio Amoniacal.

6.2.2 *Índice de Preservação da Vida Aquática – IVA*

O IVA é utilizado para avaliar a presença e concentração de contaminantes químicos tóxicos e seu efeito sobre organismos aquáticos e grau de eutrofização das águas. Os resultados observados mostram a medida dos parâmetros agrupados no IPMCA e IET dos 19 pontos incluídos nesta análise na data coletada para os dois anos de amostragem (Tabela E em apêndice). A Análise de Componentes Principais realizada com base nos parâmetros químicos tóxicos e as duas variáveis essenciais para a biota (pH e O.D) não mostraram separação dos pontos de acordo com o IVA (Figuras A em apêndice).

6.3 Determinação da estrutura das comunidades fúngicas da água por T-RFLP

Os perfis de fungos quando plotados em uma PCoA (figura 11) apresentaram uma separação influenciada principalmente pelo IQA, com eixos da PCoA1 e PCoA2 explicando 18,43% da variação dos dados na primeira coleta (figura 11.A) e 17,5% durante a segunda coleta (figura 11.B).

Figura 11. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de fungos da água do Rio Tietê.

A. apresentando PCoA para a primeira coleta, com eixos 1 e 2 explicando 18,43% da variação dos dados. B. apresentando PCoA para a segunda coleta, com eixos 1 e 2 explicando 17,5% da variação dos dados. Os círculos coloridos indicam a o Índice de Qualidade da Água (IQA). Fonte: (Ortiz-Vera, M. P.; 2015)

Para a análise dos resultados obtidos por T-RFLP, uma matriz de 30 amostras, com 451 TRFs para a primeira coleta e 442 para a segunda coleta, foi obtida (figura 12).

Figura 12. Frequência dos TR-Fs obtidos entre as épocas amostradas.

O número de TRFs obtidos para a primeira amostragem (2013) (em azul) em comparação com a segunda amostragem (2014) (em vermelho).

Estes resultados permitiram obter informações relevantes sobre a frequência dos principais grupos fúngicos presentes nas amostras de água do Rio Tietê.

Os TRFs presentes em mais do 70% das amostras foram caracterizados como “comunidade core” deste ambiente, onde, 6 TRFs (19, 30, 42, 52, 116 e 366) foram da primeira época de amostragem e 9 TRFs (01, 19, 30, 41, 42, 44, 45, 58, 109) da segunda, indicando uma forte predominância destes grupos, além disso foi observado que 3 TRFs (19, 30 e 42) estavam presentes nas duas épocas de amostragem, compartilhando o core das amostras das duas épocas (figura 13).

68 TRFs (15,38%) foram exclusivos de amostras com qualidade boa e ótima e 45 TRFs (10,18%) foram exclusivos de amostras com qualidade ruim e péssima. Assim, é possível concluir que existe uma maior especificidade em amostras de qualidade boa e ótima que nas amostras com qualidade ruim e péssima. No entanto é possível observar que uma alta porcentagem de grupos fúngicos é capaz de colonizar amostras com diferentes níveis de poluentes. Este resultado é confirmado pela presença de 70 (15,52%) e 96 (21,71%) TRFs em todas os locais (não necessariamente de todas as amostras) de 2013 e 2014, respectivamente.

Adicionalmente, foram escolhidos aleatoriamente pontos de cada UGRHI para uma análise mais criteriosa da distribuição dos TRFs na Bacia do Rio Tietê. Para isso, TRFs com frequência <3% foram agrupados em outros, e a distribuição dos grupos dominantes apresentados em cada local de coleta. Nas coletas de 2013, foi observado que a frequência total de grupos raros (frequência <3%) variou de 23,53% para o local 6 (PINH_04500-UGRHI 6) a 55,39% para o local 21 (JPEP_03600-UGRHI 13). O maior número de grupos dominantes (frequência>4%) foi observado na nascente, onde foram observados 11 OTUs (Figura 15).

Para as coletas de 2014, a frequência total de grupos raros variou de 33,12% para o local 21 (JPEP_03600-UGRHI 13) a 55,93% para o local 14 (SORO_02100-UGRHI 10). O maior número de grupos dominantes (frequência>4%) foi observado no local 8 (CMDC_02900-UGRHI 5), onde foram observados 11 OTUs (Figura 15).

Figura 15. Distribuição dos TRFs ao longo do Rio Tietê por ponto de amostragem.

Em A estão representados TRFs obtidos para 2013, em B para 2014. Os TRFs com concentração menos a 3% foram agrupados no grupo “outros”. Os círculos coloridos indicam a o Índice de Qualidade da Água (IQA) segundo a média histórica, sendo: Azul= Ótimo; Verde= Bom; Amarelo= Regular; Vermelho= Ruim e Roxo= Péssimo.

Ao avaliar riqueza e diversidade, os resultados obtidos revelaram que para as duas épocas avaliadas as medias das amostras com índice de qualidade regular apresentaram os maiores índices (figura 16). As amostras com índice de qualidade ótima apresentaram os valores médios de riqueza mais baixo no primeiro periodo, contrário ao segundo período de amostragem onde os valores mais baixos foram obtidos nas amostras com índice de qualidade péssima. Amostras com índice de qualidade péssima apresentaram os valores médios de diversidade mais baixo durante 2013 e novamente este resultado foi oposto ao observado durante o segundo periodo, visto que os valores mais baixos foram obtidos nas amostras com índice de qualidade ótima.

Figura 16. Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo índice de qualidade de água.

À esquerda estão representados os Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo índice de qualidade de água na primeira amostragem. À direita estão representados os Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo índice de qualidade de água na segunda amostragem.

Os resultados obtidos revelam que amostras com IQA regular tendem a apresentar maiores valores para os índices de riqueza e diversidade. As amostras com IQA regular foram coletadas em diferentes afluentes do Rio Tietê (Rio Sorocaba-UGRHI 10, Rio Piracicaba-UGRHI 5, Rio Camanducacia-UGRHI 5, Rio Pinheiros-UGRHI 6 e Rio Ribeirão Grande-UGRHI 13) e portanto esta maior riqueza e diversidade não apresentam correlação com a localização geográfica.

6.3.1 Análise de correspondência DCA

A análise de correspondência DCA foi realizada com a finalidade de avaliar as matrizes e os gradientes de distribuição. Os resultado obtido foi inferior a 3 para as duas épocas de amostragem, indicando que a Análise de Redundância (RDA) deve ser o melhor modelo matemático.

6.3.1.1 A análise de correspondência DCA – IQA

Os resultados demosntraram uma tendência de agrupamento dos pontos de acordo com o IQA (figura 17). Para a temporada 2013 os parâmetros D.O. (oxigênio dissolvido), nitrato e pH foram os mais importantes para a estruturação das comunidades (Tabela F – em apêndice). Na temporada 2014, os parâmetros de pH, temperatura, nitrato e D.O. foram os mais importantes (Tabela G - em apêndice).

Figura 17. Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos – IQA

Em A estão distribuídos pontos e parâmetros amostrados durante a estiagem, em B estão distribuídos os pontos e parâmetros amostrados durante a precipitação. 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.

6.3.1.2 A análise de correspondência DCA – IVA

Os resultados obtidos não apresentaram uma tendência de agrupamento dos pontos de acordo com o IVA (Figura B em apêndice). No entanto, foi observado uma pequena influência de alguns parâmetros em 2013 (fósforo total e cádmio) (Tabela H– em apêndice) e 2014 (fosforo total e cádmio, cromo e níquel) (Tabela I - em apêndice).

6.4 Parâmetros físico-químicos e toxicológicos do sedimento

A análise físico-química e toxicológica do sedimento permitiram, com base na medida do CQS para os dois anos de amostragem, permitiu identificar os trechos críticos do corpo de água (Tabela J em apêndice). A Análise de Componentes Principais realizada com base nestes parâmetros indicou que não ocorre agrupamento dos pontos de coleta de acordo com o CQS. A Componente 1 explicou 62,69% da distribuição observada e foi responsável pela separação dos pontos influenciada pelo silte, argila e areia; enquanto a Componente 2, com 16,10%, apresentou tendência de separação pelo arsênio e o cobre (Figura 18). As variáveis ambientais das componentes 1 e 2 somadas, explicaram 78,79% da distribuição dos pontos amostrados e os parâmetros de granulometria (areia e argila) e os sólidos voláteis representaram os parâmetros mais importantes para a distribuição das Componentes.

Figura 18. Criterio de Qualidade do Sedimento dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA).

Analises de PCA realizada com os dados físico-químicos e toxicológicos do sedimento evidenciando que não existe separação dos pontos de acordo com CQS. Os círculos coloridos indicam o CQS.

6.5 Determinação da estrutura das comunidades fúngicas do sedimento por T-RFLP

Os perfis de fungos, analisados pela PCoA (figura 19), geraram agrupamentos de pontos específicos que compartilham o mesmo CQS. Entretanto, foi observado agrupamento de pontos com qualidades diferentes, com eixos da PCoA1 e PCoA2 explicando 28,95% da variação dos dados. A análise de T-RFLP das comunidades de fungos do sedimento do Rio Tietê resultaram em um total de 416 OTUs, tendo sido observados 254 e 275 TRFs para 2013 e 2014, respectivamente (figura 20).

Figura 19. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de fungos do sedimento do Rio Tietê.

Análise de PCoA com eixos 1 e 2 explicando 28,95% da variação dos dados. B. Os círculos coloridos indicam a o Critério de qualidade do Sedimento (CQS).

Figura 20. Frequência dos TR-Fs obtidos entre as épocas amostradas.

Observa-se o número de TRFs obtidos para a primeira amostragem (2013) (em azul) em comparação com a segunda amostragem (2014) (em vermelho).

Os resultados obtidos permitiram obter informações relevantes sobre a frequência dos principais grupos fúngicos presentes nas amostras do sedimento da Bacia do RioTietê. Desta forma, foi possível determinar que 11 TRFs (10, 15, 26, 33, 35, 48, 50, 53, 54, 95 e 376) de 2013 e 3 TRFs (42, 48 e 51) de 2014 estão presentes em mais do 70% das amostras analisadas, sendo apenas 1 TRFs (48) compartilhado nos 2 anos de análise. Estes resultados sugerem que estes 13 TRFs pertencem à grupos dominantes neste ambiente e por tanto, constituintes importantes do “core” de fungos do sedimento da Bacia do Rio Tietê (figura 21).

Figura 21. Diagrama de Venn representando os TRFs core no sedimento

Foram obtidos 10 TRFs core (presente em mais do 70% das amostras) na primeira época de amostragem e 2 durante a segunda época de amostragem. Apenas 1 TRFs core foi compartilhados entre as temporadas.

Observou-se que o sedimento de qualidade boa apresentou o maior número (65) de TRFs exclusivos, enquanto o sedimento de qualidade ótima apresentou apenas 3 TRFs exclusivos (figura 22). Foi também observado que 11 TRFs (2,64%) foram compartilhados por todas as classes de sedimentos (bom, ótimo, regular e péssimo) (não necessariamente em todas as amostras). Além disso, 74 TRFs (17,78%) estão presentes apenas em amostras com qualidade boa e ótima e 44 TRFs (10,57%) estiveram presentes só em amostras com qualidade regular e péssima.

Figura 22. Diagrama de Venn representando TRFs compartilhados por qualidade do sedimento.

Agrupamento dos TRFs de acordo com a qualidade do sedimento de origem.

Para uma análise mais criteriosa da distribuição dos TRFs no sedimento do Rio Tietê, foram agrupados TRFs com frequência <3% como outros, e a distribuição dos grupos dominantes apresentados em cada local de coleta (figura 23). Nas coletas de 2013, foi observado que a frequência total de grupos raros (frequência <3%) variou de 23,53% para o local 9 (TIBB_02900-UGRHI 10) a 60,73% para o local 7 (PCAB_02195-UGRHI 5). O maior número de grupos dominantes (frequência >4%) foi observado no local 9 (TIBB_02900-UGRHI 10), onde foram observados 11 OTUs.

Para as coletas de 2014, a frequência total de grupos raros variou de 13,94% para o local 2 (NOVA_00800-UGRHI 6) a 67,67% para o local 9 (TIBB_02900-UGRHI 10). O maior número de grupos dominantes (frequência >4%) foi observado no local 9 (TIBB_02900-UGRHI 10), onde foram observados 12 OTUs.

A riqueza e diversidade dos grupos fúngicos não apresentaram relação com a localização geográfica e nem tampouco com o CQS do sedimento, visto que locais com qualidade ótima e péssima apresentaram resultados diferentes, bem como amostras localizadas em regiões próximas apresentaram resultados semelhantes (figura 24).

Figura 23. Distribuição dos TRFs nos pontos de amostragem do Rio Tietê.

Em A estão representados TRFs obtidos para 2013, em B para 2014. Os TRFs com concentração menos a 3% foram agrupados no grupo “outros”. Os círculos coloridos indicam a o criterio de qualidade do sedimento (CQS) segundo a média histórica, sendo: Azul= Ótimo; Verde= Bom; Amarelo= Regular; e Roxo= Péssimo.

Figura 24. Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo critério de qualidade do sedimento.

Representados dos Índices de diversidade e estimador de Riqueza pelo critério de qualidade do sedimento. As barras se encontram organizadas de acordo à trajetória de amostragem no rio.

6.5.1 Análise de correspondência DCA

A análise de correspondência DCA-CQS apresentou uma tendência de agrupamento dos pontos de acordo à convergência, influenciada por alguns parâmetros físico-químicos. Entretanto, foi observado que certos pontos de amostragem não apresentaram agrupamento com os parâmetros avaliados ou local, sendo influenciado apenas pela similaridade na composição da comunidade - TRFs (Figura 25). Os parâmetros cádmio, níquel e zinco foram os mais importantes para a estruturação das comunidades (Tabela I em apêndice).

Figura 25. Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros físico-químicos – CQS

Distribuição dos pontos por TRFs e CQS.

6.6 Comunidade fúngica cultivável da água e sedimento da Bacia do Rio Tietê

A figura 26 mostra a densidade de fungos na água da bacia do Rio Tietê em 2013 e 2014. Observar-se maior quantidade de fungos em 2013, no entanto, a tendência dos dados é similar nas duas temporadas avaliadas. Os pontos SOIT_02850, TIBB_02900 e JCGU_03900 no ano 2014 foram os locais com menor quantidade de fungos, apresentando valores inferiores a 10^1 UFC ml^{-1} . Já os pontos BQGU_03850 (2013 e 2014) e PIHN_04500 em 2013 apresentaram contagens da ordem de 10^5 .

Figura 26. Densidade fúngica nas amostras de água da bacia do Rio Tietê em 2013 e 2014.

De forma similar às amostras de água, foi estimada a densidade de fungos nas amostras de sedimento. Os resultados apresentados na figura 27, evidencia contagens na ordem entre 10^2 e 10^4 UFC. mL^{-1} , sendo o ponto TIBB_02900 em 2014 o local com menor quantidade de fungos e PCAB_02195 o local com maior quantidade de fungos.

Figura 27. Densidade fúngica presente nas amostras de sedimento nas duas temporadas avaliadas

Quanto à coleção de fúngica, foi feita amplificação da região ITS do rRNA e posterior sequenciamento. Foi observado que dos 95 isolados identificados 94% pertencem ao filo Ascomycota e 6% ao filo Basidiomycota. Destes isolados, 62 foram identificados com pelo menos 99% de similaridade com fungos que apresentam sequências depositadas nas base de dados (GenBank). O gênero *Davidiella*, foi dominante nesta comunidade, seguido por *Ascomycota*, *Trichocomaceae* (família), *Penicillium* (*P. levitum*), *Montagnulaceae*, *Westerdykella* e *Pleosporales* (Figura 28).

Figura 28. Espécies de fungos isolados a partir de água e sedimento da Bacia do Rio Tietê.

Sequenciamento dos fungos isolados no corpo d'água do Rio Tietê. Identificação com mais de 99% de similaridade de 45 espécies de fungos.

7 DISCUSSÃO

A análise baseada na técnica de T-RFLP da água de 30 locais da bacia do Rio Tietê demonstrou a presença de 451 TRFs para 2013 e 442 para 2014. Entretanto, somente 3 TRFs core, ou seja que estão presentes em mais de 70% das amostras em cada ano, foram compartilhados entre as temporadas amostradas na água. Para a análise de sedimento, das 349 e 354 TRFs core observadas em 2013 e 2014, respectivamente, somente 1 TRFs core foi compartilhada nas duas temporadas. Este resultado demonstra que existe uma grande flutuação na comunidade microbiana da água e do sedimento da bacia do Rio Tietê, sendo possível que grupos raros se tornam dominantes enquanto grupos dominantes se tornam raros de uma temporada para outra. Segundo Singh et al. (2011) este resultado pode sugerir que ambientes diversos podem ser fonte de novos táxons de fungos de interesse biotecnológico, visto que variações ambientais poderiam expor grupos que estariam em baixa frequência e, portanto, difíceis de serem identificados. Estes novos táxons/genótipos poderiam permitir a busca por novas moléculas ou enzimas úteis para processos de biotransformação.

O despejo de poluentes de origem industrial e esgoto doméstico principalmente na cidade de São Paulo, ocasiona uma redução nas concentrações de oxigênio dissolvido, sendo uns dos principais fatores ambientais que pode afetar a estruturação das comunidades fúngicas em águas. Segundo Brito et al. (2015) ambientes aquáticos altamente contaminados pode afetar não só a diversidade das comunidades, como também as atividades metabólicas, devido ao estresse adicional causado pelos poluentes, o qual pode confirmar a especificidade dos grupos fúngicos tanto do sedimento como de água ao colonizar ambientes de qualidade ótima e boa (figuras 14 e 22). Tanto no sedimento como na água aproximadamente 10% dos TRFs encontram-se em amostras com qualidade ruim e péssima. Estes fungos, adaptados a estas condições, podem participar da degradação de compostos tóxicos, permitindo a sobrevivência de outras espécies e consequentemente a redução dos níveis de poluentes (BRITO et al., 2015; PYLRO et al., 2014).

Adicionalmente foi observado que 17,31% (2013) e 18,13% (2014) dos TRFs presentes na nascente do rio, não estiveram presentes em outros pontos de amostragem (locais com qualidades ótima, boa, regular, ruim ou péssima), sugerindo que desaparecem ou estão em níveis abaixo do limiar de detecção da técnica, após passarem pela região de São Paulo. Este resultado sugere que alguns grupos fúngicos podem estar sendo afetado pelos poluentes presentes no rio, ocasionando a redução da sua frequência. Resultados similares foram obtidos por Logares et al. (2013), os quais observaram por meio de T-RFLP que alguns táxons

microbianos (raros ou abundantes) são sensíveis à variação ambiental, podendo desaparecer antes mesmo de serem estudados.

Ao avaliar a diversidade e riqueza da comunidade fúngica da água e sedimento da Bacia do Rio Tietê, foi possível observar que as amostras de água com qualidade regular, independente da sua localização geográfica, apresentam maiores valores de riqueza e diversidade, indicando que, nas amostras avaliadas, não existe correlação entre a localização e a diversidade/riqueza de fungos. Segundo Liu et al. (2015) os afluentes apresentam maior diversidade de fungos comparando com a corrente principal, isto porque os rios pequenos são mais efetivos no transporte de nutrientes que os rios principais, os quais têm uma tendência a serem reservatório de grupos dominantes. Por outro lado, a teoria do rio contínuo sugere que a maior diversidade está presente a jusante do rio (LIU et al., 2015). No presente trabalho, não foi possível contrapor estas duas teorias, visto que a maior riqueza foi observada em amostras com qualidade regular pertencentes aos afluentes do Rio Tietê. Portanto, esta maior riqueza poderia estar relacionada à qualidade de água do rio, e não ao fato de pertencerem aos afluentes.

Os resultados de estruturação das comunidades fúngicas (TRFs) por qualidade de água, demonstraram que existe uma maior especificidade de TRFs em amostras de qualidade boa e ótima, tanto na água como no sedimento. No entanto, ao avaliar os índices de riqueza e diversidade, os resultados revelaram que amostras com qualidade ótima da primeira amostragem (2013) apresentaram os menores índices. Isto pode ser explicado pela pouca concentração de nutrientes nas cabeceiras dos rios, os quais aumentam à medida que o rio segue o seu curso. No Rio Tietê, logo após a nascente, na região metropolitana de São Paulo os índices de qualidade são ruins ou péssimos. Segundo o estudado por Liu et al. (2015) ao passar por zonas urbanas muito poluídas a diversidade fúngica é diminuída por causa dos contaminantes presentes na água, consequência das atividades humanas que afetam a atividade da comunidade fúngica. A disponibilidade de uma grande quantidade de matéria orgânica pode favorecer grupos microbianos com estratégia “r”, os quais podem, rapidamente, se tornar dominantes, excluindo espécies competidores, ou mantendo espécies estrategistas “k” como os grupos raros.

Na segunda amostragem (2014) foi observado que as amostras com qualidade ruim apresentaram os menores índices de riqueza. Segundo Vander et al. (2011) perturbações repentinas no ambiente podem mudar a estrutura da comunidade, tornando grupos raros em dominantes em um período de tempo curto. Gelorini et al. (2012) sugerem que fatores físico-químicos afetam a estruturação fúngica em ambientes aquáticos e que muitas espécies

fúngicas expostas a regiões contaminadas não são mais observadas. De acordo com os resultados obtidos por Ge et al. (2008) comunidades fúngicas respondem ao gradiente climático, apresentando uma maior adaptação nas áreas mais frias. Portanto, é possível que a estruturação da comunidade fúngica esteja respondendo às variações ambientais. De fato, as análises de correspondência DCA mostraram que para a temporada 2013 os parâmetros D.O., nitrato e pH foram os mais importantes para a estruturação das comunidades e para 2014, os parâmetros de pH, temperatura, nitrato e D.O. foram os mais importantes. Além disso, esta análise de DCA mostrou uma tendência de agrupamento dos pontos de acordo com o IQA (figura 17), salvo algumas amostras como TATU_04850-13 e TAMT_04900-13 categorizadas com qualidade ruim e agrupadas junto com os pontos de qualidade boa (figura 17A). Por outro lado, o ponto JCGU03900-13 de qualidade boa foi agrupado junto com os pontos de qualidade ruim. Este ponto JCGU03900-13 pertence ao Rio Jacaré – Guaçu, localizado no município de Ibitinga, caracterizada por sua elevada indústria têxtil e cultivo de laranja e cana de açúcar (DAS, 2013), sugerindo que embora este rio apresente o IQA bom, os poluentes provenientes destas atividades poderiam induzir uma convergência desta comunidade fúngica com aquela presente em ambientes com IQA ruim.

Como foi observado nos resultados da análise DCA, o O.D. é um dos fatores mais influentes e sua alteração pode consequentemente afetar a estruturação fúngica presente na bacia do Rio Tietê. Os valores de oxigênio dissolvido (mg/L), mostram que ao longo do rio não existe uma homogeneidade nos resultados, apresentando uma diminuição drástica nos pontos de qualidade ruim e péssima, consequência dos contaminantes, aumentando nos pontos com qualidade ótima e boa. Por fim, a DBO apresentam níveis muito superiores ao estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05 nas UGRIH 5, 6 e 10, comprovando um alto impacto de efluentes orgânicos em trechos específicos do rio.

A relação do pH na estruturação da comunidade, pode ser explicado a partir da condutividade, pela estreita correlação. Os resultados de condutividade apresentam altos valores ao longo dos pontos de amostragem, e adicionalmente apresentou a maior variação entre os valores observados para as duas épocas de amostragens (figuras 9 e 10). Segundo Paganini (2008) níveis superiores a 100µs/cm indicam ambientes impactados e modificações na composição da água, sendo um bom indicador de impactos ambientais decorrentes de lançamentos industriais, mineração, esgoto doméstico entre outros. A condutividade indica a quantidade de íons presentes em uma amostra e tem relação direta com a temperatura, a qual pode aumentar ou diminuir a capacidade de condução elétrica, e é influenciada diretamente pela carga elétrica dos solutos (MOHORIC et al., 2014).

Os resultados mostram que existe correlação entre a temperatura e a distribuição dos TRFs nos pontos avaliados e nas duas épocas. De acordo com a literatura, o aumento de temperatura leva à redução da densidade da água, ocasionando uma estratificação do corpo de água, e conseqüentemente as camadas mais profundas se mantêm frias, aumentando a disponibilidade de nutrientes nas superfícies mais quentes, os quais consumindo-se rapidamente, aumentando a DBO e ocasionando conseqüentemente perda de oxigênio (O.D), esta estratificação pode ser alterada pelos ventos, movimentação dos peixes, chuvas, entrada de afluentes, entre outros (ROLDAN; RAMIREZ, 2008). Em 2013 a temperatura média das águas foi de 22 °C e em 2014 foi de 26 °C (figuras 9 e 10). No entanto, em 2014 apresentou-se uma maior precipitação e por conseguinte maior homogeneização das águas, diminuindo a estratificação do corpo d'água, resultando em menores valores de DBO e condutividade neste ano de 2014, o que provavelmente pode ter influenciado na variação mínima dos TRFs obtidos durante as duas épocas amostradas, tanto na água como no sedimento. Estudos têm revelado que existe aumento da riqueza microbiana em rios e reservatórios após precipitações, ocasionado pela dispersão microbiana, a qual é devido ao carreamento de micro-organismos das margens para dentro dos corpos d'água (CRUMP; AMARAL-ZETTLER; KLING, 2012). Adicionalmente, tem sido comprovado que as comunidades microbianas de água e sedimento são sensíveis às mudanças temporais (CHEN et al., 2015). Foi observado que no último mês amostrado de 2013 (outubro), os índices pluviométricos apresentaram médias próximas aos meses amostrados em 2014 (fevereiro e março).

Por fim, os resultados obtidos em quanto à coleção fúngica, revelou que dos 95 fungos isolados, 62 foram identificados, sendo possível verificar que 94% pertencem ao filo Ascomycota. Miura e Urabe (2015) realizaram um estudo para avaliar e examinar os efeitos da matéria orgânica dissolvida e nutrientes e da variação espacial e sazonal nos ambientes lóticos sobre a comunidade de fungos, e observaram que membros do filo Ascomycota são dominantes neste processo de decomposição da matéria orgânica. Entretanto, os autores observaram que esta dominância é dependente da sazonalidade e temperatura, podendo, dependendo das condições ambientais, permitir que o filo Basidiomycota se torne dominante. Este estudo sugere que a composição taxonômica pode mudar ao longo dos rios, dependendo do ambiente. No presente trabalho este resultado não foi observado, visto que o filo Ascomycota foi dominante em todas as amostras de água e sedimento analisadas. Entre as espécies dominantes, *Davidiella tassiana* (12%) e *Talaromyces marneffe* (10%) foram os mais frequentes. *D. tassiana* foi observada em plantas aquáticas (Kohout et al. 2012) enquanto *T.*

marneffe é considerado um fungo patogênico causador de micoses com potencial zoonótico (SEYEDMOUSAVI et al., 2015).

Lui et al. (2015) confirmam o papel do filo Ascomycota na ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos, e sugere que a presença destes micro-organismos esta relacionada com o teor total de nutrientes, concluindo que qualquer alteração de elementos disponíveis no sedimento do rio pode afetar a estrutura da comunidade fúngica. Assim, é ressaltada uma vez mais a importância do desenvolvimento de estratégias voltadas para a conservação de corpos de água, reduzindo os impactos ambientais que afetam a diversidade de fungos e outras espécies.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com base na análise de T-RFLP e a avaliação dos índices de qualidade da água e do sedimento permitiram concluir que, a estruturação da comunidade fúngica do Rio Tietê é dependente dos fatores físico-químicos, sendo a temperatura, condutividade, nitrato e D.O. os mais importantes.

Adicionalmente foi possível concluir que a heterogeneidade dos resultados de TRFs core demonstra o potencial deste ambiente apresentar novos táxons de fungos de interesse biotecnológico. Entretanto, a especificidade de alguns grupos a ambientes de qualidade ótima e boa, demonstra que estes grupos podem ser afetados pelos poluentes presentes no rio, ocasionando a sua perda e consequentemente a riqueza de fungos deste ambiente.

O gênero *Davidiella* é o grupo cultivável dominante nas águas e sedimentos da Bacia do Rio Tietê. Entretanto o número de isolados identificados não permite definir se este grupo é afetado pelos níveis de poluentes.

REFERÊNCIAS*

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Implementação do enquadramento em bacias hidrográficas**. Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos – Snirh, Arquitetura Computacional e Sistêmica. Brasília-DF, 2009.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

BRITO, E. M. S.; DE LA CRUZ BARRÓN, M.; CARETTA, C.; GOÑI-URRIZA, M.; ANDRADE, L. H.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, G.; MALM, O.; TORRES, J. P. M.; SIMON, M.; GUYONEAUD, R. Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: Investigation of hydrocarbon degradation potential. **Science of the total Environment**, v. 521-522, p. 1-10, 2015

BUCCI, J.; SZEMPRUCH, A.; CALDWELL, J.; ELLIS, J.; LEVINE, J. Seasonal Changes in Microbial Community Structure in Freshwater Stream Sediment in a North Carolina River Basin. **Diversity**, v. 6, p. 18–32, 2014.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. Série de Relatório, 2 e 3. 1995.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo**. São Paulo, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo**. São Paulo, 2014.

CHEN, W.; LEE, M.-K.; JEFCOATE, C.; KIM, S. C.; CHEN, F.; YU, J.-H. Fungal cytochrome P450 monooxygenases: Their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 7, p. 1620–1634, 2014.

CONNOR, E. F.; HAFERNIK, J.; LEVY, J.; MOORE, V. L.; RICKMAN, J. K. Insect conservation in a urban biodiversity hotspot: the San Francisco Bay Area. **J. Insect. Conserv.**, v. 6, p. 247-259, 2002.

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

DAS, Q. Qualidade das águas superficiais. 2013.

* De acordo com:

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

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L.; ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; LACAVA, P. T.; HARAKAVA, R.; AZEVEDO, J. L.; DE MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, p. 153–166, 2013.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–44, 2015.

DHANKHAR, R.; HOODA, A. Fungal biosorption an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. **Environmental Technology**, v. 32, n. 5, p. 467–491, 2011.

FERNANDES, I.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. Intraspecific traits change biodiversity effects on ecosystem functioning under metal stress. **Oecologia**, v. 166, p. 1019–1028, 2011.

FREDRIKSSON, N. J.; HERMANSSON, M.; WILÉN, B. Impact of T-RFLP data analysis choices on assessments of microbial community structure and dynamics. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 360, p. 1–18, 2014.

GELORINI, V.; VERBEKEN, A.; LENS, L.; EGGERMONT, H.; ODGAARD, B. V.; VERSCHUREN, D. Effects of land use on the fungal spore richness in small crater-lake basins of western Uganda. **Fungal Divers**, v. 55, p. 125–142, 2012.

GODLEWSKA, A.; KIZIEWICZ, B.; MUSZYŃSKA, E.; MAZALSKA, B. Aquatic fungi and heterotrophic straminipiles from fishponds. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 3, p. 615–625, 2012.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **O livro do Rio Tiete**. São Paulo: Estúdio RO Projetos e Edições Ltda., 1991.

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

HYDE, K.; GOH, T. Fungi on submerged wood in Lake Barrine, north Queensland. **Printed in the United Kingdom**, v. 102, n. 6, p. 739–749, 1998.

HYDE, K.; GOH, T. Fungi on submerged wood from the River Coln, England. **Printed in the United Kingdom**, v. 103, n. 12, p. 1561–1574, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censos demográficos-estados**. 2010.

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.

KOHOUT, P.; SYKOROVA, Z.; CTVRTLÍKOVÁ, M.; RYDLOVÁ, J.; SUDA, J.; VOHNIK, M.; SUDOVÁ, R. Surprising spectra of root-associated fungi in submerged aquatic plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 216-235, 2012.

KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; WESENBERG, D.; KRAUSS, G.; SOL, M.; FELIX, B. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 35, p. 620–651, 2011.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, p. 557-578, 2008.

LIU, J.; WANG, J.; GAO, G.; BARTLAM, M. G.; WANG, Y. Distribution and diversity of fungi in freshwater sediments on a river catchment scale. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–12, 2015.

LOGARES, R.; LINDSTRÖM, E. S.; LANGENHEDER, S.; LOGUE, J. B.; PATERSON, H.; LAYBOURN-PARRY, J.; RENGEFORS, K.; TRANVIK, L.; BERTILSSON, S. Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change. **The ISME Journal**, v. 7, p. 937–948, 2013.

LOVELOCK, J. M. **The ages of Gaia**. Oxford: Oxford University Press, 1988.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376–380, 2005.

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, n. 5, p. 366–377, 2012.

MOHANTY, S. R.; BHARATI, K.; DEEPA, N.; RAO, V. R.; ADHYA, T. K. Influence of heavy Metals on Methane Oxidation in tropical rice Soils. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, v. 47, p. 277-284, 2000.

MOHORIČ, T.; HRIBAR-LEE, B.; VLACHY, V. Effects of the translational and rotational degrees of freedom on the hydration of simple solutes. **The Journal of Chemical Physics**, v. 140, n. 18, p. 184510, 2014.

MONCHY, S.; SANCIU, G.; JOBARD, M.; RASCONI, S.; GERHAGNON, M.; CHABÉ, M.; SIME-NGANDO, T. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake

ecosystems using rDNA cloning/sequencing and SSU tag pyrosequencing. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1433–1453, 2011.

MORTATTI, J.; HISSLER, C.; PROBST, J. C. Distribuição de metais pesados nos sedimentos de fundo ao longo da bacia do Rio Tietê. **Revista do Instituto de Geociências – USP**, v. 10, p. 3-11, 2010.

MUSZYŃSKA, E.; KIZIEWICZ, B.; GODLEWSKA, A.; MILEWSKI, R. Fungi and straminipilous organisms growing in the narew river and its chosen tributaries in NE Poland. **Pol. J. Environ. Stud.**, v. 23, n. 2, p. 401–408, 2014.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-884, 2000.

OSBORN, A. M.; MOORE, E. R.; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental microbiology**, v. 2, p. 39–50, 2000.

PAGANINI, W. S. A identidade de um rio de contrastes: o tietê e seus múltiplos usos. 2. ed. São Paulo: ABES, AESABESP, 2008.

PASCOAL, C.; CÁSSIO, F.; NIKOLCHEVA, L.; BÄRLOCHER, F. Realized fungal diversity increases functional stability of leaf litter decomposition under zinc stress. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 1, p. 84–93, 2010.

PROJETO TIETÊ. **Projeto Tietê**. Marcos históricos. Disponível em: <www.projetoetiete.com.br>. Acesso em: 14 out. 2015.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; ORTEGA, J. M.; DO AMARAL, A. M.; TÓTOLA, M. R.; HIRSCH, P. R.; ROSADO, A. S.; GÓES-NETO, A.; DA COSTA DA SILVA, A. L.; ROSA, C. A.; MORAIS, D. K.; ANDREOTE, F. D.; DUARTE, G. F.; DE MELO, I. S.; SELDIN, L.; LAMBAIS, M. R.; HUNGRIA, M.; PEIXOTO, R. S.; KRUGER, R. H.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, V. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity-challenges and prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

RAJA, H.; SHEARER, C. Freshwater ascomycetes: new and noteworthy species from aquatic habitats in Florida. **The Mycological Society of America**, v. 100, n. 3, p. 467–489, 2008.

RICKMAN, J. K.; CONNOR, E. F. The effect of urbanization on the quality of remnant habitats for leaf-mining Lepidoptera. **Quercus agrifolia. Ecography**, v. 6, p. 777-787, 2003.

RIKHVANOV, E. G.; VARAKINA, N. N.; SOZINOV, D. Y.; VOINIKOV, V. K. Association of bacteria and yeasts in hot springs. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4292-4293, 1990.

ROLDAN, G.; RAMIREZ, J. **Fundamentos de limnología neotropical**. 2. ed. Universidad de Antioquia, 2008.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Res.**, v. 11, p. 3-11, 2001.

SINGH, P.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the Central Indian Basin by culture-independent approach. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 507–517, 2011.

STOLZ, J. F.; BOTKIN, D. B.; DASTOOR, M. N. The integral biosphere. In: RAMBLER, M. B.; MARGULIS, L. E.; FESTER, R. (Ed.). **Global ecology**. Academic Press, 1989. p. 31-49.

TRÜPER, H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiv. Conserv.**, v. 1, p. 227-236, 1992.

VAN DER GAST, C. J.; GOSLING, P.; TIWARI, B.; BENDING, G. D. Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. **Environ. Microbiol.**, v. 13, p. 241–249, 2011.

WANG, Y.; LIU, J.; WANG, J.; GAO, G.; BARTLAM, M. G. Distribution and diversity of fungi in freshwater sediments on a river catchment scale. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–12, 2015.

WATANAROJANAPORN, N.; LONGTONGLANG, A.; BOONKERD, N.; TITTABUTR, P.; LEE, J.; TEAUMROONG, N. Biases for detecting arbuscular mycorrhizal fungal mixture by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 77–86, 2014.

WOJCIK, D. P.; FORYS, E. A.; ALLEN, C. R. 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. **Biol. Conserv.**, v. 108, p. 27-33, 2002.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C. S.; KRUMHOLZ, L. R.; NAJAR, F. Z.; ROE, B. A.; ELSHAHED, M. S. Comparison of Species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 5227–5236, 2009.

APÊNDICE – Informações adicionais

Tabela A. Pontos de amostragem de águas

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 Jundiaí -UGRHI05	23°12'36''	47°17'28''
5	PCAB 02195	Rio Piracicaba	22°41'57''	47°38'12''
5	TATU 04850	Ribeirão Tatu	22°39'36''	47°21'09''
6	Não cadastrado*	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. Pirapora	23°23'27''	46°59'41''
10	SOIT 02900	Res. Ituparanga	23°37'08''	47°23'22''
10	SORO 02100	Rio Sorocaba	23°28'36''	47°26'29''
10	TIBB 02900	Res. Barra Bonita	22°31'23''	48°31'08''
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. 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''
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''

Tabela B. Pontos incluídos na análise de IVA

UGRHI	Cód. CETESB	Corpo Hídrico	Latitude	Longitude
5	PCAB 02195	Rio Piracicaba	22°41'57"	47°38'12"
5	CPIV 02700	Rio Capivari	22°59'58"	47°31'52"
5	CMDC 02900	Rio Camanducacia	22°39'42"	47°00'11"
10	SOIT 02900	Res. Ituparanga	23°37'08"	47°23'22"
10	TIET 02450	Rio Tietê	22°57'26"	47°49'14"
10	SORO 02100	Rio Sorocaba	23°28'36"	47°26'29"
10	TIBB 02900	Res. Barra Bonita	22°31'23"	48°31'08"
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"
19	PARN 02100	Rio Paraná	20°47'27"	51°37'24"
19	TITR 02800	Res. 3 Irmãos	20°39'35"	51°08'48"
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"

Tabela C. Pontos de amostragem de sedimentos

UGRHI	Cód. CETESB	Corpo Hídrico	Latitude	Longitude
5	ATIB02800	Rio Atibaia	22 45 43	47 10 31
5	PCAB02195	Rio Piracicaba	22 41 57	47 38 12
6	NASC	Nascente Rio Tietê	23 34 17	45 44 9,5
6	PINH04500	Rio Pinheiros	23 35 35	46 41 34
10	SOIT02850	Res. de Itupararanga	23 37 08	47 23 22
10	TIBB02900	Res. de Barra Bonita	22 31 23	48 31 08

Tabela D. Caracterização físico – química dos pontos avaliados - IQA

IQA	Ponto de Amostragem	Conductividade	Turbidez	Temperatura	Na	K	No3-	NH4+	D.O.	B.O.D. 5,20	Fósforo Total	pH.	Alumínio Total	Carbono Orgânico Total.	Ferro Dissolvido	Ferro Total
bom	JPEP 03600	45	14	20,2	1,35	1,3	0,71	0,1	7,8	2	0,025	7,1	0,066	1,48	0,47	1,5
bom	PATO 02900	95	3,5	21,1	10,04	3,92	1,24	0,1	7,1	2	0,083	7	0,121	2,68	0,854	1,7
bom	ESGT 02050	148	1,4	22,3	15,95	4,5	1,17	0,18	8	2	0,007	7,7	0,05	6,84	0,058	0,128
bom	TIET 02500	230	1,76	21,5	29	6,8	3,94	0,1	6,39	3	0,06	7,3	0,2	4,14	0,1	0,1
bom	LENS 03950	146	59	21	22	2,38	0,74	0,17	7,4	4	0,142	7,4	0,3	4,13	0,48	1,78
bom	JCGU 03900	72	31	24,2	6,78	2,38	1,07	0,1	5,7	2	0,087	7,1	0,15	3,89	0,48	1,58
bom	TIBB 02900	314	2,74	23,67	31,4	7,01	5,04	0,21	4,98	3	0,14	7,1	0,13	5,44	0,1	0,1
bom	CMDC 02900	196	22	24	14	4,5	2	3	6,5	7	0,3	7	1,3	4,76	0,5	2,5
bom	ESGT 02050-14	159	66	28,6	19,3	4,59	1	0,11	8,4	11	0,041	8,8	0,05	15,7	0,134	0,184
bom	PATO 02900-14	90	17	25,6	16	4,29	1	0,21	2,4	3	0,37	6,6	0,05	10,4	1,5	2,28
bom	TIET 02500-14	289	4,25	27,95	32,3	7,98	2,31	0,1	2,47	3	0,16	6,98	0,13	6,61	0,1	0,18
bom	JCGU 03900-14	70,6	25	26,9	4,71	2,85	1,07	0,08	5,5	2	0,1	6,9	0,279	7,5	0,863	2,25
bom	JPEP 03600-14	100	23	25,6	1,29	1,87	1,16	0,28	6,9	2	0,08	7,22	0,167	5,7	1,21	2,91
bom	LENS 03950-14	196	42	25,1	25,5	2,35	1	0,17	6,8	3	0,23	7,4	0,37	7,57	0,738	2,31
bom	TIBB02900-14	306	8,52	20,29	34,3	7,96	2,92	0,2	9,15	7	0,15	8,21	0,1	6,1	0,1	0,1
bom	TIET 02600-14	237	2,6	28	28,8	7,09	1	0,16	1,2	2	0,02	7	0,05	4,35	0,016	0,084
otimo	TIET 02700	149	3,3	22,8	16,65	4,6	1,04	0,1	7,9	2	0,01	7,8	0,05	3,35	0,013	0,02
otimo	ISOL 02995	51	1,1	22,7	2,5	1,51	0,33	0,1	7,4	2	0,007	7,5	0,05	1,57	0,019	0,02
otimo	TITR 02800	158	2,2	24,7	18	4,2	0,7	0,1	8,8	2	0,007	8,7	0,05	5,19	0,012	0,015
otimo	TITR 02100	147	1,9	23,9	16,5	4	0,08	0,1	7,5	2	0,007	7,7	0,059	3,65	0,016	0,04
otimo	PARN 02100	78	0,9	24,3	3,41	1,76	0,38	0,12	7,5	2	0,007	7,4	0,05	2,67	0,016	0,028
otimo	TIET 02600	175	2	27,5	24,3	5,02	2,24	0,1	5,7	2	0,007	7,3	0,05	4,75	0,06	0,07

otimo	TIET NASC	30	1	18,92	0,0001	4	0,39	0,22	7,51	3	0,02	5,8	0,05	1	0,01	0,01
otimo	SOIT 02900	76,6	4,6	22,2	5,5	3	0,2	0,1	8,2	3	0,007	8,5	0,1	4,25	0,1	0,16
otimo	ISOL 02995-14	47	1,3	28,3	2,47	1,58	0,34	0,14	7,4	2	0,02	7,9	0,05	1,97	0,016	0,026
otimo	NASCENTE-14	30	1	18,92	0,0001	4	0,39	0,22	7,51	3	0,02	5,8	0,05	1	0,01	0,01
otimo	TIET 02700-14	180	1,6	27,5	20	4,85	1	0,14	5,4	2	0,02	7	0,05	3,24	0,013	0,024
otimo	TITR 02100-14	155	2,3	28,5	17,8	4,5	1	0,1	7	2	0,02	7,7	0,05	3,25	0,035	0,075
otimo	TITR 02800-14	149,1	1	28	17,9	4,59	1	0,1	5,7	2	0,02	7,6	0,05	5,7	0,017	0,013
otimo	PARN 02100-14	79,3	1,8	28	3,36	1,74	1	0,1	6,2	2	0,02	7,3	0,05	1,49	0,018	0,026
otimo	SOIT 02900-14	84,5	4,1	19,3	6,45	3,02	0,2	0,21	8,4	2	0,02	7,3	0,11	3,89	0,1	0,15
pessimo	BQGU 03850	1843	71,3	21,78	65	27,5	0,2	31	0,23	120	2,4	7,99	10,3	80,9	0,33	3,9
pessimo	TAMT 04900	733	47,6	21,33	74,3	13,7	0,2	23,2	0,27	162	3,79	7,33	2,22	90,9	2,02	5,4
pessimo	TIET 04200	633	19,2	21,1	56,5	13,2	0,2	19,3	0,58	99	2,53	7,24	1,61	49,2	0,43	2,11
pessimo	TIPI 04900	590	33,9	19,28	44,4	10,7	0,2	13,1	0,39	96	2,3	7,03	3,88	58,8	0,76	3,75
pessimo	BQGU03850-14	1014	41,5	24,3	75,5	46	0,47	14,2	0,07	48	1,2	7,8	5,67	44,7	0,52	2,57
pessimo	TAMT 04900-14	469	14,5	24,28	47,8	9,5	0,2	9,9	1,1	40	1,23	7,21	2,07	28,4	0,32	2,32
pessimo	TIPI 04900-14	399	21,4	27,7	35,8	8,97	0,2	9,79	0,31	26	1,33	7,11	2,05	23,9	1,3	3,12
pessimo	TIET 04200-14	448	18,7	26,4	42,2	9,88	0,2	9,34	0,71	31	0,96	7,14	1,49	27,2	0,97	2,27
pessimo	TIRG 02900-14	475	14,7	27,3	32,8	8,63	0,2	12,6	1,02	23	1,2	7,28	1,93	20,9	0,5	3,26
pessimo	TATU 04850-14	561	49,1	24	56	9	0,08	13	0,3	52	1	7,2	0,4	41,9	0,3	2
regular	SORO 02100	123,3	12	18,8	16,54	4,05	0,28	0,78	6,2	7	0,125	7	0,8	9,51	0,1	1
regular	PCAB 02195	404	8,42	21,3	39	5,5	0,65	4	0,9	5	0,6	7,1	1,4	8,98	0,3	1,5
regular	SORO02100-14	156,4	24	26,5	9,92	3,56	0,5	1,1	4,4	6	0,17	6,8	1,33	8,85	0,1	1,36
regular	CMDC 02900-14	142	62	25	19	5	3	0,5	5,4	8	0,3	6,9	0,6	9,07	0,3	1
regular	PINH 04100-14	309	101	25,4	13,8	5,6	0,2	4,7	0,7	46	0,53	6,8	10,1	17,4	0,4	5,2
regular	RGRA 02990-14	230	31	27,6	15,7	3,29	1	4,88	2,8	11	0,79	7,2	0,37	12,3	0,824	2,47
ruim	CPIV 2700-14	410	24	33	18	5	3	5	2,8	18	0,4	8,1	0,3	20,7	0,3	0,3
ruim	JUNA04900-14	678	47	31	92	18	0,7	7	0,4	96	1	7,1	0,5	64,6	0,3	0,9
ruim	TIET 02450-14	225	180	26,8	28,2	8,14	1,77	3,2	1,8	33	1,26	6,8	8,71	19,5	0,1	4,16

ruim	TIET 02400-14	264,9	150	25,5	36,9	10,1	2,1	3,15	1,6	36	1,27	6,7	12,8	25,4	0,1	7,93
ruim	PCAB02195-14	706	16,8	18,5	102	11	0,15	6	0,5	20	1	7,1	0,3	14,4	0,3	1
ruim	PINH 04500	522	25,8	21,61	41,3	10,2	0,2	17,1	1,5	55	2,2	6,87	0,55	38	0,44	1,85
ruim	TIET 02450	552	24	20,2	48,15	11,22	0,67	17,9	0,7	13	1,36	7,4	7,95	10,9	0,1	7,9
ruim	TIET 02400	655	17	20,2	45	11	0,1	22,1	0,8	14	1,74	7,4	8,53	13,7	0,1	8,12
ruim	TATU 04850	737	70,3	21	73	11	0,36	26	0,1	107	3	7,3	2	10,1	0,7	3
ruim	TIRG 02900	646	18,4	21,41	42,3	10	0,2	19,1	0,53	136	3,12	7,27	1,45	46,6	0,89	2,94
ruim	JUNA 04900	359	52	22	43	10	3	4	4,7	47	0,662	7,2	3	24,7	0,3	2
ruim	RGRA 02990	205	67	22	21,4	3,37	0,47	3,94	5,5	11	0,309	7,2	0,4	6,06	0,69	2,31
ruim	CPIV 02700	209	23	22	26	10	1	3	3,2	34	0,3	7,3	17	6,92	0,4	8,5

Tabela E. Caracterização de contaminantes químicos tóxicos dos pontos avaliados - IVA

	O.D	pH	Cádmio	Chumbo	Cobre	Cromo	Mercurio	Níquel	Zinco	Clorofila	Fósforo Total
CMDC 02900	6,5	7	0,001	0,01	0,005	0,05	0,0001	0,02	0,1	0,6	0,3
CMDC 02900-14	5,4	6,9	0,001	0,01	0,005	0,05	0,0001	0,02	0,1	3,3	0,3
CPIV 02700	3,2	7,3	0,001	0,01	0,005	0,05	0,0002	0,02	0,1	12,6	0,3
CPIV 2700-14	2,8	8,1	0,001	0,01	0,005	0,05	0,0001	0,04	0,1	245,9	0,4
ESGT 02050	8	7,7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	22,19	0,007
ESGT 02050-14	8,4	8,8	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	5,08	0,041
JCGU 03900	5,7	7,1	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,005	0,01	0,087
JCGU 03900-14	5,5	6,9	0,002	0,009	0,0075	0,005	0,0002	0,01	0,006	0,01	0,1
JPEP 03600	7,8	7,1	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,009	0,01	0,025

JPEP 03600-14	6,9	7,22	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	0,76	0,08
LENS 03950	7,4	7,4	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,008	1,43	0,142
LENS 03950-14	6,8	7,4	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,009	1,67	0,23
PARN 02100	7,5	7,4	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	0,49	0,007
PARN 02100-14	6,2	7,3	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	0,53	0,02
PATO 02900	7,1	7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	0,53	0,083
PATO 02900-14	2,4	6,6	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	0,56	0,37
PCAB 02195	0,9	7,1	0,001	0,01	0,005	0,05	0,0001	0,02	0,1	4,4	0,6
PCAB02195-14	0,5	7,1	0,001	0,01	0,02	0,05	0,0002	0,02	0,1	13,4	1
RGRA 02990	5,5	7,2	0,002	0,009	0,0066	0,005	0,0002	0,01	0,011	2,32	0,309
RGRA 02990-14	2,8	7,2	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,02	0,01	0,79
SOIT 02900	8,2	8,5	0,007	0,009	0,009	0,02	0,0002	0,02	0,02	10,69	0,007
SOIT 02900-14	8,4	7,3	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	9,93	0,02
SORO 02100	6,2	7	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	11,58	0,125
SORO02100-14	4,4	6,8	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	8,15	0,17
TIBB 02900	4,98	7,1	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	12,34	0,14
TIBB02900-14	9,15	8,21	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	121,62	0,15
TIET 02450	0,7	7,4	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,05	6,11	1,36
TIET 02450-14	1,8	6,8	0,0007	0,01	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	20,49	1,26
TIET 02500	6,39	7,31	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	15,04	0,06
TIET 02500-14	2,47	6,98	0,0007	0,009	0,01	0,02	0,0002	0,02	0,02	64,15	0,16

TIET 02600	5,7	7,3	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,004	3,21	0,007
TIET 02600-14	1,2	7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,004	20,85	0,02
TIET 02700	7,9	7,8	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	2,14	0,01
TIET 02700-14	5,4	7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	3,21	0,02
TITR 02100	7,5	7,7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,005	6,84	0,007
TITR 02100-14	7	7,7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,004	9,11	0,02
TITR 02800	8,8	8,7	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,003	1,5	0,007
TITR 02800-14	5,7	7,6	0,002	0,009	0,005	0,005	0,0002	0,01	0,007	4,54	0,02

Figura A. Caracterização dos pontos de amostragem por Análise de Componentes Principais (PCA).

Analises de PCA realizada com os dados de IVA.

Os círculos coloridos indicam a o Índice de Preservação da vida aquática (IVA)

Fonte: (Ortiz-Vera, M. P.; 2015).

Figura B. Análise de Redundância relacionando a matriz de T-RFLP com parâmetros toxicológicos – IVA

Em A estão distribuídos pontos e parâmetros amostrados durante a estiagem, em B estão distribuídos os pontos e parâmetros amostrados durante a precipitação. Os TRFs foram agrupados de acordo com IVA da água de origem.

Fonte: (Ortiz-Vera, M. P.; 2015)

Tabela F. Efeitos marginais das variáveis ambientais - IQA para 2013

Variáveis	Var.N	LambdaA	P
D.O.	8	0.05	0.002
Nitrate	6	0.05	0.004
pH.	11	0.04	0.116
Total ph	10	0.04	0.342
Total Al	12	0.03	0.328
Temperat	3	0.04	0.396
Sodium	4	0.03	0.376
Turbidit	2	0.04	0.322
Total Fe	15	0.03	0.590
Dissolve	14	0.03	0.726
B.O.D. 5	9	0.04	0.110
Amoniac	7	0.02	0.762
Potassiu	5	0.04	0.568
Conducti	1	0.03	0.462
Total O.	13	0.02	0.740

Tabela G. Efeitos marginais das variáveis ambientais - IQA para 2014

Variáveis	Var.N	LambdaA	P
Total pH	10	0.05	0.002
Temperat	3	0.05	0.008
Nitrate	6	0.04	0.034
Conducti	1	0.04	0.084
Potassiu	5	0.05	0.102
Dissolve	14	0.03	0.164
Amoniac	7	0.04	0.342
B.O.D. 5	9	0.03	0.490
pH.	11	0.03	0.560
Turbidit	2	0.03	0.594
Total Al	12	0.03	0.508
Sodium	4	0.04	0.460
Total O.	13	0.03	0.512
D.O.	8	0.03	0.568
Total Fe	15	0.02	0.744

Tabela H. Efeitos marginais das variáveis ambientais - IVA para 2013

Variable	Var.N	LambdaA	P
F.sforo	11	0.09	0.002
C.dmio	3	0.07	0.092
O.D	1	0.07	0.076
N.guel	8	0.06	0.198
pH	2	0.06	0.322
Clorofil	10	0.05	0.454
Chumbo	4	0.06	0.456
Zinco	9	0.05	0.446
Mercurio	7	0.04	0.528
Cobre	5	0.05	0.536

Tabela I. Efeitos marginais das variáveis ambientais - IVA para 2014

Variable	Var.N	LambdaA	P
F.sforo	11	0.08	0.020
C.dmio	3	0.07	0.052
Cobre	5	0.06	0.124
Cromo	6	0.07	0.204
Clorofil	10	0.06	0.228
N.guel	8	0.07	0.130
Chumbo	4	0.06	0.412
Zinco	9	0.05	0.448
O.D	1	0.04	0.548
Mercurio	7	0.04	0.546
pH	2	0.04	0.528

Tabela J. Caracterização físico – química e tóxicológicos dos pontos avaliados do sedimento - CQS

	Composto	SOIT02850-14	ATIB02800-14	PCAB02195-14	ATIB02800-13	PINH04500-13	PINH04500-14	TIBB02900-14	SOIT02850-13	PCAB02195-13	TIBB02900-13
Metais e sedimentais	Alumínio_	106400	70484	77486	16474	13937	5054	62793	104970	66079	38101
	Arsênio	9,8	1,82	2,98	1	1	1,2	8,31	1	1	2
	Cádmio	0,6	0,5	0,6	0,5	0,72	0,6	0,6	0,5	0,76	0,5
	Chumbo	30	30	33	10	33,6	30	39,8	16,14	23,7	16,06
	Cobre	12,4	71,7	92,5	19,8	55,9	58,1	70,7	25,8	106	42,6
	Cromo_	46,4	48	61	17,8	38,9	12,4	55,8	64,9	68,4	69,6
	Ferro_	67550	41465	44941	14489	17362	7355	54133	83275	52490	79639
	Mercurio	0,1	0,1	0,1	0,06	0,09	0,1	0,1	0,07	0,12	0,06
	Níquel	14,4	25,7	25,5	10,2	15,7	108	64,9	5,51	22,1	28,2
	Zinco	75,4	166	170	50,2	168	122	114	31	201	58,2
nutrientes/carbono	C.O.T.	1,86	2,23	2,22	1	1,46	1	2,91	2,05	2,31	1,32
	Nitrogênio_Kjeldahl	2534	1868	2744	526	1136	326	4487	2396	3279	
	Fósforo	598	1568	1587	566	665	435	3361	1177	2037	1146
Físico-químicos	teor_de_umedade	76	57,5	57	41,7	40,1	26	82	78,7	63,8	45,2
	sólidos_totais	24	37	42	67	63	74	18	20	38	44
	sólidos_voláteis_totais	15	10	10	2	4	2	13	14	12	7
Granulometria	areia	2,37	30,24	13,2	85,53	80,84	80,68	6,4	5,94	5,41	54,1
	argila	73,75	30,3	50,9	6,29	8,21	5,62	60,65	62,33	47,74	28,37
	silte	23,88	39,46	35,9	8,18	10,95	13,7	32,95	31,73	46,85	17,53

ANEXO – Informação suplementar

Fórmula IQA

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

Onde:

IQA: Índice de Qualidade das Águas, um número entre 0 e 100.

q_i : qualidade do i ésimo parâmetro, um número entre 0 e 100, obtido pela curva média de variação de qualidade, em função de sua concentração ou medida

w_i : peso correspondente ao i ésimo parâmetro, um número entre 0 e 1, atribuído em função da importância para a conformação global de qualidade, sendo que:

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

Onde:

n : número de variáveis contidas no cálculo de IQA.

Fórmula IVA

$$IVA = (IPMCA \times 1,2) + IET$$

- IPMCA - Índice de Variáveis Mínimas para a Preservação da Vida Aquática.

Dadas as ponderações para as variáveis determinadas em uma amostra de água, o IPMCA é calculado da seguinte forma:

$$IPMCA = VE \times ST$$

Onde:

VE: Valor da maior ponderação do grupo de variáveis essenciais.

ST: Valor médio das três maiores ponderações do grupo de substâncias tóxicas. Este valor é um número inteiro e o critério de arredondamento deverá ser o seguinte: valores menores que 0,5 serão arredondados para baixo e valores maiores ou iguais a 0,5 para cima.

- IET - Índice do Estado Trófico

composto pelo Índice do Estado Trófico para o fósforo – IET(PT) e o Índice do Estado Trófico para a clorofila a – IET(CL), modificados por Lamparelli (2004), sendo estabelecidos para ambientes lóticos, segundo a equação

- Rios

$$\text{IET (CL)} = 10 \times (6 - ((-0,7 - 0,6 \times (\ln \text{CL})) / \ln 2)) - 20$$

$$\text{IET (PT)} = 10 \times (6 - ((0,42 - 0,36 \times (\ln \text{PT})) / \ln 2)) - 20$$

Onde:

PT: concentração de fósforo total medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

CL: concentração de clorofila a medida à superfície da água, em $\mu\text{g.L}^{-1}$;

ln: logaritmo natural.

O resultado dos valores mensais apresentados nas tabelas do IET será a média aritmética simples, com arredondamento da primeira casa decimal, dos índices relativos ao fósforo total e a clorofila a, segundo a equação:

$$\text{IET} = [\text{IET (PT)} + \text{IET (CL)}] / 2.$$

Figura C. Intensidades de chuva mensais e anuais no Estado de São Paulo em 2013.

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2013).

Figura D. Variação da intensidade de chuva em cada UGRHI em relação às suas respectivas médias históricas

Estado de São Paulo - Variação da Precipitação - Ano 2013

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2013).

Figura E. Intensidades de chuva mensais e anuais no Estado de São Paulo em 2014.

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).

Figura F. Variação da intensidade de chuva em cada UGRHI em relação às suas respectivas médias históricas

Estado de São Paulo - Variação de Precipitação - Ano 2014

Fonte: Relatório de Qualidade das Águas Superficiais no estado de SP (CETESB, 2014).