

LINA ROCÍO DEL PILAR RADA MARTÍNEZ

**Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade
funcional e taxonômica**

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

São Paulo
2017

LINA ROCÍO DEL PILAR RADA MARTÍNEZ

**Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade
funcional e taxonômica**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rada Martínez, Lina Rocío del Pilar

Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade funcional e taxonômica / Lina Rocío del Pilar Rada Martínez; orientador Wellington Luiz Araújo. -- São Paulo, 2017.

122 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia. 2. Rio Tietê. 3. Metagenômica. 4. Diversidade taxonômica e funcional. 5. Ambientes poluídos. I. Araújo, Wellington Luiz, orientador.

II. Título.

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

Candidato(a): Lina Rocío del Pilar Rada Martínez

Título da Tese: Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade funcional e taxonômica.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

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° 586/13 referente ao projeto intitulado: “*Diversidade microbiana da bacia do Rio Tiête: análise metagenômica para prospecção de genes de interesse biotecnológico*” sob a responsabilidade de **Lina Rocío Del Pilar Rada Martínez**, 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 n°196 de 1996.

São Paulo, 27 de março de 2013.

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

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

*Dedico aos meus pais:
As coisas que considero mais
importantes na vida aprendi em casa.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Brasil, minha segunda pátria, e ao povo brasileiro ser sempre tão carinhoso e acolhedor.
- À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de formação.
- Ao meu orientador, Dr. Welington Luiz de Araújo por me brindar a oportunidade de fazer parte da sua equipe no Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana e desenvolver este projeto, agradeço a orientação constante, ensinamentos, confiança e amizade.
- Às agências de fomento CAPES pela bolsa de estudos outorgada e CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa. Agradeço também ao Núcleo de Apoio à Pesquisa NAP-BIOP da Universidade de São Paulo, em especial a Pró-Reitoria de Pesquisa pelo financiamento das primeiras etapas do projeto.
- À secretária do programa Pós- Graduação em Microbiologia Gisele de Graça Santana pela ajuda constante e preocupação com o cumprimento das normas e prazos do programa.
- À equipe da CETESB pela ajuda na seleção dos pontos de amostragem, pelas coletas, análises físico-químicas e apoio permanente durante a realização do projeto.
- A todos os colegas e ex-colegas do LABMEM pela amizade, ajuda, companhia e apoio. Por todos os cafés, bolos e risadas compartilhadas. Um agradecimento especial para Manuela Nóbrega Dourado pelo constante incentivo durante a pesquisa e palavras de apoio nos momentos em que nada dava certo. Também para Leandro Mazza Garrido por ter sempre uma resposta acertada e uma solução rápida para os problemas do dia a dia.
- Às minhas amigas Jennifer e Mabel, pelas longas conversas, pelos conselhos, pela ajuda em experimentos, pelo incentivo diário. Enfim, pela bonita amizade que forjamos e que tenho certeza, será para a vida toda.
- A Eliane Gonçalves da Silva pela amizade, ensinamentos, parceria, conselhos, e por fazer do projeto NAP-Tietê uma realidade.
- À equipe do projeto NAP-Tietê: Eliane, Felipe, Mabel, Simone e Ricardo pelo apoio constante na realização do projeto. Pela amizade e pelas muitas horas e finais de semana

filtrando água do rio Tietê que, sem dúvidas, foram muito mais agradáveis na companhia de vocês.

- À professora Valéria Maia de Oliveira e ao pessoal da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias – CPQBA, pela disponibilização do laboratório para a realização de experimentos e em especial para Alysson Duarte pelo auxílio na montagem das bibliotecas de DNA metagenômico.

- Às minhas estagiárias Lilandra, Juliana, Larissa, Laura, Lorena e Alexis pela ajuda na montagem dos experimentos, pelo comprometimento com o projeto, pelo incentivo e amizade. Agradeço especialmente à Lilandra e Juliana, pelas longas horas que passaram preservando clones.

- À minha mãe Rocío Martínez Hernández (*in memoriam*) por ser meu anjo guardião, o meu exemplo de vida, a minha constante inspiração. Nunca mais caminhei sozinha, ela sempre está guiando os meus passos.

- A meu pai Gildardo Rada Rodríguez pelo amor, apoio incondicional, incentivo constante e ensinamentos em todos os aspectos da vida. Por ser pai e mãe. Por ter me inculcado o gosto e o amor pela ciência, assim como a vontade de aprender e ir atrás dos meus sonhos. Por estar sempre tão orgulhoso de cada uma das minhas conquistas. Por ser também, em grande medida, o artífice desse novo sucesso.

- À pessoa que tem caminhado ao meu lado durante essa jornada, Diego Castillo Franco, muito obrigada pelo amor, confiança, apoio, cumplicidade, companhia e incentivo durante todos esses anos. Obrigada pelas palavras certas e as músicas tocadas nos momentos apropriados. Sem dúvida, você tornou essa experiência no Brasil ainda mais maravilhosa “*Remind me that we’ll always have each other, when everything else is gone*”.

- A minha família pelo carinho e preocupação constantes. Por estarem sempre presentes sem importar a distância.

- A todas as pessoas que conheci no Brasil e que fizeram parte da minha vida nesses últimos anos deixando marca: Jimmito, Ezequiel, Rodolfo, Alejandra, Felipe, Xompa, Romi e Arianna. Obrigada pelos bons momentos compartilhados, pelas discussões e conversas aleatórias, por me deixarem conhecer um pouquinho de cada um de vocês. Agora vocês fazem parte da minha história.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Um agradecimento especial à agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos concedida via programa de Pós-graduação em Microbiologia. Período 04/2013 – 03/2017. Processo No. 1406327.

RESUMO

RADA, L. R. M. **Microbioma da bacia do Rio Tietê: Diversidade funcional e taxonômica.** 2017. 122 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Rio Tietê é o principal rio do Estado de São Paulo e um dos mais contaminados do país. Este rio nasce no município de Salesópolis, na serra do mar, e flui para o interior do Estado, percorrendo 1.136 km até desaguar no rio Paraná. No seu percurso recebe uma grande quantidade de poluentes industriais e esgoto doméstico que alteram as suas condições físico-químicas, levando a possíveis mudanças na composição e funcionamento das comunidades microbianas presentes. Partindo de estudos de diversidade taxonômica ao longo da bacia do Rio Tietê, quatro locais contrastantes foram selecionados para análises funcionais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar através de análise metagenômica, a diversidade taxonômica e funcional de micro-organismos planctônicos em quatro pontos contrastantes da Bacia do Rio Tietê e identificar genes e vias metabólicas de interesse biotecnológico e/ou envolvidos em adaptação microbiana a esse ambiente. Os perfis taxonômicos e funcionais apontaram à existência de diferenças relacionadas ao local de amostragem. Técnicas dependentes de cultivo, demonstraram diferenças taxonômicas entre micro-organismos isolados de pontos com diferentes níveis de poluição, sugerindo a existência de alterações nas comunidades microbianas em resposta à presença de poluentes na água e no sedimento. A caracterização da comunidade bacteriana ao longo da bacia, assim como a avaliação da capacidade dos micro-organismos para tolerar os poluentes presentes no rio foram avaliadas por métodos dependentes e independentes de cultivo. Mil e quarenta e seis bactérias isoladas de água e do sedimento do rio foram testadas frente a sua capacidade para tolerar altas concentrações dos metais tóxicos cádmio e níquel; os resultados mostraram que 9% desses isolados possuem a capacidade de crescer em concentrações de 4 mM, valor 400 vezes acima do limite permitido pelo CONAMA em corpos d' água. A tolerância a níquel e cádmio também foi avaliada em bibliotecas construídas com DNA metagenômico de amostras de água e sedimento do rio, onde foram detectados sete clones capazes de tolerar 1 mM de cádmio. Os resultados apresentados apontam a influência das características ambientais na composição e funcionamento das comunidades microbianas em ambientes lóticos. A análise metagenômica junto com a construção de bibliotecas de DNA metagenômico resultou em uma estratégia adequada para a busca por genes de interesse biotecnológico e/ou envolvidos em interações ecológicas.

Palavras chave: Ambientes lóticos. Rio Tietê. Poluição da água. Metagenômica. Diversidade microbiana. Diversidade funcional. Tolerância a metais tóxicos.

ABSTRACT

RADA, L. R. M. **Microbiome of the Tietê River basin: Functional and taxonomic diversity**. 2017. 122 p. PhD Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The Tietê River is the most important river of the State of São Paulo, in the southeastern of Brazil; it is also one of the most contaminated rivers of the country. On its watercourse, the river receives large amounts of anthropogenic and industrial pollutants that can alter the environmental conditions of the water, leading to possible shifts in the microbial diversity. Starting from previous studies aimed to study microbial diversity along the Tiete River basin, four sites were chosen for metagenomic analyses to characterize the taxonomic and functional diversity of microorganisms in selected locations and its correlation with the environmental factors. The results showed taxonomic and functional differences related to the sampling site and water quality. Clear differences in functional profiles between the sampling sites may indicate adaptation of the community to the environmental conditions. The characterization of the bacterial community along the basin and its ability to tolerate toxic pollutants within the river were evaluated by dependent and independent cultivation techniques. One thousand and forty-six bacteria isolated from water and sediment samples were tested against their ability to tolerate high concentrations of the toxic metals cadmium and nickel. The results showed that 9% of these isolates have the capacity to grow at 4 mM of these metals. That concentration of metal its 400 times the limit allowed by CONAMA in water bodies. The tolerance to nickel and cadmium was also evaluated in clone libraries constructed with metagenomic DNA from the river. Seven clones exhibit the capacity to tolerate 1 mM of cadmium. The results show the influence of environmental characteristics on the composition and functioning of microbial communities in lotic environments. The metagenomic analysis along with the construction of metagenomic DNA libraries is very useful approach when prospecting genes of biotechnological concern and/or involved in ecological interactions.

Keywords: Lotic environments. Tietê River. Water pollution. Metagenomics. Microbial diversity. Functional diversity. Heavy metal tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGHRIs) por vocação econômica.....	20
Figura 2 - Mecanismos postulados de resistência/tolerância a metais em microorganismos.....	29
Figura 3 – Valores médios anuais da concentração de cádmio em dois pontos de amostragem de cada UGRHI.....	32
Figura 4 – Valores médios anuais da concentração de níquel em dois pontos de amostragem de cada UGRHI.....	33
Figura 5 – Localização dos pontos de amostragem.....	40
Figura 6 - População bacteriana presente nas amostras de água nas duas temporadas avaliadas.....	51
Figura 7 - Características morfológicas dos isolados bacterianos em pontos do rio com diferentes qualidades de água.....	52
Figura 8 – Gêneros bacterianos identificados em diferentes locais ao longo do Rio Tietê....	53
Figura 9 – Concentração dos metais Cádmio (Cd) e Níquel (Ni) na água e abundância de bactérias tolerantes a concentrações de até 4 mM isoladas de 33 pontos de amostragem ao longo da bacia.....	55
Figura 10 – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) de DNA genômico	57
Figura 11 – a) Eletroforese em gel de agarose 1%. DNA genômico de amostras de selecionadas para análise metagenômica	58
Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de água para análise metagenômica.....	60
Figura 13 - Filos e classes do filo Proteobacteria mais abundantes nos diferentes pontos de amostragem ao longo do rio.....	62
Figura 14 – Abundância relativa no nível de ordem nos diferentes pontos de amostragem ao longo do rio	64
Figura 15 – Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil taxonômico das amostras de água no nível de filo.....	66
Figura 16 – <i>Heatmap</i> demonstrando o perfil funcional de amostras de água de diferentes pontos do rio, baseado no nível 1 do SEED-Subsystems.....	68

Figura 17 – Categorias funcionais estatisticamente diferentes em cada ponto de amostragem.....	70
Figura 18 – Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil funcional das amostras de água no nível 1 do SEED-Subsystems.....	71
Figura 19 – Abundância de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio (nível 1 SEED-Subsystems) em pontos de amostragem com diferentes concentrações de nitrogênio.....	72
Figura 20 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do nitrogênio analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems.....	73
Figura 21 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do enxofre analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems.....	74
Figura 22 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do carbono, analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems.....	75
Figura 23 – Abundância de genes relacionados à degradação de polissacarídeos.....	77
Figura 24 – Abundância de genes associados a Glicosil Hidrolases (GHs) detectados no metagenoma de diferentes pontos de amostragem	78
Figura 25 – Diferenças na abundância de genes associados à resistência a antibióticos e compostos tóxicos no nível 2 do SEED-Subsystems.....	79
Figura 26 – Abundância de genes associados à resistência a metais tóxicos detectados nos metagenomas de amostras de água de diferentes pontos do rio.....	80
Figura 27 – Abundância relativa dos filos e classes de Proteobacteria nas amostras de sedimento ao longo do rio.....	83
Figura 28 – Validação das bibliotecas metagenômicas.....	85
Figura 29 – Seleção de clones resistentes a metais tóxicos.....	87

Figuras em anexo

Figura 1A - Filos menos abundantes no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos ao longo do rio.....	112
Figura 2A - Abundância de famílias que mostraram diferenças no táxon Ordem, detectadas no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio.....	112
Figura 3A - Abundância relativa de famílias pertencentes à ordem Actinomycetales detectadas no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio.....	113
Figura 4A - Abundância relativa das ordens detectadas no metagenoma de amostras de sedimento de diferentes locais do rio.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das amostras de água selecionadas para análise metagenômica.....	44
Tabela 2 – Unidades formadoras de colônia quantificadas nas amostras de água, nas duas temporadas de amostragem.....	50
Tabela 3 – Unidades formadoras de colônia quantificadas nas amostras de sedimento, nos dois anos de amostragem.....	52
Tabela 4 – Parâmetros avaliados pela CETESB para calcular o IQA em amostras de água..	59
Tabela 5 – Resultados do sequenciamento do metagenoma de amostras de água do Rio Tietê.....	61
Tabela 6 – Classificação taxonômica dos 50 Gêneros bacterianos mais abundantes em amostras de água do rio Tietê.....	65
Tabela 7 – Índices de diversidade e estimadores de riqueza calculados em amostras de água de diferentes pontos do rio Tietê.....	67
Tabela 8 – Enzimas associadas aos processos de glicólise e gluconeogênese detectadas no metagenoma de amostras de água do rio Tietê e abundância em cada ponto de amostragem.....	76
Tabela 9 – Parâmetros físico-químicos avaliados pela CETESB nas amostras de sedimento.....	81
Tabela 10 - Resultados do sequenciamento do metagenoma de amostras de sedimento.....	82
Tabela 11 – Índices de diversidade calculados em diferentes pontos de sedimento.....	84
Tabela 12 – Clones com tolerância aos metais tóxicos Cd e Ni detectados nas bibliotecas metagenômicas.....	86

Tabelas em anexo

Tabela 1A – Parâmetros físico-químicos das amostras de água nos dois anos de coleta.....	114
Tabela 2A – Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento nos dois anos de coleta.....	117
Tabela 3A – Parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de água selecionadas para análise metagenômica.....	118

Tabela 4A – Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento selecionadas para análise metagenômica..... 119

Tabela 5A – Abundância de genes associados à tolerância a metais tóxicos no nível de função do SEED-*Subsystem* detectados no metagenoma de amostras de água..... 120

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

As	Arsênio
Cd	Cádmio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CQS	Critério de Qualidade do Sedimento
Co	Cobalto
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
Cr	Cromo
Cu	Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
gDNA	DNA genômico
Hg	Mercúrio
IQA	Índice de Qualidade da Água
LB	Meio Luria Bertoni
Mg	Magnésio
MG-RAST	Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology
N	Nitrogênio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni	Níquel
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
ORP	Potencial de Oxi-Redução
PAST	Paleontological Statistics Software Package
Pb	Chumbo
PCA	Análise de Componentes Principais
PCJ	Piracicaba Capivari Jundiáí
PCoA	Análise de Coordenadas Principais
PFGE	Pulsed Field Gel Electroforesis
STAMP	Statistical Analysis of Metagenomic Profiles
T-RLFP	Terminal Restriction Fragments Length Polymorphism
TS	Triptona de Soja
TSA	Agar Triptona de Soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UGRHI	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Bacia Hidrográfica do rio Tietê	19
2.2	Comunidades bacterianas em ambientes aquáticos de água doce	22
2.3	O microbioma de águas urbanas	25
2.4	Contaminação da água com metais tóxicos e mecanismos de resistência/tolerância em micro-organismos	26
2.5	Ocorrência de metais tóxicos ao longo da bacia do Rio Tietê	31
2.6	Caracterização de comunidades bacterianas	34
2.7	Potencial biotecnológico de comunidades microbianas	36
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Locais de amostragem e métodos de coleta	40
4.2	Análises físico-químicas	41
4.3	Processamento das amostras	41
4.4	Organização da coleção de culturas de sedimento e água dos Rios Tietê e isolamento de micro-organismos	41
4.5	Avaliação do crescimento dos isolados bacterianos em altas concentrações de metais tóxicos	42
4.6	Seleção dos pontos de amostragem para análise metagenômica	42
4.7	Extração de DNA genômico (gDNA) de amostras de água e sedimento para sequenciamento	44
4.8	Análise metagenômica	45
4.9	Obtenção de bibliotecas de fragmentos de DNA metagenômico em foscídios	46
4.10	Extração de DNA fosmidial para validação das bibliotecas metagenômicas	46
4.11	Caracterização clones das bibliotecas metagenômicas de água e sedimento do Rio Tietê quanto à tolerância aos metais Cd e Ni	47
4.12	Análises estatísticas	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Parâmetros físico-químicos das amostras de água e sedimento	49
5.2	População bacteriana cultivável nas amostras de água e sedimento de diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Tietê	50
5.3	Avaliação da tolerância a altas concentrações de metais tóxicos de bactérias isoladas do Rio Tietê	54

5.4	Padronização do método de extração para a obtenção de DNA de alto peso molecular.	56
5.5	Parâmetros físico-químicos das amostras de água para análise metagenômica.	58
5.6	Análise metagenômica das amostras de água	60
5.6.1	<i>Composição taxonômica das amostras de água</i>	61
5.6.1.1	<i>Índices de diversidade</i>	67
5.6.2	<i>Análise funcional das amostras de água</i>	67
5.6.2.1	<i>Metabolismo do nitrogênio</i>	71
5.6.2.2	<i>Metabolismo do enxofre</i>	73
5.6.2.3	<i>Ciclo do carbono e obtenção de energia</i>	74
5.6.2.3.1	<i>Glicólise e gliconeogênese</i>	76
5.6.2.3.2	<i>Produção de Hidrolases</i>	76
5.6.2.4	<i>Resistência a metais</i>	78
5.7	Construção de bibliotecas metagenômicas e prospecção de clones resistentes aos metais Cd e Ni.	81
5.7.1.1	<i>Índices de diversidade</i>	84
5.7.2	<i>Construção de bibliotecas com DNA metagenômico</i>	84
5.7.3	<i>Identificação de clones resistentes a metais tóxicos nas bibliotecas metagenômicas de água e sedimento do Rio Tietê.</i>	86
6	DISCUSSÃO	88
6.1	Composição e funcionamento das comunidades microbianas ao longo do rio	88
6.2	Tolerância a metais	94
7	CONCLUSÕES	97
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A água é fundamental para a manutenção do planeta Terra e para os seres vivos que nele habitam. Neste contexto, a água doce é um recurso importante para os seres humanos, pois está relacionada com todas as atividades sociais, econômicas e ambientais, sendo um fator limitante para o desenvolvimento social e tecnológico. Dentre os corpos d'água doce existentes, os rios se constituem como colunas dorsais para o desenvolvimento de municípios e cidades; como observado para o Rio Tietê que é o principal rio do Estado de São Paulo, percorrendo 1136 km desde a sua nascente, no município de Salesópolis, próximo à serra do mar a leste, até a sua foz no rio Paraná a oeste. Por ser o principal rio do Estado, o Tietê virou o eixo de crescimento e desenvolvimento das cidades, trazendo como consequência a necessidade das administrações públicas adotarem uma política de utilização do rio apenas como fonte de produção de energia e como veículo transportador de esgoto. Neste contexto, atualmente são despejadas no Rio Tietê mais de 700 toneladas de esgoto doméstico e industrial por dia, e embora, estejam sendo realizados esforços para despoluir o rio, muito ainda precisa ser feito.

Em condições normais, os rios são capazes de degradar as cargas poluidoras de origem orgânica que recebem em um processo conhecido como autodepuração. Isto ocorre graças à existência de micro-organismos, que cumprem a função de decompor a maior parte da matéria orgânica presente no corpo hídrico. Quando a degradação é completa, o rio volta a seu estado inicial, considerando apenas aspectos físico-químicos. Na cidade de São Paulo, a grande quantidade de esgoto lançado diariamente, somada à retificação sofrida pelo rio entre os anos 1930 e 1950, impedem que existam as condições adequadas para que os processos de autodepuração e diluição ocorram. No entanto, alguns quilômetros após deixar a Grande São Paulo o rio começa a encontrar as condições apropriadas para que esses processos ocorram, permitindo por tanto, a restauração do rio. Entretanto, estudos demonstrando a variação taxonômica e funcional da comunidade microbiana no Rio Tietê são ainda escassos, não sendo possível avaliar o impacto dos poluentes sobre a diversidade taxonômica e funcional desta comunidade.

Estudos prévios apontam para uma possível mudança na diversidade microbiana presente nos diferentes ecossistemas em função da atividade humana, levando a possível extinção de espécies capazes de promover a manutenção destes ambientes e o equilíbrio ecológico. Dessa forma, estudos de monitoramento desta biodiversidade se justificam, visto

que à medida que diferentes alterações ambientais ocorrem, a estrutura das comunidades microbianas presentes pode ser alterada, uma vez que a densidade populacional e a diversidade são reguladas por fatores como fotoperíodo, temperatura e demanda por nutrientes. Essas variações podem ser determinantes para a distribuição de espécies de microorganismos ao longo do rio e em diferentes períodos. Assim sendo, impactos ambientais como o descarte de efluentes não tratados contribuem para a rápida alteração desses ecossistemas, podendo introduzir espécies com potencial patogênico ou eliminando espécies com funções metabólicas/ecológicas importantes para o ambiente.

Em função das pressões ambientais é plausível imaginar que algumas vantagens sejam conferidas às espécies remanescentes justificando a realização de estudos que permitam entender o funcionamento da comunidade e identificar a presença de genes ou características interessantes do ponto de vista biotecnológico. Tendo em vista que as técnicas dependentes de cultivo permitem acessar menos de 1% da diversidade total de determinado ambiente, a abordagem metagenômica, de diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Tietê, possibilita a análise dos mecanismos adaptativos associados aos fatores ambientais que influenciam as comunidades microbianas nos diferentes ambientes de corpos de água doce, permitindo a elaboração de hipóteses a respeito das inter-relações entre membros desta comunidade ou a prospecção de funções de interesse prático e/ou de novas funções e/ou metabólitos que poderiam ser de importância em diferentes áreas da biotecnologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bacia Hidrográfica do rio Tietê

O rio Tietê nasce na Serra do Mar, porém, flui para o interior do estado de São Paulo percorrendo 1.136 km até desaguar no rio Paraná (DEPARTAMENTO DE ÁGUAS E ENERGIA ELÉTRICA - DAEE, 2011). A bacia, com uma população aproximada de 25 milhões de pessoas, é importante para o abastecimento de água e produção de energia, tendo mais de dez usinas hidroelétricas ao longo do seu percurso (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011). A bacia hidrográfica do Rio Tietê banha 62 municípios ribeirinhos e compreende seis sub-bacias, conhecidas como Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), sendo elas: Alto Tietê, Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ), Tietê Sorocaba, Tietê Jacaré, Tietê Batalha e Baixo Tietê (DAEE, 2011; PAGANINI, 2008). Estas UGRHs do Estado de São Paulo são classificadas tendo com base a atividade econômica de

cada região (Fig. 1), permitindo assim, prever o impacto causado por cada região à qualidade do rio Tietê.



Figura 1 – Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHIS) por vocação econômica. A Bacia Hidrográfica do Rio Tietê está composta pelas UGRHIS 6-Alto Tietê; 5-Tietê Sorocaba; 10-Piracicaba/Capivari/Jundiaí; 13-Tietê Jacaré; 16- Tietê Batalha; 19-Baixo Tietê. Fonte: CETESB, 2016.

Com o crescimento da população e o consequente desenvolvimento industrial e agrícola, a água e o sedimento do rio têm sido sistematicamente contaminados, ocasionando sérios impactos sobre a fauna, flora e comunidade microbiana associada ao rio e à mata ciliar (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011). A Região do Alto Tietê compreende uma área drenada pelo rio, desde sua nascente em Salesópolis, numa área preservada de Mata Atlântica, até a Barragem de Rasgão próximo ao município de Pirapora do Bom Jesus. Esta área de 5.985 km² constituída por 34 municípios, incluindo a Região Metropolitana de São Paulo, é a região onde o rio recebe a maior parte dos poluentes industriais e esgoto doméstico (CETESB, 2015). O lançamento desses poluentes inicia-se a escassos 45 km da nascente, na cidade de Mogi das Cruzes (DAEE, 2011) e quando chega à cidade de São Paulo, o rio recebe aproximadamente 700 toneladas diárias de esgoto, fazendo com que a qualidade da água na região seja classificada como péssima (CETESB, 2016a) e o rio considerado “morto” (PAGANINI, 2008), devido a ausência de oxigênio dissolvido.

O lançamento de esgoto doméstico e industrial sem tratamento, ou parcialmente tratado, é uma das principais causas da poluição das águas no Estado de São Paulo. A redução da qualidade das águas dos rios, reservatórios, estuários e regiões costeiras restringe o seu uso, contribuindo para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, que podem ser

causadas pela ingestão de água contaminada ou pelo contato direto com ela (CETESB, 2015). Apesar do percentual de coleta de esgoto estar classificado como satisfatório, as sub-bacias do Alto Tietê e PCJ (Piracicaba, Capivari e Jundiá), maiores geradoras de esgoto no Estado, contam com os menores percentuais de coleta, uma situação que se agrava ainda mais quando são considerados os percentuais de tratamento. Ou seja, as maiores geradoras de cargas orgânicas são as que menos tratam o esgoto coletado. A carga orgânica lançada diariamente nos corpos d'água da região chega a 1.366.305 Kg DBO_{5,2}/dia, sendo que o Alto do Tietê e PCJ contribuem com 72,8% e 18,5%, respectivamente (CETESB, 2015).

No ano de 1991 foi posto em andamento o Projeto Tietê, cujo objetivo era coletar e tratar o esgoto da região metropolitana de São Paulo e com isso melhorar a qualidade da água do rio (DEVKOTA; IMBERGER, 2012). O projeto que estava planejado para terminar em 2016 tinha como meta a coleta e tratamento de 87% e 84%, respectivamente. Segundo dados da Sabesp, na área metropolitana de São Paulo, 87% do esgoto é atualmente coletado, as apenas 68% desse total é tratado. Entretanto, mesmo que os objetivos não tenham sido plenamente alcançados, a mancha de poluição, trecho do rio considerado “morto” devido à baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, diminuiu 86,6% desde o início do projeto. Naquela época, a mancha de poluição do rio era de 530 km, começando em Mogi das Cruzes e se estendendo até o reservatório de Barra Bonita, hoje é de 137 km. No entanto, a porcentagem de esgoto tratado caiu de 70% para 68% entre 2008 e 2014 (AFIUNE; MOTA, 2015; RIBEIRO, 2016; SOS MATA ATLÂNTICA, 2016), demonstrando que o aumento na capacidade de tratamento do esgoto está abaixo da taxa de crescimento de produção deste efluente.

As águas da região Tietê/Sorocaba carregam, em menor concentração, contaminantes industriais provenientes do Alto Tietê, no entanto, por se tratar de uma região dedicada à agricultura, a maior parte dos contaminantes despejados na bacia é de tipo agrícola e doméstico (PAGANINI, 2008). Segundo dados da CETESB, boa parte dos pontos analisados nessa parte do rio apresentam qualidade de água ruim a regular (CETESB, 2016a).

Os poluentes gerados nas sub-bacias do Alto Tietê, PCJ e Tietê/Sorocaba são todos descarregados no Reservatório de Barra Bonita. Neste contexto, antes mesmo de chegar no reservatório de Barra Bonita, as águas do rio Tietê recuperam seu aspecto de rio limpo, atividades de pesca e navegação são frequentes nessa região do rio. As sub-bacias Tietê/Jacaré, Tietê/Batalha e Baixo Tietê, a jusante do reservatório, apresentam menor densidade populacional e atividades econômicas relacionadas com pesca e agricultura

(PAGANINI, 2008). As águas dessa região apresentam qualidades boas ou ótimas (CETESB, 2016a), mostrando que a maior parte da matéria orgânica despejada no rio é degradada no seu percurso a jusante da cidade de São Paulo.

Apesar da qualidade da água ser classificada como boa, em geral apresenta altos índices de coliformes fecais, fosfato total e metais como Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Cobre (Cu), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) (CETESB, 2016). O reservatório de Barra Bonita possuía até algumas décadas atrás, a capacidade para assimilar os poluentes e fornecer água recuperada à jusante. Porém, o constante aumento de lançamento de poluentes provenientes de atividades humanas e industriais tem promovido a deterioração das suas águas (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011), mostrando que medidas de controle da emissão e tratamento dos poluentes devem continuar a serem implementadas.

2.2 Comunidades bacterianas em ambientes aquáticos de água doce

A água é uma das substâncias mais comuns encontradas na natureza, cerca de 70% da superfície do planeta está coberta por ela, sendo encontrada em várias formas e estados físicos. Por meio do ciclo hidrológico a água permanece em constante circulação fazendo dela um recurso natural renovável (VÖRÖSMARTY et al., 2010). Embora a maior parte do planeta esteja coberta por água, menos de 3% desta água é doce, sendo 97% restante corresponde à água dos oceanos. A água doce é de importância vital para a manutenção dos ecossistemas e é um elemento essencial para o abastecimento humano e ao desenvolvimento de suas atividades econômicas (DUDGEON et al., 2006).

Os reservatórios de água doce como as nascentes, córregos, rios, reservatórios e lagos são importantes do ponto de vista ecológico para a manutenção dos ecossistemas, por desempenhar um papel essencial no armazenamento e transformação da matéria orgânica terrestre, processo conhecido como ciclagem biogeoquímica de nutrientes (COLE et al., 2007). Esses ambientes também são os responsáveis por fornecer água para consumo, além de serem fonte econômica para pescadores e agricultores quando usados para irrigação; são também utilizados na indústria, na produção de energia hidrelétrica, e inclusive para transporte e recreação (SAVIO et al., 2015; ZINGER; GOBET; POMMIER, 2012).

Para entender a ciclagem de nutrientes em qualquer ecossistema, é necessário referir-se aos micro-organismos presentes no ambiente, pois eles são os responsáveis por catalisar as reações biogeoquímicas (GRAHAM et al., 2016; MADSEN, 2011; NEWTON; MCLELLAN,

2015). A transformação da matéria orgânica envolve processos de oxidação e redução que são realizados em conjunto pelos micro-organismos nativos. É importante salientar que os ciclos de carbono (C), nitrogênio(N), enxofre(S) e outros elementos estão intimamente ligados. Por exemplo, à medida que formas reduzidas de carbono são oxidadas em um habitat livre de oxigênio, o fluxo de elétrons pode eventualmente ser usado pelas comunidades microbianas presentes, para reduzir nitrato a N_2 (desnitrificação) ou sulfato a sulfeto (redução de sulfato) ou dióxido de carbono (CO_2) a metano (CH_4) (metanogênese) (MADSEN, 2011), sendo essa ciclagem de nutrientes realizada por vários tipos de micro-organismos, presentes em uma comunidade, atuando em sinergismo.

As comunidades microbianas podem ser descritas em termos de níveis de diversidade (riqueza e uniformidade) e composição (táxons e genes presentes). A avaliação da primeira tem sido explorada em diversos tipos de ambientes, analisando como a diversidade das comunidades presentes é afetada pelas mudanças ambientais. No entanto, muitos desses estudos se limitam a descrever a diversidade das comunidades sem analisar a sua composição, provavelmente devido às tecnologias disponíveis na época. Com a popularização das técnicas de sequenciamento de DNA em larga escala, a composição e funcionamento das comunidades microbianas começaram a ser reveladas (VAN ROSSUM et al., 2015).

Sendo os componentes principais das comunidades biológicas aquáticas, as bactérias são as responsáveis pela transformação dos nutrientes e são consideradas essenciais para o fluxo de energia nesses ambientes (NEWTON et al., 2011; NEWTON; MCLELLAN, 2015). A atividade microbiana impulsiona a decomposição da matéria orgânica, a respiração do ecossistema, e o fluxo de carbono para os níveis tróficos superiores. Além disso, processos como a nitrificação, a desnitrificação e a fixação de nitrogênio, realizados pelas bactérias, podem afetar a qualidade da água a jusante nos rios e córregos (ZEGLIN, 2015).

Diversos estudos realizados em ambientes lóticos (nascentes, córregos e rios) e lênticos (lagos e reservatórios) demonstraram a existência de uma microbiota típica de ecossistemas aquáticos de água doce (SAVIO et al., 2015). Os principais filos encontrados são Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Verrucomicrobia. Sendo os dois primeiros os mais abundantes (ÁVILA et al., 2017; NEWTON et al., 2011; NEWTON; MCLELLAN, 2015; REN et al., 2016; VAN ROSSUM et al., 2015; ZWART et al., 2002). Até alguns anos atrás, as pesquisas que visavam analisar a resposta da microbiota aquática aos fatores ambientais estavam direcionadas aos ambientes lênticos (FISHER et al., 2015; NEWTON et al., 2011; ZEGLIN, 2015), no entanto, nos últimos anos, estudos analisando a

composição taxonômica e funcional ao longo de rios, córregos e nascentes começaram a ser publicados (MA et al., 2016; MEZITI et al., 2016; SAVIO et al., 2015; VAN ROSSUM et al., 2015), revelando aspectos ainda não conhecidos acerca dos mecanismos que influenciam esta diversidade.

Dependendo das suas características, os corpos d'água doce podem ser mais ou menos susceptíveis às condições climáticas, às mudanças ambientais ou à contaminação antrópica. Alterações nas características físico-químicas da água ou na concentração dos nutrientes disponíveis podem afetar as comunidades microbianas existentes, mudando parcial ou totalmente a sua estrutura (HU et al., 2014; MEZITI et al., 2016; STALEY et al., 2015a; ZEGLIN, 2015). Um estudo realizado no Rio Kalamas na Grécia, que atravessa áreas preservadas e áreas susceptíveis a contaminação antropogênica, mostrou a existência de diferenças na composição das comunidades microbianas. As amostras influenciadas pela contaminação antropogênica mostraram prevalência da classe Gammaproteobacteria. Já as amostras provenientes de áreas preservadas, mostraram maiores abundâncias da classe Betaproteobacteria e do filo Actinobacteria, característico de ambientes não impactados (MEZITI et al., 2016). A contaminação da água com substâncias tóxicas como metais pesados também pode ter efeitos negativos na diversidade. Um estudo realizado no Rio Tiaozi na China analisou, pela técnica de Electroforese em Gel de Gradiente Denaturante (DGGE), as comunidades bacterianas antes e depois de atravessar locais aonde são despejadas altas concentrações de Zn e Arsênio (As). A análise mostrou mudanças significativas na composição da comunidade depois de atravessar a região contaminada. Em locais não contaminados houve ocorrência de Clostridiales não cultiváveis, *Microbacterium* sp., *Clostridium* sp., e representantes não cultiváveis da família Sinobacteraceae, que depois não foram mais detectados. As espécies bacterianas que se mostraram dominantes em regiões contaminadas foram *Acinetobacter johnsonii*, *Clostridium cellulovorans*, encontradas também nas regiões não poluídas, e a espécie *Trichococcus pasteurii*, exclusiva dos pontos contaminados (ZHAO et al., 2014).

Estudos prévios realizados NAP-BIOP, ICB/USP analisaram a composição das comunidades bacterianas (LIMA, 2015) e fúngicas (ORTIZ, 2015) ao longo da bacia do rio Tietê, utilizando a técnica de Polimorfismo na Extensão de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RLFP). Nesses trabalhos também foi analisado o efeito dos parâmetros ambientais sob a diversidade e riqueza das comunidades autóctones. Os resultados demonstraram uma grande influência das condições ambientais na composição e estruturação

das comunidades microbianas. A análise das comunidades bacterianas presentes no rio, realizada também por sequenciamento do gene 16S rRNA, evidenciou uma alta influência do local de amostragem na estruturação da comunidade, a qualidade da água, que mostrou um certo grau de influência, não foi determinante nesse aspecto. Por outro lado, a temperatura, foi um fator determinante na riqueza e diversidade bacteriana ao longo do rio (LIMA, 2015). Quanto às comunidades fúngicas presentes no rio, foi determinado que fatores físico-químicos como temperatura, condutividade, nitrato e Oxigênio Dissolvido (OD), são determinantes na estruturação das comunidades de fungos. A detecção de grupos específicos em ambientes oligotróficos sugere que os contaminantes presentes no rio podem ter impacto nesses grupos alterando, portanto a riqueza da comunidade (ORTIZ, 2015).

2.3 O microbioma de águas urbanas

O desenvolvimento da humanidade trouxe consigo o crescimento da população e conseqüentemente a construção de grandes cidades (KING, 2014). As áreas urbanas demandavam grandes quantidades de água, fazendo com que fosse necessária a implementação de tecnologias capazes de captar e, posteriormente, tratar o esgoto para evitar a contaminação das fontes de água disponíveis para consumo. Embora, em muitos casos, essas tecnologias consigam reduzir eficientemente a carga orgânica lançada nos corpos d'água, resíduos humanos ainda são encontrados nos sistemas hídricos urbanos (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). Nas economias emergentes, as cidades crescem antes de terem sido desenvolvidas infraestruturas hidráulicas suficientes para lidar com as necessidades de abastecimento e eliminação das águas residuais. Esta falta de infraestrutura afeta significativamente os sistemas de águas superficiais e subterrâneas, tornando-as vulneráveis à poluição (MAZARI-HIRIART et al., 2014).

A urbanização pode alterar o funcionamento dos ecossistemas ao longo das bacias hidrográficas devido ao lançamento de diferentes tipos de efluentes, e ao escoamento das águas pluviais (NEWTON; MCLELLAN, 2015). A ocorrência de bactérias patogênicas na água está comumente associada a falhas nos sistemas de tratamento de esgoto (IBEKWE; MA; MURINDA, 2016).

O despejo de esgoto doméstico produz um aumento na disponibilidade de nutrientes nas águas, essa concentração elevada de matéria orgânica pode alterar a composição da microbiota e as associações bacterianas nestes ecossistemas (NEWTON; MCLELLAN,

2015), visto que disponibiliza novos nichos e reduz a competitividade por nutrientes. Já o lançamento de efluentes industriais, introduz substâncias químicas recalcitrantes, geralmente tóxicas para os animais, plantas e micro-organismos presentes no corpo d'água, prejudicando a sua sobrevivência. Mudanças na disponibilidade de nutrientes ou presença de poluentes industriais, além de afetar as comunidades bacterianas repercutem também na ciclagem dos nutrientes (HALE et al., 2014). Devido às pressões ambientais e grande variedade de substratos disponíveis em ambientes aquáticos contaminados, poderia se pensar que as comunidades bacterianas sejam diversas e dinâmicas (IBEKWE; MA; MURINDA, 2016), no entanto, a densidade bacteriana na água pluvial e no esgoto doméstico é muito mais alta do que nos corpos hídricos receptores, e pode deixar marcas significativas nas comunidades bacterianas nativas, sobrevivendo apenas as mais adaptadas (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015).

Quanto à composição das comunidades microbianas nos ecossistemas aquáticos urbanos, as bactérias fecais não são os únicos micro-organismos a entrar nos sistemas de esgoto sanitário. Estes sistemas também coletam e agregam microbiota associada aos resíduos de águas cinzas, tais como os da pele humana e da cavidade oral, resíduos alimentares e resíduos industriais (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). Micro-organismos presentes na atmosfera, no solo, em associação com animais e nas construções urbanas, terminam sendo arrastados pela água de chuva e depositados nos rios e córregos (FISHER et al., 2015; KING, 2014). Em média, cerca de 35% da comunidade microbiana encontrada no esgoto urbano é composta por apenas cinco gêneros bacterianos: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Pseudomonas* pertencentes ao filo Proteobacteria, e *Trichococcus* representante do filo Firmicutes (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). A interface água urbana/micro-organismos também pode beneficiar o fluxo de genético entre as comunidades microbianas. As bactérias resistentes e multirresistentes estão associadas às populações humanas e, tanto em águas residuais não tratadas, quanto nos efluentes sanitários tratados é comum encontrar bactérias resistentes a diferentes tipos de antibióticos (AMOS et al., 2014; GARCÍA-ARMISEN et al., 2014; ORTIZ DE GARCÍA et al., 2014).

2.4 Contaminação da água com metais tóxicos e mecanismos de resistência/tolerância em micro-organismos

Os metais são componentes naturais dos ambientes aquáticos, contudo, seus níveis têm aumentado gradativamente nos últimos anos devido às atividades domésticas, industriais,

mineradoras e agrícolas (SAMAD et al., 2015). A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos com metais é um assunto que tem ganhando cada dia mais importância, principalmente devido à toxicidade, persistência no meio ambiente e à absorção e acumulação no corpo humano (WANG et al., 2013). O cádmio, por exemplo, pode interferir no metabolismo de nutrientes essenciais para o organismo como as vitaminas E e C, além de ser extremamente tóxico para as células (AB RAZAK et al., 2015). O comportamento dos metais tóxicos nos corpos d'água responde à constituição do sedimento e à composição química da água. Durante o transporte ao longo do rio, estes contaminantes podem sofrer diversas alterações devido aos processos de dissolução, sorção ou complexação, afetando a sua natureza e/ou biodisponibilidade (ISLAM et al., 2015).

As fontes antrópicas de metais pesados derivadas de atividades econômicas como mineração, metalurgia, indústria petroquímica, indústria eletrônica, assim como as provenientes de resíduos urbanos, são descarregadas nos ecossistemas aquáticos. Estando presentes nos corpos d'água, estes elementos podem ser bioacumulados pelos organismos nativos e biomagnificados através da cadeia alimentar, sendo encontrados em concentrações elevadas nos organismos predadores (SAMAD et al., 2015; WANG et al., 2013). O Rio Yamuna na Índia é um dos rios mais contaminados do país, tendo sido verificadas altas concentrações de metais tóxicos na água, entre eles Zn, Cr, Cd e Ni. Essa contaminação com metais está relacionada com a alta quantidade de indústrias localizadas na margem do rio, e que despejam o esgoto direto na água sem nenhum tipo de tratamento (NEETA; MAANSI; HARPREET, 2016). Da mesma forma, o rápido crescimento e industrialização em muitas cidades da China têm trazido como consequência a contaminação das áreas costeiras com altas concentrações de metais tóxicos. Tal contaminação não apenas destrói ecossistemas marinhos como recifes de coral e mangues, mas também afeta a indústria pesqueira presente na região (WANG et al., 2013).

Os metais cumprem um papel fundamental nos processos biológicos dos micro-organismos sendo muitos deles essenciais ao metabolismo, existindo sítios específicos de ligação dentro da célula (DOPSON et al., 2014). Metais como Fe, Cu e Ni participam de processos de oxidação-redução. O magnésio (Mg) e o Zn estão envolvidos na estabilização de enzimas e do DNA através de forças eletrostáticas. Outros metais são denominados como não essenciais, entre eles Cd, Pb e mercúrio (Hg), por não possuírem nenhuma função conhecida nas células (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Essenciais ou não, os metais em altas concentrações podem ser tóxicos para os micro-organismos (DOPSON et al., 2014). Os

metais não essenciais também podem apresentar alta afinidade pelos sítios específicos na célula, competindo com os metais essenciais. Uma vez ligados às moléculas alvo, podem alterar a estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas ou interferir nos processos de fosforilação oxidativa e equilíbrio osmótico (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

Alterações nas comunidades microbianas presentes nos ambientes aquáticos em decorrência das altas concentrações de metais tóxicos na água têm sido descritas, mostrando como principal consequência declínios na diversidade bacteriana, particularmente entre táxons raros (ANCION; LEAR; LEWIS, 2010; PRABHAKARAN; ASHRAF; AQMA, 2016; STALEY et al., 2015b). A ocorrência cada vez mais frequente de metais em concentrações tóxicas, em diversos ambientes, pode promover a seleção de características ou mecanismos por parte dos micro-organismos, que lhe permitam sobreviver nessas condições (ANSARI; MALIK, 2007; HEMME et al., 2010; NIES, 1999). Essa adaptação pode ser cromossomal ou estar presente em plasmídeos ou transposons (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Existem várias categorias de mecanismos postulados para a resistência ou tolerância a metais em micro-organismos (Fig. 2): (1) tolerância passiva; (2) exclusão do metal por barreira de permeabilidade; (3) remoção do metal por bombas de efluxo; (4) sequestro intracelular do metal mediado por proteína/quelante; (5) sequestro extracelular do metal mediado por proteína/quelante; (6) redução dos íons metálicos para uma valência menos tóxica (WHEATON et al., 2015). A tolerância se refere aos mecanismos utilizados pela célula para evitar a entrada do metal no citoplasma, já a resistência envolve mecanismos mais especializados que podem incluir a internalização do metal (DOPSON et al., 2014). Os micro-organismos podem conter uma ou mais combinações desses mecanismos de resistência, mas o mecanismo principal para regular as concentrações de metal intracelular envolve o transporte de membrana (STALEY et al., 2015b). A bactéria *Cupriavidus metallidurans* antigamente conhecida como *Ralstonia metallidurans*, é conhecida pela sua multirresistência a metais tóxicos por possuir os plasmídeos pMOL28 e pMOL30 que abrigam vários loci para resistência aos metais Co, Cd, Hg, Ni, Pb, Zn, prata (Ag) e ouro (Au) (LAL et al., 2013). A capacidade microbiana de tolerar e/ou acumular metais pesados pode ser uma adaptação natural como a de *C. metallidurans* ou adquirida (NIES, 1999).

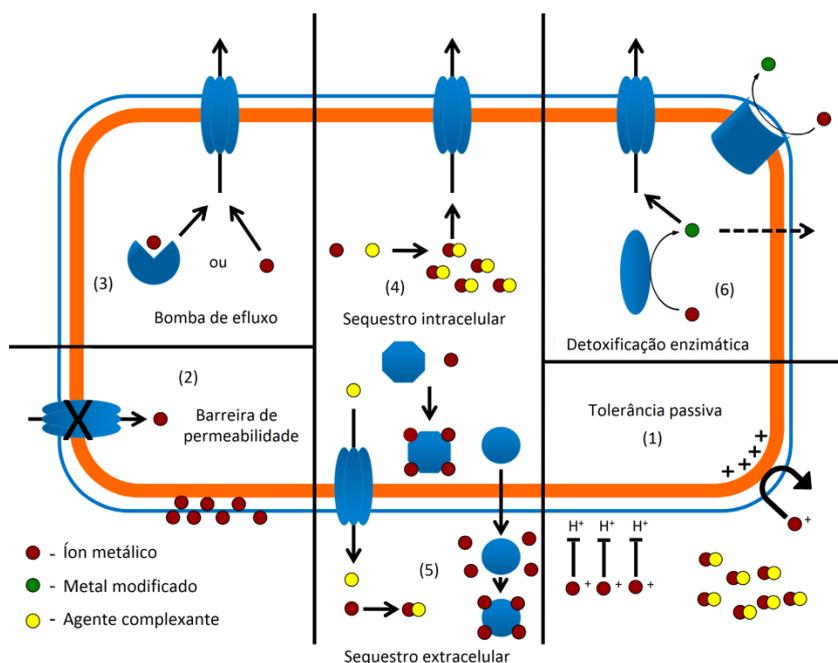


Figura 2 – Mecanismos postulados de resistência/tolerância a metais em micro-organismos. Adaptado de Wheaton et al., 2015

Tolerância passiva a metais e barreiras de permeabilidade: A tolerância passiva ocorre principalmente por ação de agentes complexantes capazes de quelar os íons metálicos antes de entrar na célula, reduzindo, portanto a sua disponibilidade no ambiente. Os micro-organismos acidófilos mantem um potencial de membrana intracelular positivo, gerando um gradiente quimiosmótico que inibe a passagem de cátions metálicos através da membrana (DOPSON et al., 2014; WHEATON et al., 2015). O mecanismo de exclusão é ativado numa tentativa por proteger os componentes celulares mais sensíveis ao metal. Os micro-organismos alteram a parede ou membrana celular, diminuindo a sua permeabilidade ou regulando a expressão de proteínas transportadoras como porinas e permeases (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). Micro-organismos produtores de cápsula ou exopolissacarídeo como algumas espécies de *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Bacillus* tem demonstrado habilidade de ligar e acumular metais extracelularmente (WHEATON et al., 2015).

Bombas de efluxo: Os sistemas de transporte ativo ou bombas de efluxo representam a maior categoria de sistemas de resistência a metais e podem ser cromossômicos ou estar codificados por plasmídeos. Os metais não essenciais usualmente entram na célula através dos sistemas de transporte de nutrientes, no entanto, estes são rapidamente exportados do citoplasma através das bombas de efluxo, evitando danos nos componentes celulares. Exemplos desse mecanismo são a resistência a Cd (II) codificada pelo operon *cad* em

Staphylococcus aureus, *Bacillus* sp., e *Listeria* sp., ou o operon *czc* encontrado em *Alcaligenes eutrophus*. A resistência a Pb (II) é mediada pelas proteínas *ZntA* em *Escherichia coli* e *CadA* em *S. aureus* (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

O sistema de transporte ativo é um dos mecanismos mais importantes para a resistência ao cádmio, um dos metais não essenciais mais tóxicos para a célula. O operon *cadABC* que está codificado em plasmídeos, pode também conferir resistência a zinco e chumbo (DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). Outro operon eficiente, o sistema de efluxo *czc*, remove íons de Cd(II), Zn(II) e Co(II) do citoplasma. Este operon tem sido encontrado tanto no cromossomo quanto em plasmídeos e contém vários genes com diferentes funções, sendo o da proteína *CzcA* codificada pelo gene *czcA*, o principal componente do sistema (INTORNE et al., 2012). A resistência a Cu(II) também é realizada via bombas de efluxo específicas a esse metal e é determinada pelo operon *cop* (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

Sequestro intracelular e extracelular de metais: O sequestro é o acúmulo de metais dentro do citoplasma ou fora da célula para evitar a exposição a componentes celulares essenciais. Entre os metais que são normalmente sequestrados intracelularmente estão o cádmio, o cobre e o zinco. Este sistema de resistência é codificado pelos genes *smtA* e *smtB*, foi descrito na cianobactéria *Synechococcus* sp. (SHELAKÉ et al., 2013). O acúmulo extracelular tem sido descrito em bactérias dos gêneros *Citrobacter* sp., e em *Klebsiella aerogenes* e em leveduras e fungos filamentosos, capazes de sequestrar íons Ni(II), Cu(II) e Cd(II). O mecanismo consiste na secreção de agentes complexantes ou proteínas quelantes com alta afinidade pelo metal, que irão formar complexos extracelulares, impossibilitando a sua entrada na célula (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

Detoxificação enzimática: A resistência ao mercúrio é o mecanismo de detoxificação enzimática mais estudado, e tem sido descrito em diferentes espécies bacterianas (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000). A toxicidade do mercúrio (Hg) é devida a alta afinidade do íon Hg(II) ao grupo tiol de algumas proteínas, as quais podem ser inativadas quando ligadas a esse metal. O operon *mer* codifica as enzimas organomercúrio liase e mercúrio redutase responsáveis por reduzir o íon Hg(II) a Hg(0), que é facilmente liberado da célula (ALLEN et al., 2013; KANE et al., 2016).

A contaminação do ambiente com metais pesados e outros poluentes impõe, aos microorganismos, uma pressão seletiva a favor dos mecanismos de resistência, derivando na incorporação destes em elementos genéticos móveis (plasmídeos e transposons conjugativos),

favorecendo a transferência horizontal de genes (STALEY et al., 2015b), e, por conseguinte a sua prevalência no ambiente.

2.5 Ocorrência de metais tóxicos ao longo da bacia do Rio Tietê

Devido à quantidade de esgoto doméstico e industrial que o Rio Tietê recebe diariamente, não é difícil imaginar que as concentrações de metais tóxicos nesta bacia hidrográfica sejam altas. Apenas alguns anos atrás, pesquisadores começaram a se preocupar com a ocorrência destes metais em cargas dissolvidas e particuladas encontrados em afluentes do rio Tietê (MORTATTI; PROBST, 2010). Dessa forma, estudos foram realizados com a finalidade de avaliar a concentração destes elementos em sedimentos ao longo da bacia. Os resultados demonstraram altas concentrações de Zn, Cr e Cu em todos os pontos amostrados, sendo que a maior concentração de Zn foi detectada no município de Pirapora de Bom Jesus (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011). Resultados similares tinham sido reportados no ano de 2002, onde além de Zn foram encontradas também altas concentrações de Pb nos reservatórios de Pirapora, Rasgão e Billings (DA SILVA et al., 2002).

Historicamente, a bacia do Rio Tietê tem apresentado altas concentrações de metais pesados na água e no sedimento de trechos do rio em UGRHIs com vocação industrial ou em industrialização (CETESB, 2015, 2016). As informações apresentadas no relatório disponibilizado pela CETESB em 2017 demonstraram que a concentração dos metais Ni, Zn, Cd, Hg, Pb, Cr e Cu dissolvido, os quais estão associados aos lançamentos de efluentes industriais, na maior parte dos pontos avaliados não apresentaram resultados em desconformidade com a norma vigente (Resolução CONAMA nº 357 de 2005). No ano 2015 foi verificado também, que os valores foram menores à média histórica, sugerindo que está ocorrendo um controle das fontes industriais no Estado, que se manteve no ano 2016. Como esperado, as UGRHIs industrializadas foram as que apresentaram maior porcentagem de resultados de não conformidade tanto para água quanto para sedimento (CETESB, 2016, 2017).

Uma análise utilizando as médias anuais dos metais Ni e Cd, medidas pelas CETESB, foi realizada com o intuito de observar a ocorrência de altas concentrações desses metais ao longo da bacia nos últimos 10 anos (Figs. 3 e 4). Foram verificadas maiores concentrações de Cd nas UGRHIs industrializadas ou em processo de industrialização (5, 6, 10 e 13) nos anos

2006 e 2007; tendo sido observadas baixas concentrações de Cd nas UGRHIs 16 e 19, não industrializadas, independentemente do ano. Também foi verificada uma redução nos valores de concentração ao longo dos anos. Os valores médios dos pontos analisados não mostraram estar fora das normas vigentes para os rios de classes 1, 2 e 3 (Fig. 3).

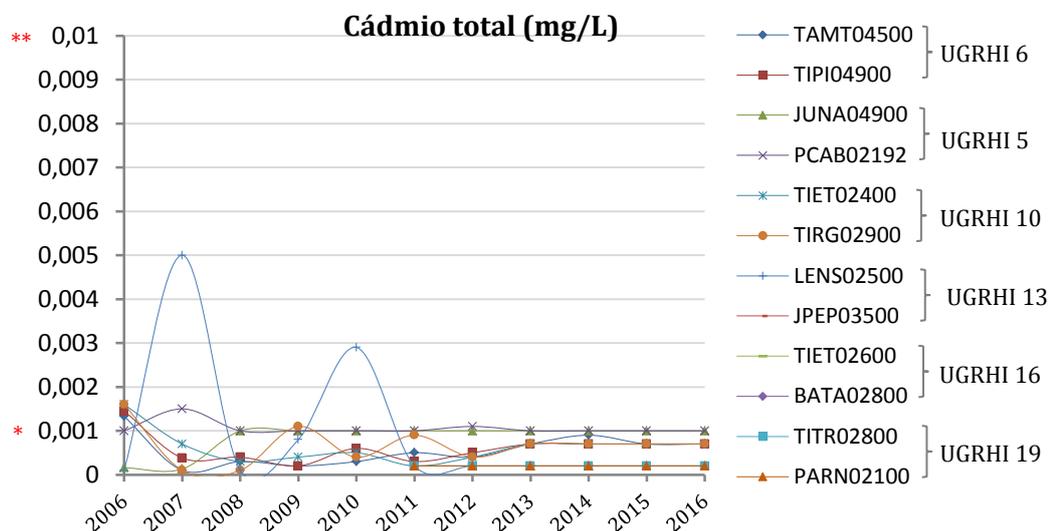


Figura 3 – Valores médios anuais da concentração de cádmio em dois pontos de amostragem de cada UGRHI. * Limite para rios de classe3; ** Limite para rios de classes 1 e 2. UGRHI 6 - Alto Tietê; UGRHI 5 - Tietê Sorocaba; UGRHI 10 – PCJ; UGRHI 13 - Tietê Jacaré; UGRHI 16 - Tietê Batalha; UGRHI 19 - Baixo Tietê.

A concentração média de níquel observada ao longo dos dez anos foi também maior nas UGRHIs 5, 6 e 10, industrializadas, estando na maior parte dos casos acima do limite permitido pelo CONAMA. Não foi verificada a diminuição nos valores de concentração no decorrer dos anos (Fig. 4), no entanto, a concentração de Ni nos pontos de amostragem das UGRHIs não industrializadas (16 e 19) mostrou-se abaixo dos limites permitidos em todos os anos avaliados.

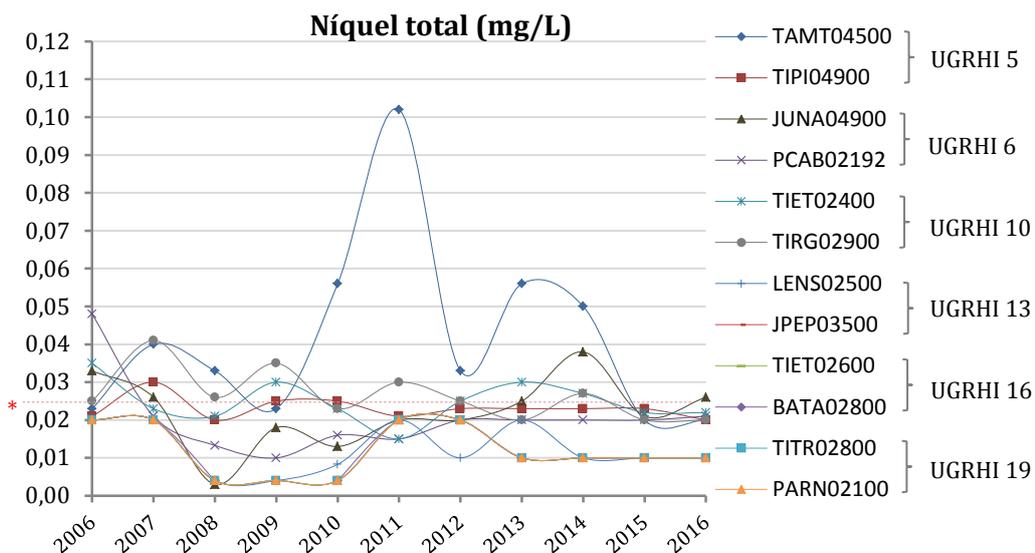


Figura 4 – Valores médios anuais da concentração de níquel em dois pontos de amostragem de cada UGRHI. * Limite para rios de classes 1, 2 e 3 (0,025 mg/l) UGRHI 6 - Alto Tietê; UGRHI 5 - Tietê Sorocaba; UGRHI 10 – PCJ; UGRHI 13 - Tietê Jacaré; UGRHI 16 - Tietê Batalha; UGRHI 19 - Baixo Tietê.

Como mencionado anteriormente, altas concentrações de metais pesados na água podem acarretar problemas de saúde, devido a sua alta toxicidade (SAMAD et al., 2015). Análises de toxicidade da água usando o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* realizados pela CETESB mostraram ocorrência de toxicidade aguda em amostras provenientes de rios da UGRHI 6, Alto Tietê (CETESB, 2015). Eles relacionaram esse efeito às concentrações de metais (Cu dissolvido, Cr, Ni, Zn e Cd) detectados na água. No Sistema Billings, ainda no Alto Tietê, a água do Reservatório do Rio Grande, apresentou efeito tóxico crônico ou agudo, em 40% e 20% das amostras analisadas, respectivamente. Nesse ponto de coleta foi detectada uma alta concentração de Cu dissolvido, o qual está associado à aplicação de algicidas (CETESB, 2016).

Apesar da CETESB ter mostrado uma redução na ocorrência de não conformidades ao longo da bacia, algumas regiões do Rio Tietê estão fortemente poluídas com metais extremamente tóxicos (Ni, Cd, Pb). Este resultado evidencia a necessidade de estudos a respeito dos impactos destes poluentes na biodiversidade microbiana neste ambiente, o qual poderia ainda ser utilizado como indicador de qualidade do rio (MORTATTI; MENEGHEL DE MORAES; PROBST, 2011). Além disso, considerando que mecanismos de resistência podem ser os mesmos para diferentes metais, bastaria que apenas um metal estivesse presente para que populações específicas possam ser selecionadas e tenham um papel importante na alteração da diversidade microbiana.

2.6 Caracterização de comunidades bacterianas

A diversidade metabólica bacteriana é enorme. Existem bactérias adaptadas a todos os diferentes tipos de ambientes encontrados no planeta, há também bactérias capazes de decompor uma grande variedade de compostos químicos orgânicos e inorgânicos (BROWN; CHANG, 2014; CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014; LADE et al., 2015; SINHA et al., 2009). Para estudar as bactérias em seu ambiente natural é importante entender antes como as comunidades bacterianas funcionam e como a composição dessa comunidade pode variar devido a mudanças ambientais (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013). Existem diferentes abordagens que permitem acessar e caracterizar as comunidades microbianas presentes em um determinado ambiente e podem ser divididas em microbiológicas, bioquímicas e moleculares (SPIEGELMAN; WHISSELL; GREER, 2005).

O método mais tradicional para a avaliação da diversidade microbiana é o cultivo seletivo e/ou diferencial, precedido de contagem das unidades formadoras de colônia no meio de cultura. Esse método, além de ser rápido e barato, fornece informações sobre o segmento heterotrófico ativo e cultivável da população bacteriana. Existem fatores que podem limitar o uso dessa técnica, entre eles estão a dificuldade para inibir o crescimento de microrganismos contaminantes ou biofilmes, a seleção de meios de crescimento adequados, o fornecimento de condições de crescimento específicas (temperatura, pH, luz) e a incapacidade de cultivar um grande número de espécies bacterianas (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013). Uma das vantagens do método de cultivo é que permite trabalhar com apenas as comunidades bacterianas de interesse, permitindo pesquisas focadas na degradação de um tipo específico de substrato (KNIETSCH et al., 2003).

Os métodos tradicionais de cultivo não refletem a diversidade total da comunidade microbiana (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013), sabe-se que aproximadamente 99% dos genótipos bacterianos presentes no ambiente não são cultiváveis em condições padrão de laboratório, razão pela que métodos independentes de cultivo ganharam importância nas últimas décadas (BELILA; SNOUSSI; HASSAN, 2012). A filogenética molecular permite a descrição da diversidade microbiana utilizando as sequências de genes para a identificação dos organismos. Várias abordagens moleculares foram desenvolvidas para estudar a diversidade microbiana. Estas incluem a reassociação do DNA, hibridização DNA-DNA e mRNA-DNA, clonagem e sequenciamento de DNA e outros métodos baseados em PCR tais como DGGE, T-RLFP, Análise do Espaço Intergênico Ribossomal (RISA), Análise de

Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), entre outros (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013).

A amplificação, sequenciamento e posterior análise de genes 16S rRNA representam a abordagem mais importante nos estudos de diversidade bacteriana, uma vez que permite testar hipóteses em diversos níveis taxonômicos (LEMOS et al., 2011). A metagenômica é uma derivação da genômica microbiana convencional, pois não há necessidade de se obter culturas puras para sequenciamento. Como resultado constitui uma importante ferramenta para determinação de hipóteses a respeito das inter-relações dos membros da comunidade. Estas investigações são possíveis atualmente graças à diminuição dos custos do sequenciamento e da evolução da bioinformática, a qual condiciona o processamento de um enorme número de dados (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

A utilização de abordagens metagenômicas e funcionais permitem avaliar o potencial biossintético de um ambiente ou de organismos presentes numa amostra a partir da informação presente no seu genoma (LI et al., 2011). As tecnologias de sequenciamento em larga escala ou NGS (*Next Generation Sequencing*) permitem a obtenção de grandes quantidades de informações de sequências altamente precisas, cada vez a menor custo (OULAS et al., 2015). Estas técnicas fizeram com que o sequenciamento de genomas completos, de exomas, mobilomas, transcriptomas, a quantificação de transcritos, e o ressequenciamento fosse acessível a um maior número de pesquisadores em todo o mundo (LITCHFIELD et al., 2015; REDDY et al., 2014; THUNG et al., 2014). A plataforma Illumina é uma das tecnologias mais usadas atualmente por permitir sequenciamentos em profundidade a baixo custo. A desvantagem desse tipo de sequenciamento é a produção de elevado número de sequências com *reads* curtos, o que faz o processo de montagem e análise das sequências muito dispendioso (JEON et al., 2015; OULAS et al., 2015). Uma alternativa para facilitar a busca por grupamentos de genes que codificam metabólitos de interesse envolve a triagem de módulos enzimáticos no DNA genômico ou bibliotecas de genes (AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005). Esta técnica poderia ser vista como uma mistura entre as duas abordagens acima mencionadas, por misturar técnicas moleculares e de cultivo bacteriano. A primeira etapa para a construção de bibliotecas metagenômicas é extração de DNA de alta qualidade, na quantidade necessária para clonagem e que seja representativo da diversidade microbiana presente na amostra (SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007; SIMON; DANIEL, 2011). Uma vez extraído, o DNA metagenômico é inserido em um vetor (cosmídeo, fosmídeo, BAC) e clonado em um hospedeiro, que na maior parte dos casos é *E.*

coli. Com a biblioteca construída pode ser realizado o *screening* de moléculas ou genes de interesse. Este *screening* pode ser baseado em funções ou sequências (SIMON; DANIEL, 2011).

Na triagem funcional, os clones são testados para uma atividade particular, como presença de enzimas que catalisem determinadas reações, crescimento em substratos específicos ou produção de metabólitos secundários, como antibióticos e agentes antitumorais. O principal problema desta abordagem é a logística e as instalações necessárias para pesquisar em dezenas de milhares e até milhões de clones para encontrar as funções desejadas (SINGH, 2010), outro problema é a limitação de sistemas de secreção compatíveis entre a molécula sintetizada e o hospedeiro.

A triagem baseada em sequências envolve a construção de sondas de DNA ou *primers* derivados de regiões conservadas de genes conhecidos ou famílias de proteínas. Desta forma, apenas as novas variantes de classes funcionais conhecidas de proteínas podem ser identificadas. No entanto, esta estratégia já levou à identificação de genes codificadores de novas enzimas (SIMON; DANIEL, 2011).

2.7 Potencial biotecnológico de comunidades microbianas

Além da já mencionada importância ecológica dos micro-organismos, diversos estudos tem demonstrado que estes são uma fonte importante de novos compostos terapêuticos tais como antibióticos, agentes anticancerígenos e imunossupressores (ESCOBAR-ZEPEDA; DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; SINGH, 2010). Na indústria podem ser de grande utilidade, uma vez que podem produzir uma ampla gama de produtos de valor biotecnológico (NACKE et al., 2012; SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007) e podem ser usados como alternativa sustentável ao tratamento de ambientes contaminados. A biorremediação, como é definido o processo, utiliza micro-organismos, plantas ou enzimas para transformar os contaminantes em substâncias menos tóxicas, sendo uma técnica muito atraente devido ao seu custo-benefício (CERQUEIRA et al., 2012; LADE et al., 2015).

As técnicas convencionais utilizadas para limpar locais contaminados podem não ser as mais efetivas e podem criar riscos significativos às pessoas implicadas na escavação, manuseio e transporte de materiais perigosos. Entre as técnicas convencionais mais conhecidas estão a disposição dos contaminantes em aterros sanitários, cobertura, incineração

e decomposição com químicos (BHATNAGAR; KUMARI, 2013). Em contrapartida, a técnica de biorremediação busca limpar o ambiente usando a atividade biológica natural, tornando o processo mais seguro, mais limpo, rentável e amigável para o ambiente. O sucesso dessa tecnologia depende de vários fatores, como o tipo de ambiente que se quer despoluir, a estrutura química e disponibilidade do contaminante e as condições que favorecem o desenvolvimento dos micro-organismos (aeração, umidade, temperatura, pH, presença de nutrientes) (SINHA et al., 2009). Neste contexto, o componente chave na biorremediação é o micro-organismo que produz as enzimas/proteínas envolvidas na degradação/imobilização permitindo a eliminação ou desintoxicação do poluente químico. É essencial o isolamento e seleção de um micro-organismo ou de um consórcio de micro-organismos capazes de promover a degradação eficiente da molécula em estudo (CERQUEIRA et al., 2012; LADE et al., 2015).

O processo no qual, micro-organismos e/ou enzimas são adicionados ao ambiente contaminado para aumentar a taxa de degradação, é conhecido como bioaugmentação, e pode usar micro-organismos endógenos ou exógenos ao ambiente (BHATNAGAR; KUMARI, 2013; NZILA; RAZZAK; ZHU, 2016). Existe um interesse particular em encontrar micro-organismos com potencial de degradação nativos do local contaminado por apresentarem maior adaptabilidade, ser mais resistentes à variação das condições ambientais locais e menos suscetíveis às variações genéticas causadas pelo estresse ambiental (CERQUEIRA et al., 2012). Hoje em dia a biorremediação com micro-organismos está sendo amplamente explorada para despoluir ambientes contaminados com petróleo e seus derivados, e dejetos industriais como corantes e metais pesados. (ADRIO; DEMAIN, 2014; CERQUEIRA et al., 2012; LADE et al., 2015; MANI; KUMAR, 2014; YERGEAU et al., 2012). Solos contaminados com derivados de petróleo provenientes de Hong Kong e de Long Beach-California foram submetidos ao processo de atenuação natural com consórcios bacterianos, demonstrando a degradação de 75% dos hidrocarbonetos contidos nas amostras, 12 semanas após incubação (BENTO et al., 2005). Bactérias dos gêneros *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Delftia*, e *Achromobacter*, isoladas de solos contaminados com petróleo demonstraram uma alta capacidade para degradar o contaminante, tanto em experimentos *in vitro* quanto em microcosmos (ROY et al., 2014). Algumas espécies do gênero *Bacillus* também tem exibido potencial para biorremediar ambientes contaminados com metais tóxicos como Pb, Zn e Cr (GUPTA et al., 2014).

As principais vantagens da biorremediação em relação ao tratamento convencional incluem: baixo custo, alta eficiência, minimização de lamas químicas e biológicas, seletividade a metais específicos, ausência de necessidade de nutrientes adicionais e possibilidade de recuperação dos metais (BHATNAGAR; KUMARI, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar por meio de análise dependente e independente de cultivo a diversidade taxonômica e funcional de micro-organismos planctônicos e bentônicos em seis locais da Bacia do Rio Tietê e identificar vias metabólicas de interesse biotecnológico e/ou associadas às interações ecológicas neste ambiente.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente os sedimentos e a água coletados em diferentes locais ao longo da bacia do Rio Tietê;

- Isolar e organizar uma coleção de culturas de bactérias planctônicas e bentônicas da bacia do Rio Tietê;

- Avaliar a capacidade de bactérias isoladas de amostras de água e sedimento do Rio Tietê em tolerar metais tóxicos;

- Selecionar pontos contrastantes para análise metagenômica do sedimento e da água do Rio Tietê;

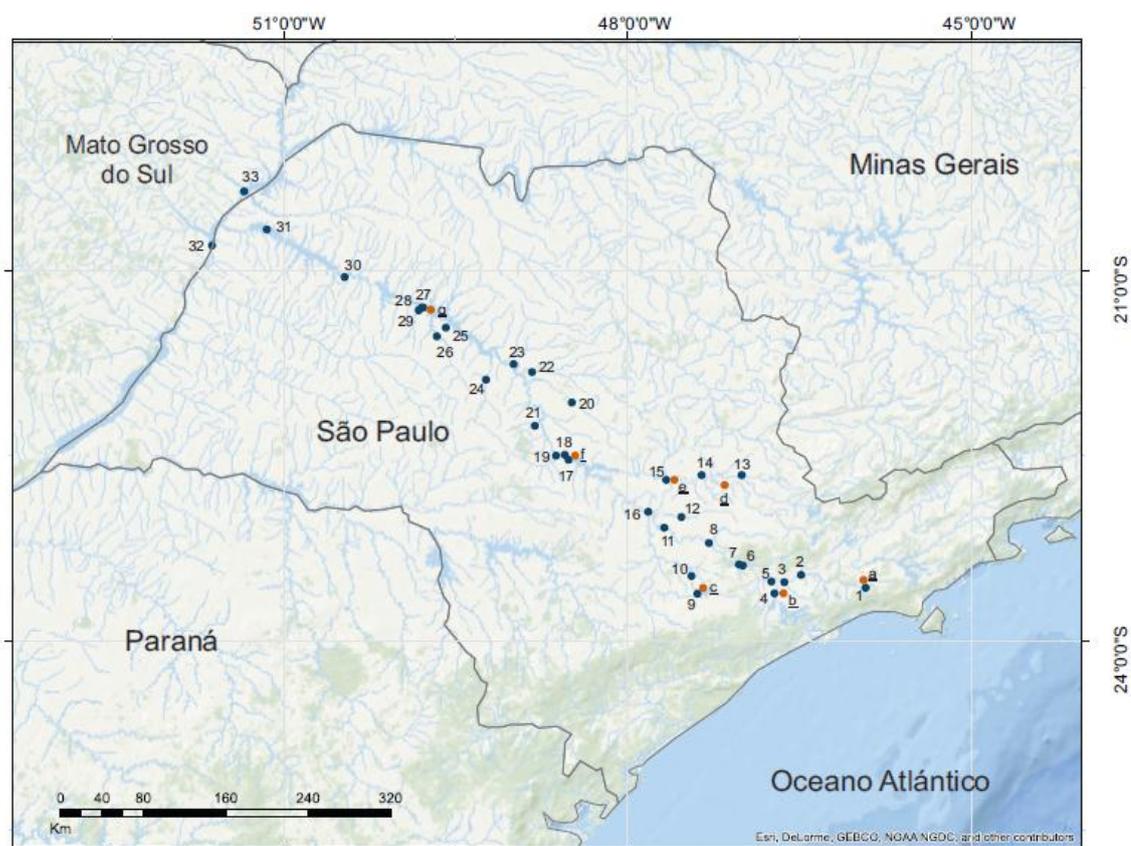
- Realizar análise metagenômica de sequências funcionais presentes nos diferentes pontos selecionados. Esta análise permitirá identificar quais sequências funcionais estão presentes no ambiente;

- Obter bibliotecas de DNA metagenômico em fosmídios para a prospecção de genes e/ou vias metabólicas envolvidas em diferentes processos de interesse biotecnológico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de amostragem e métodos de coleta

A definição dos pontos de coleta ao longo da bacia do Rio Tietê foi realizada baseada no histórico da variação físico-química de pontos monitorados pela CETESB. Estes dados são publicados anualmente no Relatório de Qualidade de Águas Superficiais no Estado de São Paulo, disponibilizado online ao público (<http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/publicacoes-relatorios/>). A primeira coleta foi realizada no período de seca, nos meses de setembro a novembro de 2013 e a segunda no período de chuva de fevereiro a março de 2014. A localização dos 33 pontos de coleta de água e sete de sedimento é demonstrada na figura 5.



1. NASCENTE 2. BQU03850 3. TAMT04900 4. PINH04500 5. TIET04200 6. TIPI04900 7. TIRG02900 8. JUNA04900
 9. SOIT02900 10. SORO02100 11. TIET02400 12. CPIV02700 13. CMDC02900 14. TATU04850 15. PCAB02195 16. TIET02450
 17. TIBB02900 18. TIET02500 19. LENS03950 20. JPEP03600 21. RGRA02990 22. JCGU03900 23. TIET02600 24. BATA02800
 25. ESGT02050 26. DADO02800 27. TIPR02990 28. TIET02700 29. PATO02900 30. TITR02100 31. TITR02800 32. PARN02100
 33. ISOL02990 a. NASCENTE b. PINH04500 c. PCAB02195 d. ATIB02800 e. TIBB02900 f. SOIT02850 g. TIPR02800

Figura 5 – Localização dos pontos de amostragem. Pontos em azul e números representam as amostras de água; pontos em marrom e letras representam as amostras de sedimento.

As coletas foram realizadas por pessoal treinado da CETESB e transportadas a 4 °C para análise no laboratório. Nas amostras de água foram medidos, no local de coleta, pH, condutividade elétrica, Potencial de Oxi-Redução (ORP) e temperatura com auxílio de uma

sonda multiparamétrica. Para cada ponto foram amostrados 5 L de água e/ou aproximadamente 100 g de sedimento. Todas as coletas foram geo-referenciadas para posterior repetição caso houver necessidade. Do total de pontos avaliados, foram selecionados sete contrastantes (4 de água e 2 de sedimento) para as análises metagenômicas.

4.2 Análises físico-químicas

Além dos parâmetros medidos *in situ* outras análises físico-químicas, microbiológicas e eco-toxicológicas da água e do sedimento foram realizadas nos laboratórios da CETESB. Todas as análises realizadas foram baseadas em métodos padrão (CETESB, 2016a). Na tabela 1A do anexo são apresentados os resultados de todas as análises realizadas.

4.3 Processamento das amostras

Todas as amostras de água foram filtradas usando dois tipos de filtros de membrana, primeiro com poro de 1,2 µm para a retenção de células eucariotas e depois com poro de 0,22 µm para reter as células procariotas. Os filtros foram estocados a -20 °C até o momento da extração de DNA. Antes da filtragem foram separados 6 ml de cada amostra para a realização das contagens bacterianas e fúngicas e posterior isolamento.

Seis gramas de sedimento de cada amostra foram separados para realizar as contagens de bactérias e fungos, precedidas de isolamento. O restante do sedimento foi estocado a -20 °C até o momento da extração de DNA.

4.4 Organização da coleção de culturas de sedimento e água dos Rios Tietê e isolamento de micro-organismos.

Com o objetivo de estimar a população presente nas amostras de água e sedimento, assim como para a montagem de uma coleção de bactérias e fungos isolados do Rio Tietê, as amostras de água e sedimento foram diluídas e semeadas em meios de cultura ricos para fungos e bactérias. As culturas bacterianas foram incubadas por até 48 h a 28 °C. Após a realização das contagens, foram isolados todos os micro-organismos morfologicamente diferentes em cada ponto e conservados a -80 °C. Para organizar a coleção de bactérias, cada isolado foi catalogado de acordo com o local de amostragem e tipo de amostra da qual foi

isolado (água ou sedimento), precedido das iniciais do nome do projeto NAP-Bioprodutos, assim: NBA para as amostras de água e NBS para amostras de sedimento.

Foram selecionados aleatoriamente 200 isolados para identificação pela técnica de sequenciamento parcial do gene 16S do RNA ribossomal. Para isso foi realizada a extração de DNA com auxílio do *Wizard Genomic DNA purification Kit*® (Promega) seguindo as instruções do fabricante. O DNA obtido na extração foi submetido à reação de PCR convencional, utilizando os *primers* 27f (5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1387r (5' CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG 3') para amplificação da região 16S rRNA. Uma vez amplificadas, as amostras foram purificadas com álcool e os produtos foram sequenciados. Para a identificação, as sequências foram comparadas com a base de dados do *National Center for Biotechnology* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) via BLAST-n.

4.5 Avaliação do crescimento dos isolados bacterianos em altas concentrações de metais tóxicos.

A capacidade de crescimento de isolados bacterianos a metais pesados foi testada utilizando os metais: Cd e Ni. Para isso, as bactérias foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio Triptona de Soja (TS) líquido. Uma vez crescidas, as bactérias foram inoculadas, com auxílio de um replicador de 96 dentes, em placas de meio Agar Triptona de Soja (TSA) acrescido de Cloreto de Cádmio (CdCl_2) ou Cloreto de Níquel (NiCl_2) nas concentrações de 1 mM, 2 mM e 4 mM, e incubadas a 28 °C por 48 h. Todos os testes foram realizados em triplicata e o crescimento foi considerado positivo quando a bactéria cresceu em pelo menos duas réplicas. A capacidade das bactérias de crescer nas concentrações avaliadas de CdCl_2 e NiCl_2 será referida ao longo do texto como tolerância a metais tóxicos.

4.6 Seleção dos pontos de amostragem para análise metagenômica

A seleção dos pontos de água para análise metagenômica foi realizada com base nas características físico-químicas e análises de diversidade bacteriana e fúngica, obtidas pela técnica de T-RLFP. Esta análise foi realizada em 33 pontos ao longo do rio (LIMA, 2015; ORTIZ, 2015), dos quais foram escolhidos cinco pontos contrastantes, fundamentados nos resultados de diversidade e riqueza, para análises mais detalhadas. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada com base nos parâmetros físico-químicos fornecidos pela

CETESB (CETESB, 2014, 2015) e a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) relacionando esses parâmetros aos resultados de diversidade de riqueza determinados nos diferentes pontos de amostragem. A localização e algumas características dos pontos selecionados para a análise metagenômica estão resumidas na tabela 1.

1) PINH 04500 - UGRHI 06 (Fig. 5, Ponto 4)

Este ponto de amostragem está localizado no município de São Paulo e caracteriza-se pela alta eutrofização e a elevada quantidade de matéria orgânica; apresentou índices de riqueza e diversidade altos. Apesar de ser considerado um ponto poluído, nas análises de PCoA e PCA este ponto se agrupou com as amostras mais limpas, o que fez dele um ponto interessante para ser analisado.

2) TIET 02400 - UGRHI 10 (Fig. 5, Ponto 11)

Localizado no município de Tietê, o ponto de amostragem TIET02400 apresentou qualidade de água “péssima” nos dois anos avaliados e um alto grau de eutrofização; apresentou bom índice de diversidade tanto na primeira, quanto na segunda temporada. Quanto à diversidade, se agrupou tanto com amostras sujas quanto com amostras limpas. Este ponto está localizado no Rio Tietê e sofre bastante influência de efluentes urbanos.

3) TIET 02500 - UGRHI 13 (Fig. 5, Ponto 18)

O ponto de amostragem TIETE02500 está localizado no município de Barra Bonita numa região intermediária do Rio Tietê (entre áreas mais poluídas e menos poluídas). Foi classificado pelo IQA da CETESB como “bom” em ambos os anos, esse fato pode indicar que o rio está passando por um processo de autodepuração a partir desse ponto de coleta. Pelas análises de PCoA e PCA se agrupa tanto com as amostras mais poluídas quanto com as menos poluídas.

4) PATO 02900 - UGRHI 19 (Fig. 5, Ponto 29)

O ponto de amostragem PATO02900 está localizado no município de Promissão. A captação da amostra de água não está localizada no próprio Rio Tietê, mas num afluente, o Ribeirão dos Patos. Este ponto apresentou altos índices de riqueza e diversidade, tanto bacteriana quanto fúngica; foi agrupado com as amostras menos poluídas, pela análise de PCA para os parâmetros físico-químicos. Quanto à diversidade, tanto nas análises de PCA quanto nas de PCO, se diferenciou ficando bastante isolado dos demais pontos.

5) TITR 02800 - UGRHI 19 (Fig. 5, Ponto 31)

Localizado no município de Pereira Barreto, o ponto de amostragem TITR02800 apresentou qualidade de água “ótima” nos dois anos avaliados. Nas análises de riqueza e

diversidade mostrou-se entre os pontos mais diversos. Pelas análises de PCO e PCA se agrupou com as amostras mais limpas. O ponto de captação está localizado no Reservatório de Três Irmãos perto da foz do Rio Tietê.

Tabela 1 – Características das amostras de água selecionadas para análise metagenômica

Parâmetro	PINH04500	TIET02400	TIET02500	PATO02900	TIPR02800
Latitude	23 35 38 S	23 05 12 S	22 30 26 S	21 19 17 S	20 39 35 S
Longitude	46 41 37 O	47 40 41 O	48 32 46 O	49 49 20 O	51 08 48 O
Corpo hídrico	Rio Pinheiros	Rio Tietê	Rio Tietê	Ribeirão dos Patos	Reservatório de Três Irmãos
Chao-1 ¹ 2013/2014	102/43	102/37	76/70	188/37	49/62
Shannon-H ¹ 2013/2014	4.29/3.22	4.21/3.19	3.19/3.72	3.72/3.07	3.47/3.79
Chao-1 ² 2013/2014	108/72	73/96	77/88	87/92	83/109
Shannon-H ² 2013/2014	3.89/3.91	4.16/4.01	3.93/4.01	4.16/4.12	3.95/4.11
IQA* 2013/2014	20/15	25/24	72/66	67/55	90/86
O.D.* 2013/2014	2.2/0.7	1.5/1.5	5.8/5.7	5.1/3.4	7.5/7.4
D.B.O.* 2013/2014	44/50	37/32	4.0/7.2	3.0/5.2	2.0/2.0

¹ Índices de diversidade e riqueza bacterianos – Fonte: (LIMA, 2015)

² Índices de diversidade e riqueza fúngicos – Fonte: (ORTIZ, 2015)

IQA- Índice de Qualidade de Água; O.D. – Oxigênio Dissolvido; D.B.O. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

* Valores referentes às médias anuais – Fonte (CETESB, 2014, 2015)

A seleção dos pontos para as amostras de sedimento foi feita a partir das características físico-químicas e a localização dos pontos no percurso do rio. Foram selecionados dois pontos contrastantes: o PINH04500, situado em uns dos locais mais contaminados da bacia, pois recebe alta quantidade de esgoto doméstico e industrial, sendo categorizado como “péssimo” segundo as características físico-químicas avaliadas pela CETESB (2014). O segundo ponto, TIPR02800, está localizado em uma região não poluída e categorizada como “boa” pelas análises físico-químicas publicadas no relatório da CETESB (2014). Esse ponto está localizado próximo ao ponto de água PATO02900, que apresentou o maior índice de diversidade bacteriana nas análises por T-RFLP (LIMA, 2015). Para diferenciar as amostras de sedimento das amostras de água, as primeiras foram designadas com os nomes de NBS09, no caso de PINH04500 e de NBS11 para TIPR02800.

4.7 Extração de DNA genômico (gDNA) de amostras de água e sedimento para sequenciamento.

Para obtenção de gDNA de alto peso molecular (40 kb) dos pontos de água selecionados, foram filtrados diferentes volumes em membranas de 1,2 µm e 0,2 µm. Dos pontos considerados contaminados (alta quantidade de nutrientes e baixa disponibilidade de

oxigênio) PINH04500 e TIET02400, foram filtrados 20 L d'água e daqueles considerados não contaminados (baixa quantidade de nutrientes e alta disponibilidade de oxigênio) TIET02500, PATO02900 e TITR02800), foram filtrados 50 L. Devido a esse grande volume a ser filtrado, este processo foi realizado no laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Análises Ambientais da CETESB. Após a filtração, as membranas tanto de 0,22 µm como de 1,2 µm, foram maceradas com nitrogênio líquido e o DNA foi extraído utilizando o protocolo descrito por Castro et al., 2011 com algumas modificações. Em tubos de 50 ml, foram misturados 10 g de filtro macerado com 15 ml de tampão de extração (Tris/HCl 100 mM, pH 8.0, Fosfato de Sódio 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0, NaCl 1.5 M, CTAB 1% w/v) e submetidos a sucessivos ciclos de congelamento /descongelamento (40 min). Após a última etapa de descongelamento, foram adicionados 4,5 ml de SDS 20% e 2,5 ml de Isotiocianato de Guanidina (5 M) em cada tubo e incubados por 2 h a 65 °C. Passado o tempo, os tubos foram centrifugados (5000 rpm, 10 °C durante 1 h) e o sobrenadante misturado com 12 ml de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1). O sobrenadante foi coletado depois de uma nova etapa de centrifugação (mesmas condições) e o precipitado com 20 ml de Isopropanol 70% (v/v) por 20 min à temperatura ambiente. Passado o tempo, os tubos foram centrifugados por 1 h 30 min a 5000 rpm e 10 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet foi ressuspensionado em 500 µl de TE pH 8.0. O DNA foi extraído com igual volume de tampão Tris-Fenol/Clorofórmio seguido de centrifugação a 1000 rpm por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi misturado com igual volume de Clorofórmio/Ácido Isoamílico e centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante (DNA) foi transferido para um novo tubo e estocado a -20 °C. A extração de DNA das amostras de sedimento foi realizada a partir de 10 g de sedimento.

Após extração, o gDNA foi preparado de acordo com instruções da empresa responsável Macrogen Inc., (<https://dna.macrogen.com/eng/>) e enviado para sequenciamento na plataforma Illumina® HiSeq2000. Todas as amostras foram enviadas em triplicata.

4.8 Análise metagenômica

A qualidade das sequências foi verificada por meio da ferramenta FASTQC. As sequências foram cortadas com auxílio do programa CLC Workbench 8.0.1. Sequências menores de 20 bp assim como *reads* de baixa qualidade foram excluídas. A montagem dos *contigs* foi realizada no programa CLC Workbench 8.0.1. A classificação funcional das sequências foi realizada utilizando o servidor MG-RAST - *Metagenomic Rapid Annotations*

using *Subsystems Technology* (MEYER et al., 2008) versão 3.6., o qual oferece um conjunto exclusivo de ferramentas para a realização da análise desse conjunto de dados. O servidor oferece vários métodos para acessar os diferentes tipos de dados, incluindo anotações de um ou mais metagenomas ou genomas em diferentes bases de dados. Para análise neste servidor, as sequências foram enviadas com os *contigs* já montados e também foram enviadas as sequências brutas, ou seja, no formato enviado pela empresa responsável pelo sequenciamento. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* STAMP – *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (PARKS; BEIKO, 2010) que utiliza os perfis metagenômicos gerados no MG-RAST como *input*. As análises de diversidade foram realizadas com auxílio do *software* PAST versão 3.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4.9 Obtenção de bibliotecas de fragmentos de DNA metagenômico em foscídios

O DNA metagenômico (25 a 50 µg) das diferentes amostras foi separado por eletroforese em campo pulsado (CHEF DRIII), recortado e purificado do gel quando necessário. A montagem das bibliotecas metagenômicas foi realizada usando o *CopyControl® Fosmid Library Production Kit* (Epicentre) seguindo as especificações do fabricante. O DNA de alto peso molecular (40 kb) foi tratado com a enzima *End-Repair* para geração de extremidades abruptas fosforiladas. Estes fragmentos foram clonados no vetor pCC2FOS® com a enzima *Fast-Link DNA Ligase*. O foscídio (vetor pCC2FOS™ + inserto) foi empacotado no fago T-1 e mantido a -20 °C até a etapa de transfecção. Células de *E. coli* EPI300-T1R foram transfectadas com os fagos contendo o foscídio e semeadas sobre meio de cultura suplementado com cloranfenicol na concentração de 12,5%. Os clones originados foram estocados em meio de cultivo suplementado com cloranfenicol (12,5%) e glicerol.

4.10 Extração de DNA fosmidial para validação das bibliotecas metagenômicas

O DNA fosmidial de clones selecionados aleatoriamente foi extraído pelo método de lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Os clones foram inoculados em tubos falcon de 15 ml contendo 3 ml de meio LB acrescido de cloranfenicol (12,5 µg/ml) e arabinose (0,02%). Os tubos foram encubados em agitação (150 rpm) a 37 °C durante 20 h. Após este período, foram centrifugados durante 3 min a 13000 rpm e 10 °C. O pellet foi ressuspensionado em 100 µl de solução 1 [50 mM de glicose; 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 10 mM de EDTA (pH 8,0)], e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados

200 µl de solução 2 [0,2 NaOH e SDS 1%] recém preparada. Os tubos foram misturados cuidadosamente por inversão e incubados a 4 °C por 5 min. Em seguida, foram adicionados 150 µl de solução 3 [5 M de acetato de potássio (60 ml); ácido acético glacial (11,5 ml) e 28,5 ml de água] misturados cuidadosamente por inversão e incubados a 4 °C durante 5 min. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, adicionados 0,5 µl de RNase (100 µg/ml) e incubados por 1 h a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 500 µl de Fenol/Clorofórmio/Ácido Isoamílico (24:24:1) aos tubos, misturados por inversão e centrifugados a 12000 rpm por 15 min. O sobrenadante coletado foi transferido para novos tubos, adicionados 500 µl de Clorofórmio/Álcool Isoamílico (24:1) e centrifugados a 12000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos. As amostras permaneceram durante 20 min a -80 °C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 5 min e o pellet lavado duas vezes com etanol 70% gelado. O pellet foi deixado secando à temperatura ambiente e depois ressuspensionado em 25 µl de TE (pH 8,0). A qualidade do DNA fosmidial foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

O DNA fosmidial das diferentes bibliotecas foi digerido com a enzima de restrição *NotI* (ThermoScientific) seguindo as recomendações do fabricante para DNA plasmidial. A reação ocorreu por 1 h a 37 °C e a avaliação da restrição foi visualizada em Gel de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).

4.11 Caracterização clones das bibliotecas metagenômicas de água e sedimento do Rio Tietê quanto à tolerância aos metais Cd e Ni.

Foram selecionados aleatoriamente 2880 clones das bibliotecas de DNA metagenômico e cultivados sobre meio de cultura com os metais de interesse. A biblioteca PATO02900 foi construída com DNA metagenômico de água com qualidade “regular” (CETESB, 2014), a biblioteca NBS09 foi construída com DNA metagenômico de sedimento do Rio Pinheiros com qualidade “péssima” (CETESB, 2015) e a biblioteca NBS11 foi construída com DNA metagenômico de sedimento com qualidade “boa” (CETESB, 2015).

Após estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) dos metais tóxicos Ni e Cd para o hospedeiro das bibliotecas, a linhagem *E. coli* EPI300-T1R (1 mM), foi avaliada a tolerância dos clones e esses metais nas concentrações 1 mM, 2 mM, 4 mM. A linhagem hospedeira foi utilizada como controle negativo em todos os testes realizados com os clones.

Para identificar a sua resistência a metais, os clones foram inoculados em placas de 96 poços contendo meio LB + cloranfenicol e incubados a 37 °C durante 24 h. Após o período de incubação, os clones foram inoculados, com auxílio de um replicador de 96 dentes, em placas de meio LB contendo cada metal na concentração previamente definida, este procedimento foi realizado em triplicata. O controle negativo foi inoculado junto com os clones em todas as placas que foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Após a incubação, os clones que cresceram nas três placas, foram semeados, individualmente, em novas placas de meio LB contendo o metal. Finalmente, os clones que cresceram nas novas placas foram inoculados em meio LB líquido acrescentado do metal e incubados a 37 °C durante 24 h. Foram considerados como resistentes aqueles clones que cresceram nos três testes realizados.

4.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados metagenômicos foram realizadas com auxílio do *software* STAMP que utiliza os perfis metagenômicos gerados no MG-RAST como *input*. As análises de diversidade foram realizadas com auxílio do *software* PAST versão 3.12 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Foram calculados o estimador de riqueza Chao-1 e os índices de diversidade Simpson 1-D e Shannon-H. A análise estatística dos dados de diversidade foi realizada utilizando as ferramentas do pacote estatístico Laercio disponível para uso no *software* R 2.15.1. (*The R Foundation for Statistical Computing*, 2012).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros físico-químicos das amostras de água e sedimento

Para a avaliação do impacto gerado pelo despejo de esgoto doméstico e industrial no rio foram medidos diferentes parâmetros físicos, químicos e biológicos. Estes parâmetros são medidos periodicamente pela CETESB e publicados anualmente no relatório de Águas Superficiais. Os principais parâmetros físico-químicos referentes às 64 amostras de água (32 para cada temporada) e às 14 amostras de sedimento (sete em cada ano) contempladas no projeto, coletadas entre 2013 e 2014, são apresentados nas tabelas 1A do anexo. Na Nascente, não foram medidos parâmetros físico-químicos no ano 2013 e apenas alguns foram medidos no ano 2014.

A CETESB utiliza índices que integram os resultados de vários parâmetros físico-químicos e microbiológicos para medir a qualidade da água e do sedimento. O IQA, índice de qualidade de água, considera variáveis que indicam o lançamento de efluentes sanitários no corpo d'água, são nove parâmetros: Condutividade, Turbidez, Nitrato, Nitrogênio amoniacal, OD, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Fósforo, *E. coli* e Clorofila a. O índice varia de 0 a 100 e classifica a água pela sua qualidade assim: 100-80 ótima, 79-52 boa, 51-37 regular, 36-20 ruim, 10-0 péssima.

A qualidade dos sedimentos é medida através do Critério de Avaliação da Qualidade dos Sedimentos - CQS que classifica o sedimento em categorias de acordo com as linhas de evidência: Contaminação Química, Comunidade Bentônica e Toxicidade. São levados em consideração dois índices para medir a qualidade do sedimento: o índice TEL, indica a concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos biológicos adversos; o índice PEL, indica a concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos biológicos. Medidas abaixo do TEL são classificadas como “ótimas”, medidas acima do TEL e abaixo do PEL, são classificadas como “boas” ou “regulares” e medidas acima do PEL são consideradas “ruins” ou “péssimas”.

Os resultados físico-químicos apresentados na tabela 1A do anexo demonstram que a maioria dos pontos pertencentes às UHRHs 5, 6, e 10 são os mais contaminados, pois apresentam os maiores valores de condutividade, DBO e *E. coli*, assim como os valores mais baixos OD. Por outro lado, os pontos encontrados nas UGRHs 13, 16 e 19 apresentam maiores valores de OD, e menores valores de condutividade, DBO e *E. coli*. Outros contaminantes

como o fósforo e o nitrogênio também estão em menor quantidade nestas UGRHIs, caracterizando-se como ambientes não poluídos.

5.2 População bacteriana cultivável nas amostras de água e sedimento de diferentes pontos ao longo da bacia do Rio Tietê.

Com o objetivo de estimar a população cultivável presente nas amostras de água e sedimento, assim como para a montagem de uma coleção de bactérias isoladas do Rio Tietê, foi realizado o isolamento em meio de cultura. Os resultados das contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) na água, em cada ponto de amostragem são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônia quantificadas nas amostras de água nos dois anos avaliados.

UGRHI	PONTO	UFC ml ⁻¹ 2013	UFC ml ⁻¹ 2014
5	JUNA04900	1,4x10 ⁵ ± 2,4x10 ⁶	1,9x10 ⁷ ± 2,4x10 ⁶
5	CMDC02900	1,3x10 ⁵ ± 2,4x10 ⁶	NR
5	CPIV02700	1,1x10 ⁴ ± 2,4x10 ⁶	7,1x10 ⁶ ± 1,3x10 ⁶
5	TIBB02900	1,5x10 ³ ± 1,3x10 ⁶	NR
5	TATU04850	1,7x10 ⁶ ± 1,3x10 ⁶	3,5x10 ⁷ ± 1,8x10 ⁷
5	PCAB2192	7,3x10 ³ ± 1,3x10 ⁶	NR
6	NASCENTE	6,9x10 ² ± 1,1x10 ²	2,5x10 ⁴ ± 6,4x10 ³
6	BQGU03950	5,1x10 ⁵ ± 2,8x10 ⁴	1,2x10 ⁸ ± 7,0x10 ⁶
6	TAMT04900	9,2x10 ⁵ ± 6,4x10 ⁴	7,5x10 ⁷ ± 7,0x10 ⁵
6	PINH 04500	NR	7,2x10 ⁷ ± 7,7x10 ⁶
6	TIET04200	2,1x10 ⁵ ± 2,5x10 ⁴	2,5x10 ⁷ ± 6,1x10 ⁶
6	TIPI04900	1,0x10 ⁶ ± 1,7x10 ⁵	1,2x10 ⁷ ± 4,8x10 ⁶
10	TIRG02900	8,5x10 ⁵ ± 7,7x10 ⁴	1,4x10 ⁷ ± 3,5x10 ⁶
10	SOIT02850	1,8x10 ² ± 1,7x10 ¹	NR
10	SORO02100	5,4x10 ⁴ ± 3,9x10 ³	7,0x10 ⁶ ± 4,7x10 ⁵
10	TIET02400	4,8x10 ⁴ ± 6,2x10 ³	4,7x10 ⁵ ± 1,0x10 ⁵
10	TIET02450	9,3x10 ⁴ ± 6,8x10 ³	2,7x10 ⁶ ± 2,5x10 ⁶
10	TIET02500	2,7x10 ⁴ ± 6,7x10 ³	NR
13	LENS03950	1,3x10 ⁴ ± 4,0x10 ³	1,4x10 ⁵ ± 2,2x10 ⁴
13	RGRA02990	3,3x10 ⁵ ± 6,8x10 ⁴	3,9x10 ⁷ ± 1,9x10 ⁶
13	JPEP03600	3,9x10 ³ ± 7,3x10 ²	4,0x10 ⁵ ± 3,5x10 ⁴
13	JCGU03900	7,9x10 ³ ± 2,5x10 ²	7,0x10 ⁵ ± 5,7x10 ⁴
16	TIET02600	1,1x10 ³ ± 2,7x10 ²	5,9x10 ⁴ ± 1,4x10 ⁴)
16	BATA02800	1,3x10 ³ ± 6,3x10 ¹	NR
16	ESGT2050	3,0x10 ² ± 2,3x10 ¹	2,0x10 ⁵ ± 4,9x10 ⁴
16	DADO2600	1,5x10 ² ± 2,0x10 ¹	3,7x10 ⁴ ± 1,4x10 ³
16	TIPR02990	3,1x10 ² ± 5,0x10 ¹	3,9x10 ⁴ ± 2,1x10 ⁴
19	TIET02700	1,1x10 ³ ± 9,9x10 ¹	1,8x10 ⁵ ± 1,4x10 ⁴
19	PATO02900	2,0x10 ³ ± 3,8x10 ²	2,1x10 ⁴ ± 5,7x10 ³
19	TITR02100	6,1x10 ³ ± 1,8x10 ²	2,3x10 ⁵ ± 1,0x10 ⁵
19	TITR02800	3,2x10 ³ ± 1,6x10 ²	3,9x10 ⁴ ± 4,2x10 ³
19	PARN 02100	1,2x10 ³ ± 3,6x10 ²	3,7x10 ⁴ ± 2,8x10 ³
18	ISOL02995	2,4x10 ³ ± 1,3x10 ³	1,9x10 ⁴ ± 7,0x10 ²

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos. 2013 - temporada de seca. 2014 - temporada de chuva; UFC - Unidades Formadoras de Colônia; NR – Não Realizado.

A tendência da população bacteriana ao longo da bacia hidrográfica está representada na figura 6. Foi observado um aumento na quantidade de bactérias de 2013 para 2014. A nascente foi o local onde uma menor contagem de bactérias foi detectada por isolamento, em ambas as temporadas. Dados similares foram evidenciados nas amostras pertencentes a pontos nas UGRHIs 13, 16 e 19, com valores de inferiores a 10^6 UFC ml^{-1} . Já os pontos pertencentes às UGRHIs 5, 6 e 10 apresentaram contagens bacterianas da ordem de 10^5 UFC ml^{-1} no ano 2013 e de 10^7 UFC ml^{-1} no ano 2014.

Uma vez realizadas a estimativa da população, todas as bactérias que apresentavam morfologias diferentes em cada ponto de amostragem foram isoladas e preservadas a -80 °C para compor o banco de isolados do Rio Tietê. Ao total foram coletadas 797 bactérias das amostras de água, sendo 469 da primeira temporada de amostragem e 371 da segunda. Com uma média de 12 bactérias por ponto. Para compor a coleção de bactérias, cada isolado foi catalogado de acordo com o local de amostragem e tipo de amostra da qual foi isolado (água ou sedimento). Assim, todas as bactérias isoladas de amostras de água estão catalogadas como NBA e todas as bactérias de isoladas de amostras de sedimento como NBS.

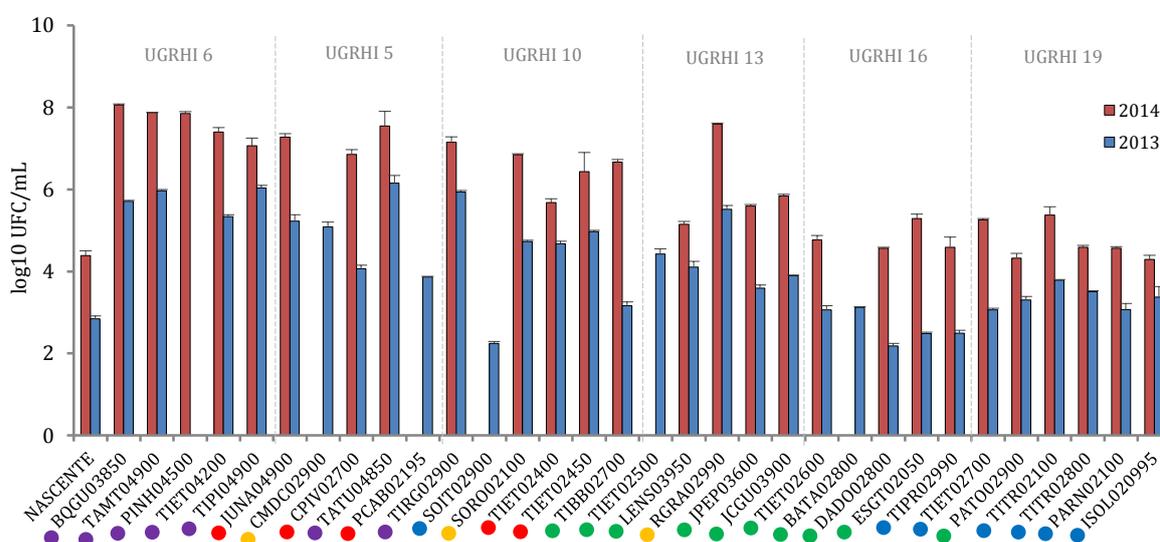


Figura 6- Densidade bacteriana nas amostras de água nas duas temporadas avaliadas. UFC – Unidades Formadoras de Colônia; UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto (2014) está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

A população bacteriana dos sete pontos de sedimento foi também avaliada em dois anos diferentes (2013 e 2014), no entanto, visto que as coletas de sedimento acontecem uma vez por ano, os valores não refletem sazonalidade, mas repetibilidade. Os resultados das contagens bacterianas nas amostras de sedimento são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Unidades formadoras de colônia quantificadas nas amostras de sedimento, nos dois anos de amostragem.

UGRHI	PONTO	UFC ml ⁻¹ 2013	UFC ml ⁻¹ 2014
6	NASCENTE	$4,10 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$	$1,43 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$
6	PINH 04500	NR	$9,72 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^4$
5	PCAB 02195	$1,40 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^4$	$7,70 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^3$
5	ATIB 02800	$4,70 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	$7,60 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^3$
10	TIBB 02900	$3,90 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^4$	$3,40 \times 10^4 \pm 2,9 \times 10^3$
10	SOIT02850	$4,00 \times 10^4 \pm 1,7 \times 10^3$	$2,80 \times 10^4 \pm 3,1 \times 10^3$
16	TIPR02800	NR	$2,40 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^3$

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos; UFC - Unidades Formadoras de Colônia; NR – Não Realizado.

Ao contrario do observado na amostra de água, a população bacteriana no sedimento da Nascente se manteve estável entre as duas coletas, tendo sido encontrada uma concentração bacteriana similar à da amostra de água de 2014. Foram isoladas 246 bactérias dos 14 pontos de sedimento avaliados, 81 delas foram isoladas em 2013 e 165 em 2014, com uma média de 17 bactérias por local de amostragem. Dessa forma, a coleção de bactérias (planctônicas e bentônicas) da bacia do rio Tietê conta com 1043 representantes, isolados de diferentes pontos de água e sedimento ao longo da bacia.

Durante a montagem da coleção, foram verificadas diferenças nas morfologias bacterianas entre pontos considerados poluídos e locais mais limpos (Fig. 7). Houve prevalência de colônias brancas e pequenas em amostras localizadas em pontos com qualidades de água “ruins” e “péssimas” como TATU04850 pertencente à UGRHI 5 (Fig. 7 a). Já na amostra JCGU03900, localizada em uma região mais limpa do rio, cresceram bactérias com diferentes pigmentações, tamanhos e morfologias (Fig. 7 b).

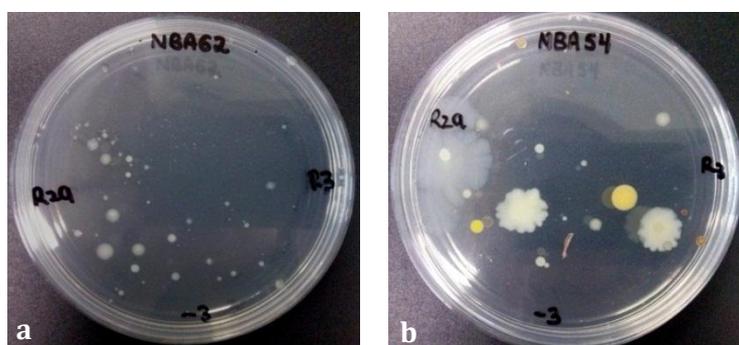


Figura 7 – Características morfológicas dos isolados bacterianos em pontos do rio com diferentes qualidades de água. a) amostra do ponto TATU04850 (UGRHI 5) b) amostra do ponto JCGU03900 (UGRHI 13)

Embora a correlação entre diferenças morfológicas e taxonômicas não tenham sido consideradas no presente trabalho, esta variação morfológica pode demonstrar uma maior variabilidade em pontos do rio menos poluídos, classificados como “bons” e “ótimos”.

Com o objetivo de verificar se a qualidade da água ou do sedimento tem influência na composição da população bacteriana cultivável do rio, foram coletados aleatoriamente 200 isolados provenientes de locais classificados nos cinco diferentes IQA ou CQS: “ótimo”, “bom”, “regular”, “ruim” e “péssimo”, para identificação via sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Do total de isolados enviados para sequenciamento, 156 foram identificados até nível taxonômico de gênero com no mínimo 96% de similaridade com sequências bacterianas depositadas na base de dados do *GeneBank*. Os gêneros mais abundantes foram *Bacillus* (21,3%) e *Pseudomonas* (10,7%), os quais foram isolados de todos os pontos avaliados, independente da qualidade da água ou do sedimento. O gênero *Bacillus* foi mais o abundante nas amostras dos locais menos poluídos (“ótimo” e “bom”), em contrapartida, *Pseudomonas* apresentou maior abundância em locais mais contaminados (“regular” e “ruim”) (Fig. 8). O gênero *Comamonas*, que também foi um dos mais abundantes, foi detectado apenas em amostras mais poluídas (“regular”, “ruim” e “péssimo”).

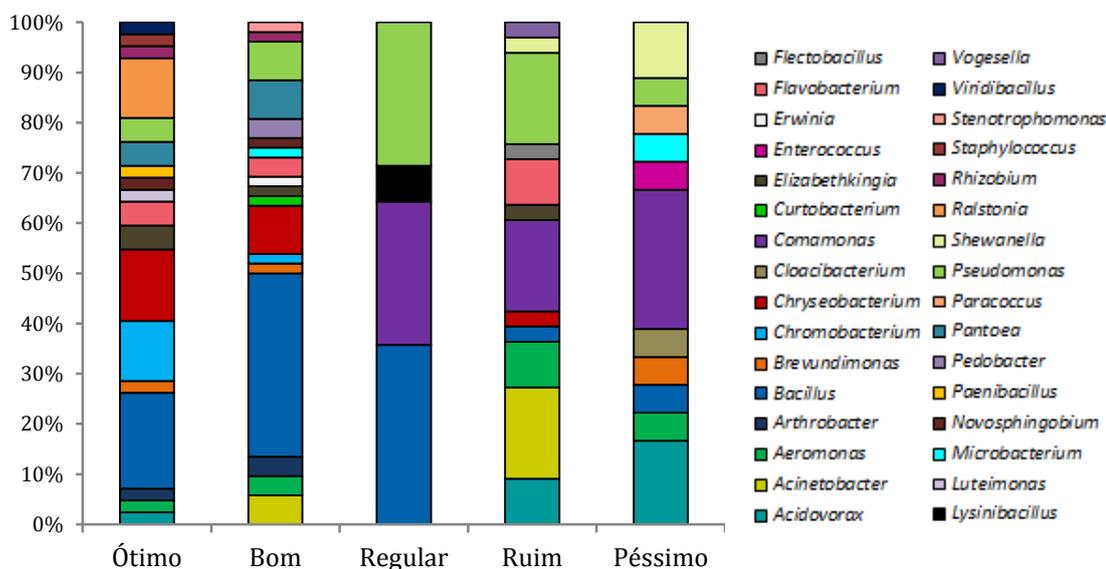


Figura 8 – Gêneros bacterianos identificados em diferentes locais ao longo do Rio Tietê. n (ótimo) = 42; n (bom) = 52; n (bom) = 14; n (regular); n (ruim) = 33; n (péssimo) = 18.

Nas amostras de pontos classificados como “regular” foram observadas abundâncias similares desses três grupos taxonômicos. Foi observado também um maior número de gêneros nas amostras de locais limpos, levando em consideração que dos 33 gêneros encontrados em todas as amostras, 24 foram detectados em locais com índices de qualidade “ótimo” e “bom”.

5.3 Avaliação da tolerância a altas concentrações de metais tóxicos de bactérias isoladas do Rio Tietê.

Foi avaliada a capacidade das bactérias isoladas do Rio Tietê em crescerem em diferentes concentrações dos metais cádmio e níquel. As três concentrações testadas estão acima dos valores permitidos pelo CONAMA (Resolução n°. 357 de 2005). O limite de Cd permitido nos rios de classe 3 é de 0,01 mg/L e de 0,001 mg/L nos rios de classes 1 e 2. No caso do Ni a máxima concentração do metal permitida nos corpos d’água das classes 1, 2 e 3 é de 0,0025 mg/L. Nos rios de classe 4, a concentração máxima permitida desses metais no corpo d’água é 1 mg/L (0,009 mM para Cd e 0,017 mM para Ni).

Todos os isolados bacterianos foram testados quanto à habilidade de crescer em concentrações de CdCl₂ ou NiCl₂ de 1 mM, 2 mM e 4 mM. Foi observado que 191 (18,3%) das bactérias foram resistentes/tolerantes até 4 mM de CdCl₂ e 96 delas (9,2%) foram tolerantes até 4 mM de NiCl₂. Trinta e cinco isolados (3,4%) exibiram a capacidade de crescer nos dois metais avaliados numa concentração de 4 mM. Na figura 9 está representada a abundância de bactérias tolerantes a 4 mM de CdCl₂ ou NiCl₂ nas amostras de água, bem como a concentração desses metais nos pontos de amostragem, nos dois anos avaliados. A maior parte das bactérias tolerantes a concentrações de 4 mM foi isolada de locais com vocação industrial ou em industrialização, UGRHIs 5, 6 e 10, no entanto, também houve bactérias isoladas de UGRHIs não industrializadas (13, 16 e 19) exibindo tais características (Fig. 9).

A maior frequência de bactérias tolerantes a 4 mM de NiCl₂ foi observada nos pontos CPIV02700 (UGRHI 5) e PARN02100 (UGRHI 19) (Fig. 9). Referente a Cd, a maior abundância de bactérias tolerantes a 4 mM de CdCl₂ foi observada no ponto TIRG02900 (UGRHI 10). Estes resultados indicaram que não existe uma relação direta entre as concentrações destes metais tóxicos na água e a abundância de bactérias cultiváveis tolerantes. No entanto, como foi mencionado anteriormente, a maior parte de bactérias

tolerantes foi isolada de UGRHIs industrializadas (5, 6 e 10), estas UGRHIs mostraram uma maior concentração de Ni do que as UGRHIs não industrializadas (13,16 e 19) (Fig. 9). A concentração de Cd na água ao longo do rio se manteve abaixo dos limites permitidos, durante os dois anos avaliados, sem haver diferenças na concentração entre UGRHIs industrializadas e não industrializadas.

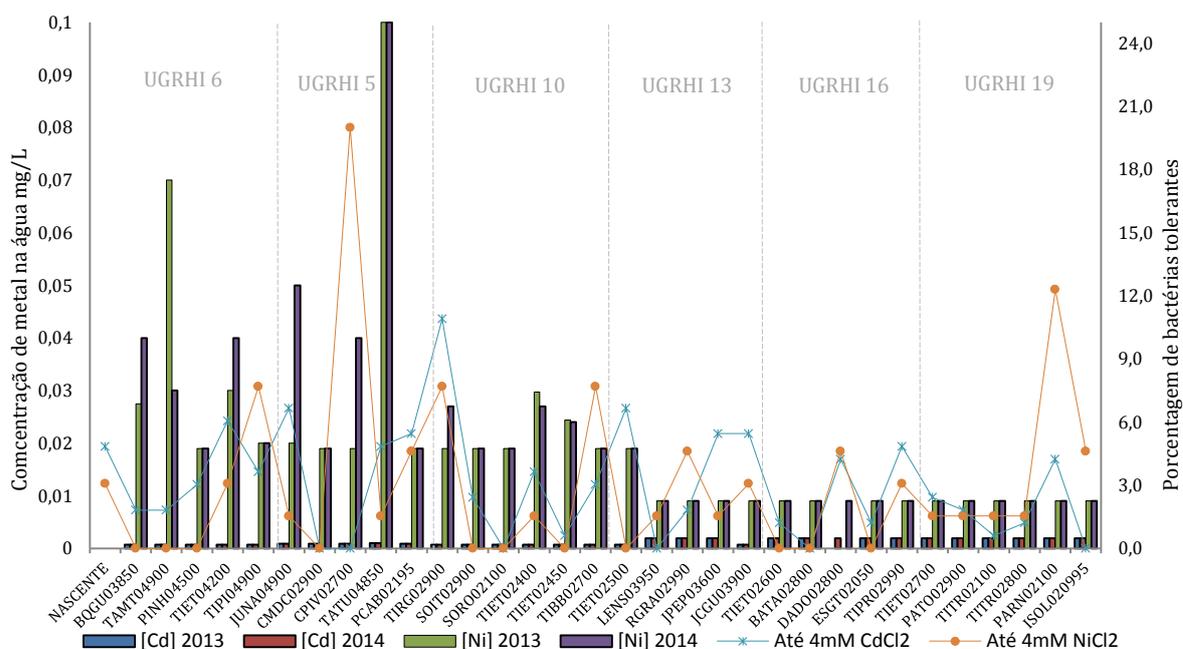


Figura 9 – Concentração dos metais Cádmiio (Cd) e Níquel (Ni) na água e abundância de bactérias tolerantes a concentrações de até 4 mM isoladas de 33 pontos de amostragem ao longo da bacia.

Mesmo que a porcentagem de isolados com habilidade de crescer em concentrações de 4 mM de CdCl_2 ou NiCl_2 foi menor a 20%, muitos deles cresceram em concentrações mais baixas dos metais. Os resultados demonstraram que 51% e 67% das bactérias foram capazes de crescer em 1 mM de CdCl_2 ou NiCl_2 , respectivamente. Essa concentração de metal é 100 vezes maior do que o máximo valor permitido para os rios de classe 4.

Entre as bactérias identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, doze exibiram a capacidade de crescer a 4 mM de CdCl_2 , sendo elas pertencentes aos gêneros *Chromobacterium* (1), *Elizabethkingia* (1), *Chryseobacterium* (3), *Shewanella* (2), *Bacillus* (1), *Brevundimonas* (1), *Comamonas* (1), *Pseudomonas* (1) e *Flavobacterium* (1). Duas (*Comamonas* e *Aeromonas*) mostraram a capacidade de crescer a 4 mM de NiCl_2 , enquanto 1 isolado de *Pseudomonas* e outro de *Comamonas*, foram tolerantes a 4 mM de ambos os metais.

Algumas bactérias resistentes incluindo duas com capacidade de crescer a 4 mM dos metais avaliados, foram isoladas de locais com qualidade de água “boa” ou “ótima”, entre eles a Nascente.

As bactérias isoladas de sedimento apresentam uma tolerância menor ao Cd e maior ao Ni do que as bactérias isoladas de água. Das 191 bactérias tolerantes até 4 mM de CdCl₂, apenas 23 (12%) foram isoladas de sedimento. No caso do NiCl₂, 65% das bactérias tolerantes até 4 mM provinham de amostras de sedimento. De maneira similar ao observado nas amostras de água, a maior parte dessas bactérias tolerantes foi isolada de pontos localizados em UGRHIs industrializadas (5 e 6). As análises físico-químicas realizadas pela CETESB mostraram concentrações de Cd e Ni acima dos limites permitidos para sedimento em algumas das amostras coletadas nas UGRHIs 5 e 6 (Tabelas 2A anexo). Igualmente foram encontradas bactérias tolerantes em pontos considerados limpos, como a Nascente, onde não se espera que exista contaminação de metais devido à atividade humana.

5.4 Padronização do método de extração para a obtenção de DNA de alto peso molecular.

Vários testes foram realizados para selecionar o método mais apropriado para a extração de DNA de alto peso molecular. Os resultados demonstraram que a extração usando o *Power Soil DNA Isolation kit*® da MoBio produziu DNA de melhor qualidade, embora a quantidade fosse menor. Essa qualidade foi verificada através de eletroforese em géis agarose padrão. No entanto, quando o DNA foi corrido utilizando o equipamento de Campo Pulsado, foi observado que o material genético muito fragmentado. Também foram testados métodos de extração manual (fenol/clorofórmio) ao invés de *kits* de extração, que usualmente utilizam *beads* para lisar as células, que podem quebrar também o DNA. A eficácia do método para extrair DNA do peso necessário para o sequenciamento e a construção das bibliotecas metagenômicas (40 kb) foi verificado através de eletroforese em Campo Pulsado (Fig. 10).

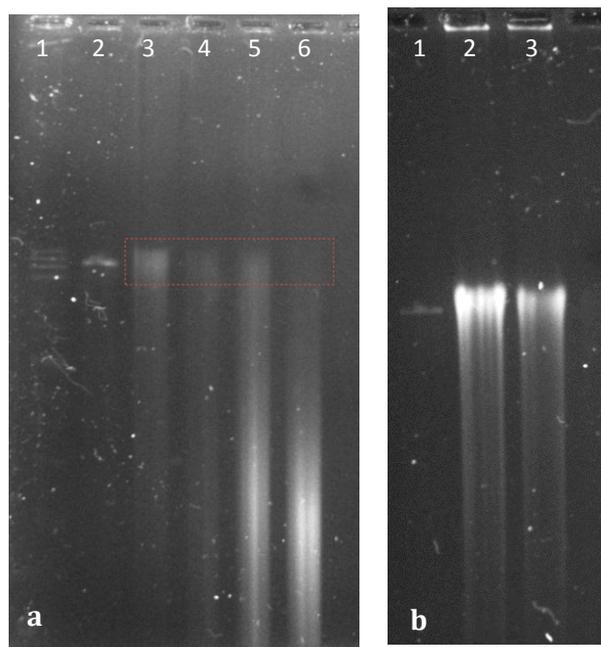


Figura 10 – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) de DNA genômico. a) DNA extraído com diferentes protocolos de extração: Poços: 1) marcador de alto peso molecular; 2) DNA controle; 3) e 4) amostras de sedimento extraídas pelo método manual m; 5) e 6) amostras de sedimento extraídas com *kit*. b) Amostras de sedimento para a construção de bibliotecas metagenômicas. Poços: 1) DNA controle (incluído no *kit*); 2) NBS09; 3) NBS11. A linha pontuada indica a região onde deveria estar concentrada a maior quantidade de DNA.

Na figura 10 a, é possível observar diferença na integridade do gDNA extraído com o protocolo manual daquele extraído utilizando *kit* de extração. Nos poços 2 e 3, é observado o DNA das amostras NBS09 (PINH04500) e NBS11 (TIPR02800), respectivamente, extraídas utilizando o protocolo manual (fenol/clorofórmio) descrito no item 4.7. Nos poços 4 e 5, o DNA das mesmas amostras extraído utilizando o *Power Soil DNA Isolation kit*® da MoBio. Foi observado que o DNA nos poços 3 e 4, está concentrado no topo do gel, exibindo boa qualidade, embora tenha sido observada uma degradação comumente observada em amostras ambientais. As amostras dos poços 5 e 6 no entanto, apresentaram um perfil diferente, com uma degradação muito mais evidente sendo que, a maior parte do DNA, encontra-se na parte inferior do gel (Fig. 10 a).

Uma vez padronizado, foi selecionado o método sugerido por Castro et al. (2011) para a extração de gDNA das amostras de água e sedimento obtendo resultados satisfatórios tanto quanto à qualidade quanto pela quantidade (Fig. 11). Após a extração, a concentração do gDNA foi medida por Qubit® (Fig. 11 b) e a integridade observada por eletroforese gel de agarose 1% (Fig. 11 a). Para garantir que o sequenciamento *Shotgun* seja bem-sucedido, a MacroGen exige uma quantidade mínima de 2 µg de gDNA e, preferivelmente, sem evidência

de degradação. Uma vez que o gDNA das amostras TIET24, TIET25, PATO, TITR, NBS09 e NBS11 preenchia estes requisitos, foram sequenciados pela plataforma Illumina® HiSeq2000.

O rendimento gerado por cada uma das amostras foi de aproximadamente 12 Gb. A amostra PINH04500, que também foi encaminhada para sequenciamento, não passou no teste de qualidade realizado pela Macrogen, Inc., devido à degradação da amostra, e por esse motivo, não pode ser sequenciada.

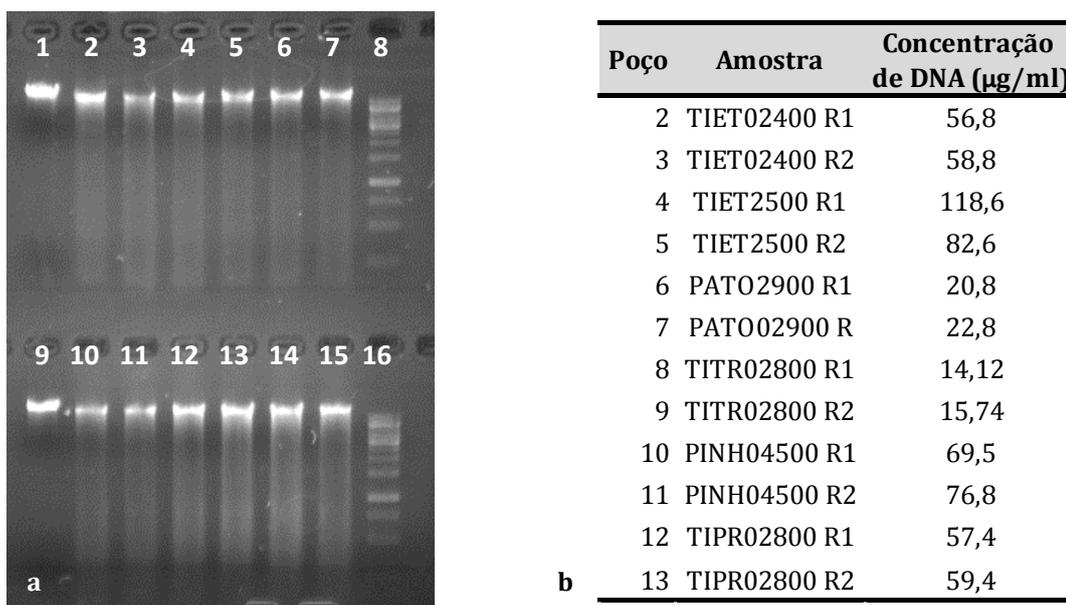


Figura 11 – a) Eletroforese em gel de agarose 1%. DNA genômico de amostras selecionadas para análise metagenômica. Poços 1 e 9: λ (50ng); 8 e 16: marcador 1kb; 2-11: amostras de água; 12-15: amostras de sedimento. **b)** Concentração de DNA (µg/ml) quantificada em cada amostra.

5.5 Parâmetros físico-químicos das amostras de água para análise metagenômica.

As amostras de água para análise metagenômica foram realizadas em Novembro de 2014. Todas as análises físico-químicas, eco toxicológicas e microbiológicas foram realizadas pela CETESB. Na tabela 4 são apresentados os parâmetros avaliados para calcular o IQA nas amostras de água. Na tabela 3A do anexo são mostrados os resultados de todas as análises realizadas. Esses dados também estão disponíveis no relatório de qualidade de águas superficiais de 2014 (CETESB, 2015).

Tabela 4 – Parâmetros avaliados pela CETESB para calcular o IQA em amostras de água.

Parâmetro	Padrão CONAMA	TIET02400	TIET02500	PATO02900	TITR02800
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	-	685	441	209	171
OD (mg/L)	>5	1,2*	5,26	2,7*	7,6
DBO (mg/L)	<5	55*	6*	7*	2
Fósforo total (mg/L)	<0,1	3,36*	0,36*	0,45*	0,017
Nitrato (mg/L)	<10	< 0,2	5,66	< 1	< 1
N-amoniaco (mg/L)	<3,7	22,3*	0,4*	3,42	0,1
Turbidez (UNT)	<100	120*	11,7	7,6	2,7
<i>E. coli</i> (UFC/100 ml)	<600	6900*	80	468	1
Clorofila a (mg/L)	<30	-	32,41*	1,07	10,16
UGRHI	-	10	13	19	19
Classificação – IQA	-	péssima	boa	regular	ótima
Valor do IQA	-	15	60	47	86

(*) Não atendimento aos padrões de qualidade da Resolução CONAMA 357/05; OD – Oxigênio Dissolvido; DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio; UNT – Unidades Nefelométricas de Turbidez; UGRHI - Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos; UFC - Unidades Formadoras de Colônia; IQA – Índice de Qualidade de Água.

Para verificar quais dos parâmetros físico-químicos avaliados poderiam ter maior influência na classificação da qualidade da água e que poderiam afetar a composição e funcionamento das comunidades nos diferentes pontos de amostragem, foi realizada uma análise de PCA (Fig. 12). Os resultados mostraram uma clara separação dos pontos por local de amostragem. Os parâmetros N-Nitrito e N- Nitrato tiveram uma maior influência na separação dos pontos nas amostras de PATO02900. Sólidos suspensos, turbidez, condutividade e Ni e Zn totais, mostraram uma maior influência nas amostras de TIET02400. A qualidade de água das amostras TIET02400 e PATO02900 foi classificada como “péssima” e “regular”, respectivamente, pelos critérios avaliados pela CETESB. A separação das amostras TITR02800 e TIET02500 foi influenciada apenas pelo parâmetro OD.

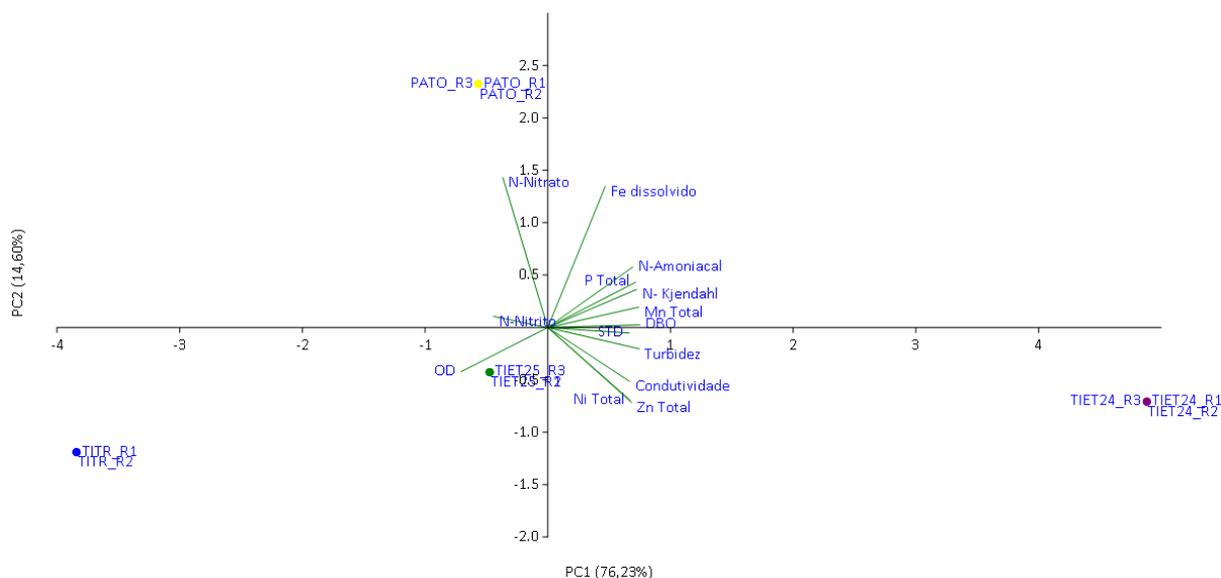


Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de água para análise metagenômica. PCA1:73,26%, PCA2: 14.60%. DBO – Demanda Bioquímica de oxigênio; OD – Oxigênio Dissolvido; Fe – Ferro; P – Fósforo; SDT – Sólidos Dissolvidos Totais. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto está indicada pelas cores azul: “ótimo”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

5.6 Análise metagenômica das amostras de água

A classificação taxonômica e funcional das sequências obtidas de cada amostra foi realizada utilizando o servidor MG-RAST versão 3.6. Essas sequências tratadas (CLC® Workbench) e não tratadas (*raw sequences*) foram enviadas ao servidor. Tendo em vista que o servidor MG-RAST sugere enviar as sequências não tratadas, optou-se por considerar apenas as análises dos dados brutos.

O número de sequências obtidas em cada ponto e réplica é mostrado na tabela 5. Para facilitar a visualização dos resultados, os pontos de amostragem receberam os seguintes nomes: TIET24 (TIET02400), TIET25 (TIET02500), PATO (PATO02900) e TITR (TITR02800), cada um com três réplicas identificadas como R1, R2 e R3. Foram analisadas 366,789,760 sequências, das quais 21,446,200 foram descartadas por baixa qualidade. O tamanho médio das sequências foi de 102 pares de bases. A quantidade de sequências foi similar entre as réplicas na maioria das amostras, com exceção de TITR_R2 que apresentou quase o dobro do que TITR_R1, contudo houve uma maior quantidade de sequências de baixa qualidade em TITR_R2 deixando as réplicas mais homogêneas após a filtragem. O conteúdo médio de GC foi de 49% sem variações consideráveis entre réplicas, no entanto, as amostras do ponto TIET24 apresentaram valores ligeiramente mais altos.

Tabela 5 – Resultados do sequenciamento do metagenoma de amostras de água do Rio Tietê

Amostra	No. Sequências	Filtradas	Após filtragem	Conteúdo de GC
TIET24_R1	30.976.976	290.823	30.686.153	52%
TIET24_R2	27.089.841	254.188	26.835.653	51%
TIET24_R3	28.297.410	265.100	28.032.310	52%
TIET25_R1	30.003.298	1.393.401	28.609.897	47%
TIET25_R2	29.549.752	1.364.374	28.185.378	47%
TIET25_R3	23.130.216	924.545	22.205.671	47%
PATO_R1	27.418.103	2.146.943	25.271.160	48%
PATO_R2	30.535.091	2.772.137	27.762.954	48%
PATO_R3	28.421.755	2.600.017	25.821.738	48%
TITR_R1	27.002.727	1.163.502	25.839.225	47%
TITR_R2	50.707.682	6.597.174	44.110.508	50%
TITR_R3	33.656.909	1.673.996	31.982.913	47%
Total	366.789.760	21.446.200	345.343.560	49%

Aproximadamente 6% das sequências foram removidas por baixa qualidade, uma vez filtradas, os resultados mostraram que em todas as amostras, aproximadamente 8% das sequências correspondem a genes de RNA ribossomal, 42% contem proteínas de função conhecida e o 50% restante contem proteínas de função desconhecida. A classificação taxonômica no nível de domínio mostrou que aproximadamente 98% das sequências pertencem ao domínio Bacteria, 0,8% pertencem a Eukaryota, 0,4% pertencem a Archaea e 0,2% a Virus.

Os perfis taxonômicos e funcionais gerados a partir da plataforma MG-RAST foram utilizados como *input* no *Software* STAMP para realizar as análises estatísticas. Foi realizada a análise de *T-test* entre as três amostras de cada um dos pontos de amostragem, para verificar a sua condição de réplica. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os trios de amostras, sendo, portanto, consideradas réplicas verdadeiras.

5.6.1 Composição taxonômica das amostras de água

A análise taxonômica das sequências em diferentes níveis de resolução é realizada na plataforma MG-RAST comparando a similaridade com sequências de proteínas depositadas na base de dados M5NR. Essa análise taxonômica não é baseada no gene 16S rRNA, mas no perfil funcional.

Os cinco filios mais abundantes nas amostras de água analisadas foram Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Cyanobacteria (Fig. 13). O filo com maior abundância em todas as amostras foi Proteobacteria, no entanto, foram observadas diferenças entre os pontos avaliados em relação à abundância deste, visto que no ponto TIETE25 representou 58,6%, em TITR foi 48,1% e no ponto PATO representou 80,6% das sequências. Tanto nas amostras do TIET25 quanto nas do TITR o segundo filo mais abundante foi Cyanobacteria com porcentagens médias de aproximadamente 23%. Este filo representou apenas 0,4% nas amostras do ponto PATO.

No nível de classe, as amostras apresentaram perfis diferentes entre locais de amostragem, mas as réplicas foram estatisticamente iguais (Fig. 13). As amostras de TIET24 mostraram quantidades similares de Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, com valores de abundância relativa ao redor dos 43%. As amostras TIET25 e TITR exibiram maior frequência de Gammaproteobacteria com valores médios de 73,8% e 55,7%, respectivamente, e menores de Betaproteobacteria. Em contrapartida, as três réplicas de PATO apresentaram as maiores porcentagens de Betaproteobacteria encontradas nas amostras, com valores ao redor dos 64%. A classe Alphaproteobacteria foi detectada nas amostras de todos os locais analisados, mais a sua porcentagem foi maior nas amostras de TITR com um valor médio de 18,5%. Deltaproteobacteria e Epsilonbacteria foram as classes menos abundantes em todas as amostras. O ponto TIET24 mostrou as maiores abundâncias nessas taxa (3,46% e 1,39% em média, respectivamente). Foi observada diferença estatística no nível de classe entre os pontos de amostragem.

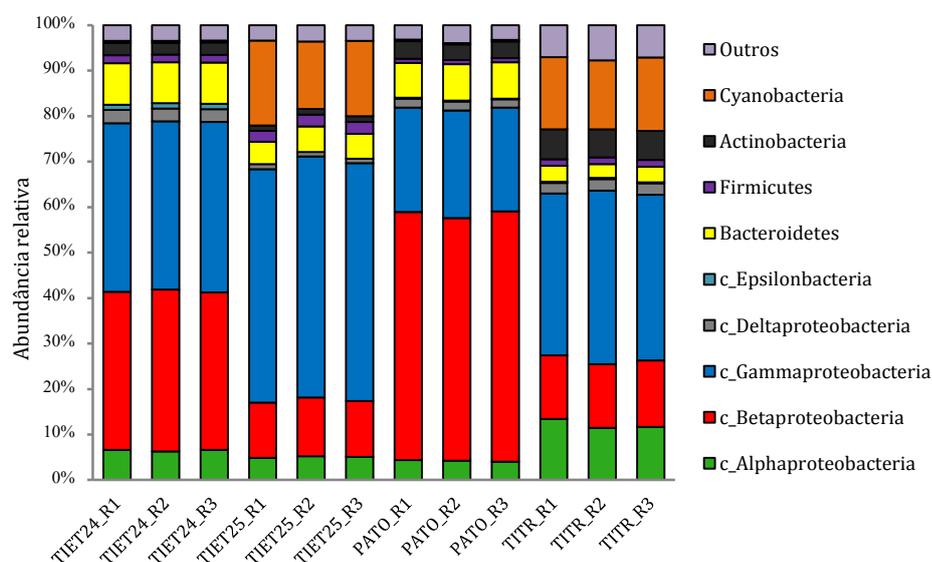


Figura 13 – Abundância relativa de filios e classes do filo Proteobacteria nos diferentes pontos de amostragem ao longo do rio.

Uma das características das amostras do ponto de TITR é a maior porcentagem de sequências pertencentes ao grupo Outros (11%) quando comparada com os demais pontos (<5%). Nesse grupo foram classificados todos os filos cuja abundância relativa foi menor que 4% e que podem ser considerados como filos menos frequentes ou ‘raros’. Uma análise mais detalhada desses grupos permitiu observar a ocorrência do filo Planctomycetes como o mais abundante entre as amostras TITR e TIET25 com abundâncias médias de 3,61% e 1,21%, respectivamente (Fig 1A anexo). Nas amostras TIET24 e PATO o filo mais abundante dentro do grupo dos menos frequentes foi Verrucomicrobia, com uma abundância média de 0,53% em TIET24 e de 0,38% em PATO.

O perfil taxonômico exibido pelas amostras localizadas em pontos do rio mais contaminados TIET24 (“péssima”) e PATO (“regular”) foi similar, exibindo as classes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria como as mais frequentes (Fig. 13). Dentro da classe Betaproteobacteria a ordem Burkholderiales foi a mais abundante nessas amostras, exibindo valores médios de 46,2% no ponto PATO e de 21,7% em TIET24 (Fig. 14). Nas amostras localizadas em pontos com melhor qualidade de água, TIET25 (“boa”) e TITR (“ótima”) a ordem Burkholderiales se mostrou pouco abundante, com valores menores a 10% (Fig. 14). As famílias mais frequentes dentro da ordem Burkholderiales foram Burkholderiaceae e Comamonadaceae, exibindo perfis similares entre todas as amostras (Fig. 2A b anexo). Ainda dentro da classe Betaproteobacteria, a ordem Rhodocyclales foi a terceira mais abundante nas amostras de TIET24 (8,9%), no entanto, foi encontrada em frequências muito menores nos demais pontos, representando menos de 1% nas amostras de TIET25 e TITR (pontos mais limpos). A única família detectada dentro dessa ordem foi Rhodocyclaceae.

Na classe Gammaproteobacteria, a ordem Pseudomonadales foi abundante em todas as amostras, tendo sido encontradas maiores frequências nos pontos TIET25 (36,2%) e TIET24 (22,8%) (Fig. 14). Cabe salientar que embora a abundância relativa da ordem Pseudomonadales tenha sido maior em TIET25, a classe Gammaproteobacteria foi mais abundante no ponto TIET24 (Fig. 12). A análise até nível de família mostrou a predominância do grupo Pseudomonadaceae em todas as amostras com valores acima de 89%, a família Moraxellaceae exibiu uma maior abundância no ponto TIET24 (10%), o mais contaminado, e abundâncias menores a 0,3% nos demais pontos (Fig. 2A a). A ordem Aeromonadales, que também pertence à classe Gammaproteobacteria, foi detectada apenas no ponto TIET24, com uma abundância média de 3,8% (Fig. 13).

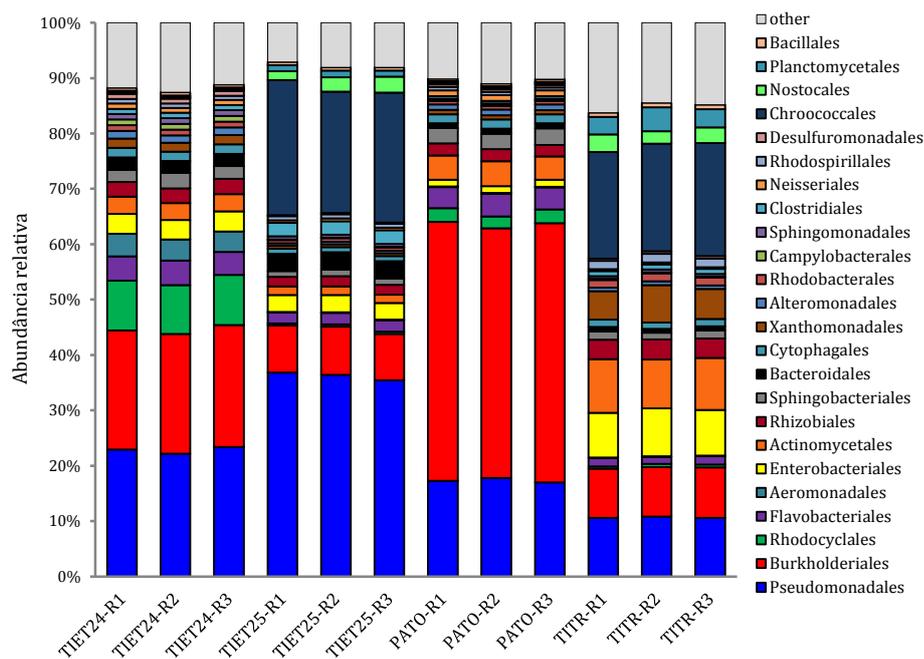


Figura 14 – Abundância relativa no nível de ordem nos diferentes pontos de amostragem ao longo do rio.

O perfil taxonômico observado nas amostras localizadas nos pontos limpos TIET25 e TITR também se mostrou similar, exibindo o filo Cyanobacteria como o segundo mais abundante depois de Proteobacteria. O filo Cyanobacteria foi quase inexistente nas amostras mais poluídas TIET24 e PATO (Fig. 13). Dentro desse filo, apenas as sequências pertencentes à classe Cyanophyceae foram classificadas mostrando uma abundância média de 62,6% em TIET25 e 61,8% em TITR. A ordem mais abundante dentro da família Cyanophyceae foi Chroococcales, sendo também a mais frequente no ponto TITR (19,7%) e a segunda mais abundante no ponto TIET25 (23,2%) (Fig. 14).

O filo Actinobacteria (classe Actinobacteria) que exibiu maior abundância no ponto TITR (9,6%), mostrou prevalência da ordem Actinomycetales (>90%). Essa ordem também foi uma das mais abundantes nas amostras de TITR (9,3%) quando comparada com os outros pontos de amostragem, que exibiram abundâncias menores a 5%. Dentro da ordem Actinomycetales, a família Streptomyetaceae foi a mais abundante nas amostras do ponto TITR (16,7%) tal abundância foi maior do que nos demais pontos amostragem (Fig. 3A anexo).

Foram analisadas até o nível taxonômico de gênero as sequências que mostraram maior abundância (>0,1%). As amostras dos pontos TIET24 e TITR exibiram o maior número de gêneros com abundância maior de 0,1% com 213 e 270, respectivamente. Houve menor quantidade desses gêneros nas amostras TIET25, com 171, e PATO com 184. Na tabela 6

estão listados os 50 gêneros mais abundantes detectados em todas as amostras e a abundância relativa do gênero em cada ponto de amostragem.

Tabela 6 – Classificação taxonômica dos 50 gêneros bacterianos mais abundantes em amostras de água do rio Tietê. Em negrito está destacado o ponto onde a abundância foi maior para cada Gênero.

Filo	Classe	Ordem	Familia	Gênero	Abundância relativa (%)			
					TIET24	TIET25	PATO	TITR
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	19,54	34,90	16,00	9,58
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Chroococcales	unclassified	<i>Microcystis</i>	0,03	15,03	0,01	12,89
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Polynucleobacter</i>	2,55	0,28	9,71	0,88
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas</i>	6,49	0,13	1,04	0,14
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Chroococcales	unclassified	<i>Cyanothece</i>	0,60	4,70	0,06	3,96
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	2,38	1,79	4,43	1,75
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	0,48	0,03	0,08	4,08
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Acidovorax</i>	2,81	0,95	4,08	0,65
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	3,74	0,10	0,12	0,08
Planctomycetes	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Janthinobacterium</i>	0,91	0,67	3,58	0,38
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i>	1,14	0,54	2,79	0,58
Actinobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Polaromonas</i>	1,45	0,54	2,66	0,51
Cyanobacteria	unclassified	Synechococcales	Synechococcaceae	<i>Synechococcus</i>	0,10	1,02	0,09	2,61
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	0,94	0,48	2,49	0,50
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum</i>	0,65	0,06	2,45	0,56
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Herminiimonas</i>	0,61	0,15	2,33	0,26
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	1,09	2,21	0,44	0,33
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	2,06	0,17	0,37	0,20
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	1,89	0,91	1,78	0,32
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>	1,73	0,45	1,37	0,35
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Albidiferax</i>	0,98	0,25	1,60	0,21
Cyanobacteria	Hormogoneae	Nostocales	Nostocaceae	<i>Anabaena</i>	0,04	1,41	0,03	1,53
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Curvibacter</i>	0,56	0,53	1,51	0,08
Actinobacteria	Actinobacteria (class)	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	0,32	0,23	0,51	1,43
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Bordetella</i>	1,40	0,28	0,86	0,38
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	0,63	0,26	1,39	0,22
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	unclassified	<i>Chitinophaga</i>	0,55	0,10	1,30	0,77
Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	unclassified	<i>Synechocystis</i>	0,03	1,40	0,02	1,29
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas</i>	0,86	0,36	0,14	1,29
Cyanobacteria	unclassified	Nostocales	Nostocaceae	<i>Nostoc</i>	0,04	1,23	0,04	1,21
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Burkholderiales	unclassified	<i>Methylibium</i>	0,60	0,08	0,95	0,29
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Verminephrobacter</i>	0,66	0,49	0,94	0,23
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	0,92	0,20	0,51	0,20
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Delftia</i>	0,63	0,44	0,92	0,15
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	<i>Planctomyces</i>	0,08	0,24	0,08	0,85
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Azoarcus</i>	0,80	0,11	0,56	0,13
Planctomycetes	Planctomycetia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	<i>Rhodopirellula</i>	0,06	0,29	0,06	0,77
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Yersinia</i>	0,50	0,15	0,17	0,77
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	0,74	0,22	0,42	0,25
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	0,74	0,18	0,62	0,12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	<i>Methylobacillus</i>	0,30	0,08	0,73	0,12
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Thauera</i>	0,64	0,35	0,34	0,09
Actinobacteria	Actinobacteria (class)	Actinomycetales	Frankiaceae	<i>Frankia</i>	0,11	0,09	0,17	0,62
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	0,61	0,19	0,33	0,29
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Oscillatoriales	Microcoleaceae	<i>Trichodesmium</i>	0,02	0,25	0,02	0,60
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Aromatoleum</i>	0,58	0,42	0,39	0,13
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Oxalobacter</i>	0,19	0,13	0,58	0,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	<i>Methylovorus</i>	0,16	0,04	0,50	0,05
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	0,47	0,21	0,22	0,09
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	0,24	0,44	0,16	0,11
Cyanobacteria	unclassified	Chroococcales	Aphanothecaceae	<i>Crocospaera</i>	0,01	0,12	0,01	0,44

O gênero *Pseudomonas*, pertencente à classe Gammaproteobacteria, foi o mais abundante em todos os pontos de amostragem com exceção de TITR, onde foi o segundo mais abundante depois de *Microcystis*, gênero da classe Cyanophyceae (filo Cyanobacteria). Como

se observa na tabela 6, a maior parte dos gêneros que foram mais abundantes nas amostras TIET25 e TITR não foram abundantes nas amostras TIET24 e PATO, e vice-versa. A única possível exceção seria o gênero *Burkholderia*, representante da classe Betaproteobacteria, que teve uma abundância relativamente semelhante entre os pontos de amostragem.

Os resultados em diferentes níveis taxonômicos mostraram que os perfis exibidos pelas amostras de água, foram aparentemente diferentes entre os pontos de amostragem. A análise de componentes principais (PCA) gerada a partir do perfil taxonômico no nível de filo mostrou uma separação das amostras de acordo com o ponto de amostragem, onde é possível observar quatro agrupamentos diferentes, confirmando portanto, as diferenças taxonômicas entre eles (Fig. 15).

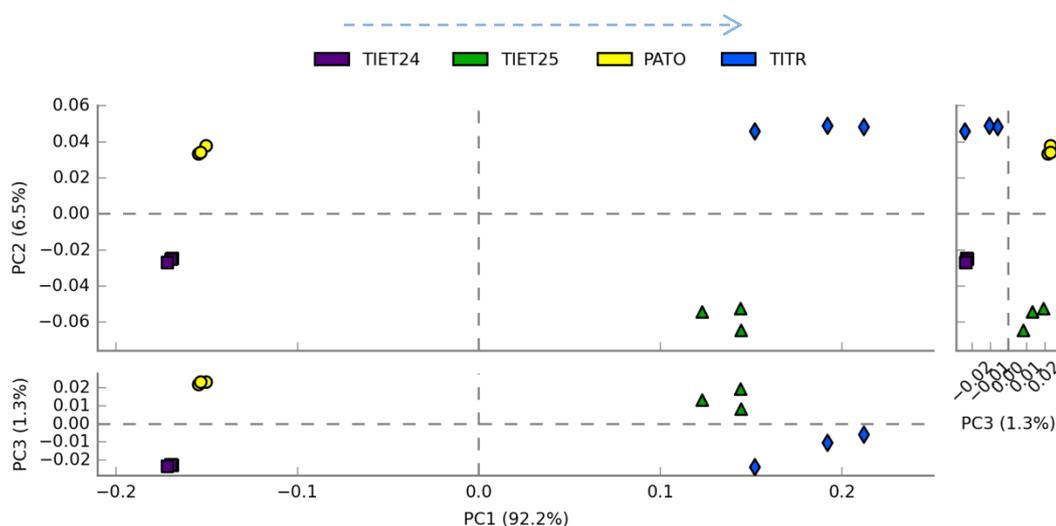


Figura 15 – Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil taxonômico das amostras de água no nível de filo. O gráfico mostra as diferentes componentes para o mesmo grupo de dados PC1 vs PC2; PC3 vs PC2; PC2 vs PC3. PC1: 92,2% - PC2: 6,5% - PC3: 1,3%. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”. A seta em azul indica o percurso natural do rio.

As amostras de PATO e TIET24 se mostraram mais próximas entre elas e separadas das outras amostras, estes pontos estão localizados em regiões do rio com qualidades de água “regular” e “péssima”, respectivamente. Os pontos TIET25 e TITR também apareceram próximos, mas a distância entre eles foi maior daquela exibida entre PATO e TIET24. A qualidade da água no ponto TIET25 foi classificada como “boa” e no ponto TITR como “ótima”.

5.6.1.1 Índices de diversidade

O cálculo dos índices de riqueza e diversidade foi realizado com auxílio do programa Past 7.12., utilizando como *input* os valores de abundância do gene 16S rRNA da base de dados GreenGens. Os valores dos diferentes índices de diversidade e as diferenças estatísticas entre os pontos de amostragem são demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 – Índices de diversidade e estimadores de riqueza calculados em amostras de água de diferentes pontos do rio Tietê. As diferenças estatísticas entre os grupos foram calculadas por Duncan ($p < 0.05$).

	Simpson_1-D	Shannon_H	Chao-1	Dominance_D	Evenness
TIET24	0,8110 b	3,275 b	854,2 a	0,189 b	0,0402 b
TIET25	0,8736 a	3,624 a	557,8 b	0,126 c	0,0893 a
PATO	0,7472 c	2,854 c	502,4 b	0,253 a	0,0458 b
TITR	0,8849 a	3,593 a	493,9 b	0,115 c	0,0962 a

Em negrito é mostrado o maior valor entre os pontos de amostragem para cada índice avaliado. Classificação do Índice da Qualidade da Água (IQA): TIET24 – “péssima”; TIET25 – “boa”; PATO – “regular”; TITR – “ótima”.

Os índices de diversidade Simpson1-D e Shannon-H foram significativamente maiores nas amostras dos pontos TITR e TIET25, locais com qualidade de água “ótima” e “boa”, respectivamente. Os menores valores de diversidade foram observados nas amostras do ponto de amostragem PATO que, conseqüentemente, exibiram os maiores valores de Dominância. De acordo com o estimador de riqueza Chao-1, as amostras do ponto TIET24 apresentaram uma riqueza de espécies bacterianas, estatisticamente maior do que os demais pontos. Não foram detectadas diferenças estatísticas no valor de riqueza entre os pontos TIET24, PATO e TITR (Tabela 7).

5.6.2 Análise funcional das amostras de água

A análise funcional das sequências foi realizada na plataforma MG-RAST versão 3.6. No *pipeline* seguido pelo servidor, a caracterização é realizada comparando as sequências anotadas com diferentes bases de dados conhecidas, entre elas COG (*Clusters of Orthologous Groups of proteins*), eggNOG (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups*) e SEED-Subsystems. De todas as bases de dados, foi selecionada a ontologia gerada na base SEED-Subsystems, pois mostrou maior quantidade de sequências identificadas em todas as amostras. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software STAMP versão 2.1.3 utilizando como *input* o perfil funcional gerado no MG-RAST.

Na anotação pela base de dados SEED os *reads* são agrupados por estarem relacionados com funções específicas nas células. No nível 1, as sequências são divididas em 28 categorias

diferentes. O perfil funcional das amostras de água no nível 1 da classificação com a base de dados SEED-Subsystems é mostrado na figura 16.

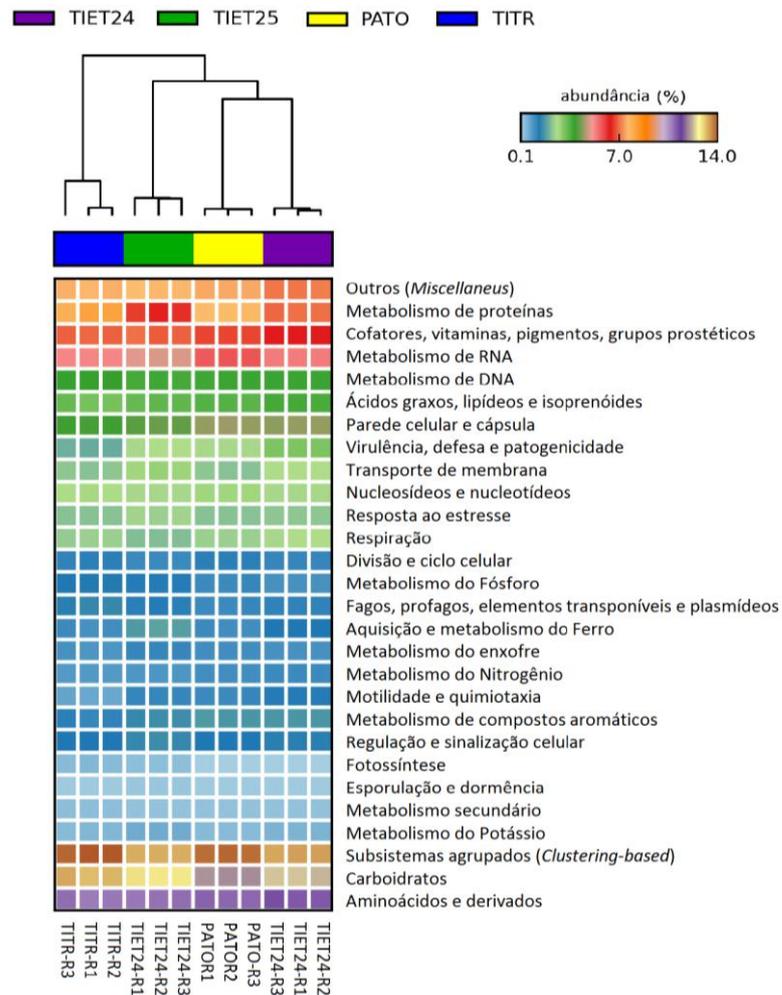


Figura 16 – Heatmap demonstrando o perfil funcional de amostras de água de diferentes pontos do rio, baseado no nível 1 do SEED-Subsystems. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

De forma similar ao exibido pelo perfil taxonômico, o perfil funcional exibiu uma separação das amostras de acordo com local de coleta, inclusive no nível mais alto de hierarquia. O perfil apresentado pelas amostras de TITR foi diferente do exibido pelos outros pontos. TIET24 e PATO mostraram perfis funcionais muito similares, fato que também foi observado na classificação taxonômica. Em todas as amostras, os genes mais abundantes foram aqueles classificados nas categorias *Subsistemas agrupados*, *Carboidratos* e *Aminoácidos e derivados*. É possível observar algumas diferenças, entre os pontos de amostragem, no que se refere à abundância de genes em cada categoria. Os *Subsistemas*

agrupados foram mais abundantes nas amostras TITR e PATO. Genes agrupados nas categorias *Metabolismo de compostos aromáticos* e *Parede celular e cápsula* foram mais abundantes nas amostras de PATO e TIET24. Este último também mostrou uma abundância de genes relacionados a *Virulência, defesa e patogenicidade* maior do que nos outros pontos.

A análise estatística confirmou a existência de diferenças significativas entre os diferentes pontos de amostragem, inclusive nas categorias menos abundantes. A figura 17 mostra as diferenças encontradas no nível 1 do SEED-*Subsystems* em cada um dos pontos de amostragem (TIET24, TIET25, PATO, TITR), quando comparadas com os outros pontos avaliados. O maior número de diferenças estatísticas foi exibido pelas amostras TIET25 e TITR, com 13 categorias funcionais diferentes. O ponto PATO, mostrou a menor quantidade de funções estatisticamente diferentes quando comparado com os outros pontos de amostragem. Nos pontos de amostragem TIET24 e PATO, que apresentam qualidades de água “péssima” e “regular”, respectivamente, foram mais abundantes genes relacionados a *Virulência, defesa e patogenicidade, Metabolismo do nitrogênio* e *Metabolismo do RNA*, entre outros. Os pontos com qualidades de água “boa” e “ótima”, TIETE25 e TITR, exibiram abundâncias significativamente maiores de genes funcionais do metabolismo de carboidratos e de elementos como potássio, ferro, enxofre e fósforo. Genes relacionados às categorias *Fotossíntese* e *Resposta ao estresse* também foram mais abundantes nesses pontos.

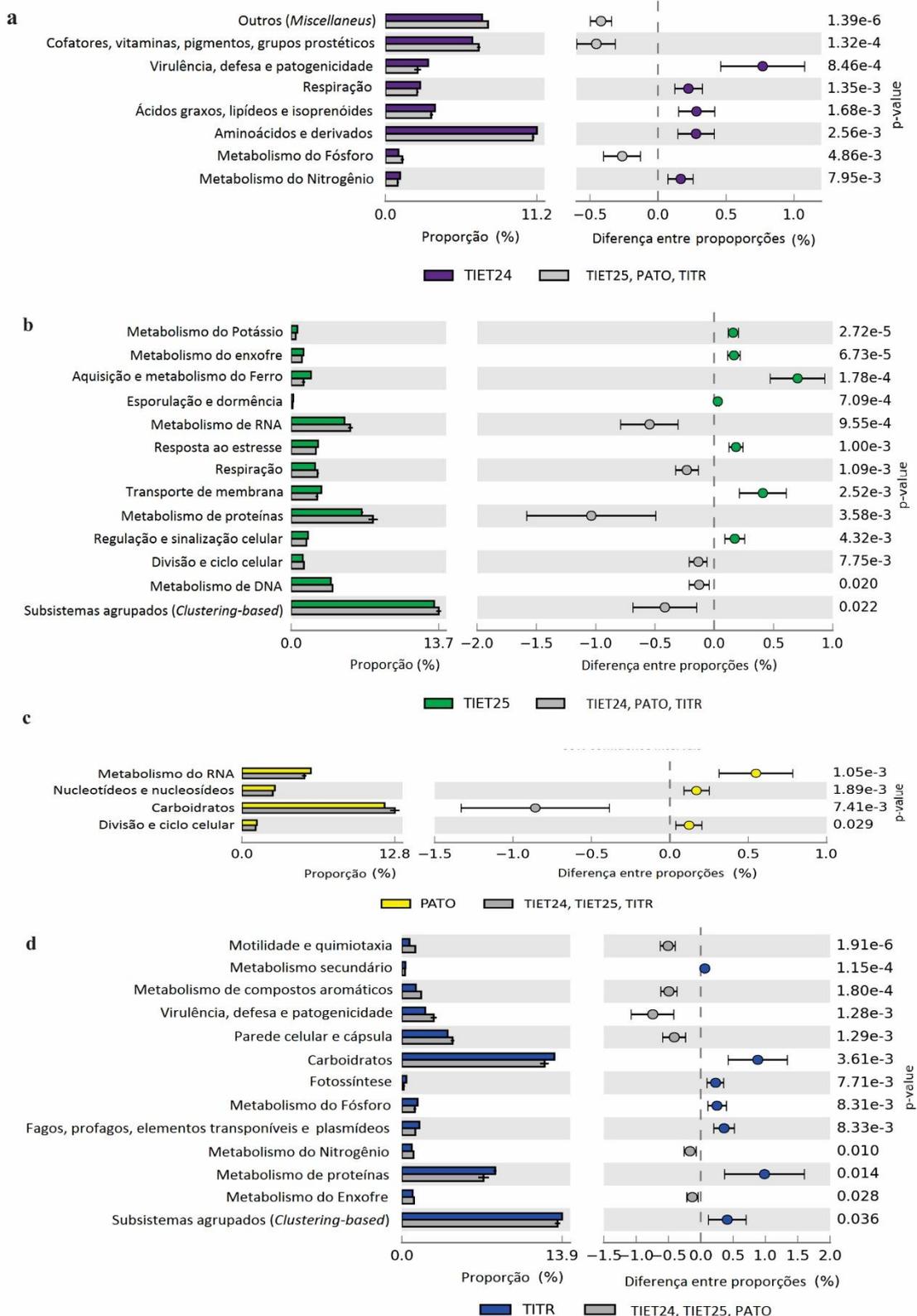


Figura 17 – Categorias funcionais estatisticamente diferentes em cada ponto de amostragem. SEED-Subsystems nível1. Welch's two-sided t-test ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: "ótima"; verde: "boa"; amarelo: "regular"; roxo: "péssima".

As diferenças estatísticas encontradas no perfil funcional dos diferentes locais de amostragem explicam a separação dos pontos na análise de PCA realizada no nível 1 do SEED-Subsystems (Fig. 18). De maneira similar ao observado no perfil taxonômico, os pontos localizados nas regiões mais poluídas, TIET24 e PATO estão mais próximos entre sim. O perfil exibido pelas amostras localizadas no local com qualidade de água “ótimo” TITR, é o mais diferente, visto que o agrupamento de pontos é o mais distante de todos. Como foi observado na figura 16, o ponto TITR se mostrou diferentes em 13 categorias das categorias avaliadas.

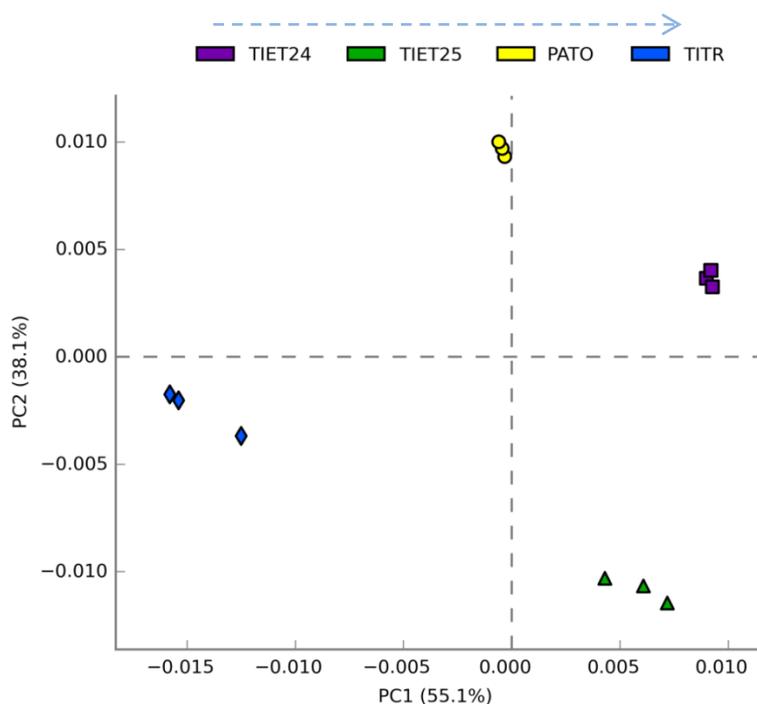


Figura 18 – Análise de Componentes Principais (PCA) do perfil funcional das amostras de água no nível 1 do SEED-Subsystems. PC1: 55.1% - PC2: 38.1%. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Algumas categorias do SEED-Subsystems foram analisadas em detalhe, a fim de entender melhor o funcionamento das comunidades em cada ponto de amostragem, tentando correlacionar as variações físico-químicas com a abundância destes subsistemas.

5.6.2.1 Metabolismo do nitrogênio

No nível 1, foi visto que os genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio foram mais abundantes nas amostras do TIET24 comparado com os demais pontos de amostragem (Fig. 18). TIET25 e TITR exibiram as menores porcentagens desses genes. Quando relacionados os resultados de abundância com a concentração de nitrogênio na água, foi

observada uma relação proporcional, locais com maior quantidade de N exibiram uma maior abundância de genes na categoria *Metabolismo do nitrogênio* (Fig. 19).

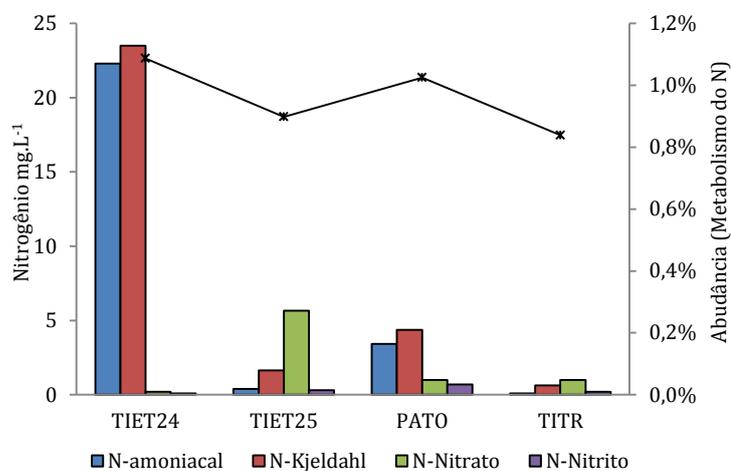


Figura 19 – Abundância de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio (nível 1 SEED-Subsystems) em pontos de amostragem com diferentes concentrações de nitrogênio.

Analisando os níveis 2 e 3 da base SEED-Subsystems também foram detectadas diferenças na abundância de genes implicados na ciclagem do nitrogênio no corpo d'água. Na figura 20 estão resumidos os processos relacionados ao metabolismo do N. identificados nos metagenomas, nos diferentes pontos de amostragem. As reações metabólicas mostradas na figura 20 foram detectadas em todos os pontos, não entanto a abundância de genes se mostrou diferente entre locais de amostragem, por isso foi analisada a ocorrência de diferenças estatísticas na abundância de genes associados a esses processos.

Os processos de amonificação e desnitrificação foram mais abundantes nas amostras de TIET24 e PATO, assim como os genes implicados na redução do nitrato a nitrogênio elementar (genes *nor*, *nir* e *nos*). A fixação biológica de nitrogênio também foi mais abundante em TIET24 seguida pelas amostras de TIET25. Quando analisado este processo até o nível de função, foram encontrados diferentes tipos de nitrogenases incluindo a ferro-molibdênio (FeMo), a ferro-ferro e a vanádio-ferro nitrogenases, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tipos de enzima. Os genes associados à assimilação do nitrogênio a aminoácidos e proteínas foram significativamente maiores no ponto PATO, seguidos pelas amostras do ponto TITR.

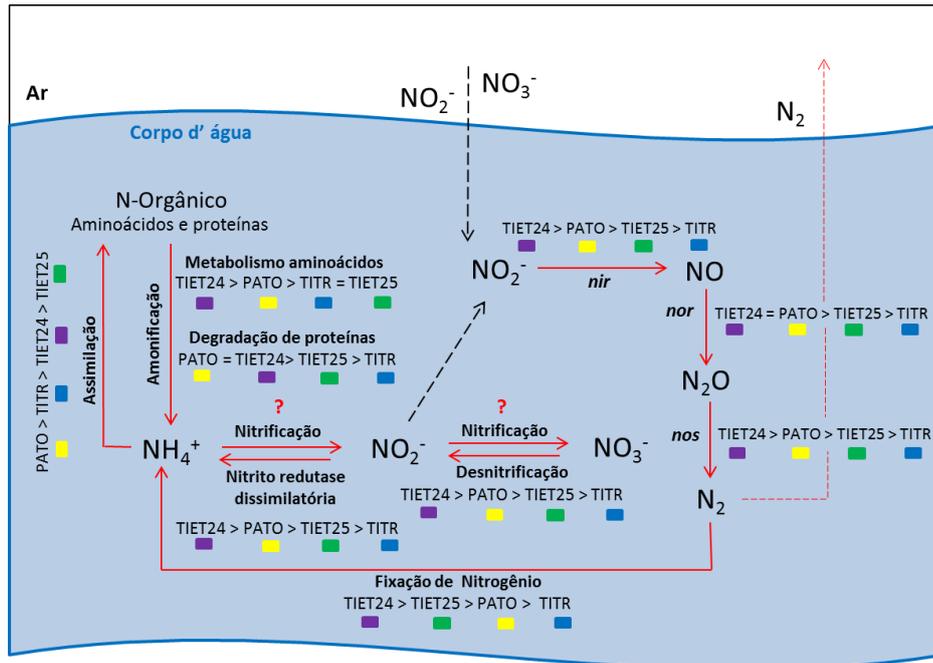


Figura 20 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do nitrogênio analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems. Diferenças estatísticas entre os pontos de amostragem foram calculadas por ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni. *nor* – Oxido nítrico redutase; *nir* – Nitrito redutase; *nos*- Oxido nitroso redutase. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Não foram encontrados genes envolvidos no processo de nitrificação, estes eram esperados devido às altas concentrações de amônia na água nos pontos mais poluídos (Fig. 19). Também não foram detectados genes relacionados ao processo de oxidação anaeróbia de amônia (ANAMMOX) em nenhum dos metagenomas funcionais.

5.6.2.2 Metabolismo do enxofre

Como foi visto na figura 16, o *Metabolismo do enxofre*, é uma das categorias do nível 1 do SEED-Subsystems mostrando-se pouco abundante comparada com outras categorias, no entanto, o enxofre é um dos principais componentes da matéria orgânica, o que torna essa função interessante para uma análise mais detalhada. De forma geral, os genes relacionados ao metabolismo do enxofre foram mais abundantes no ponto TIET25, um dos mais limpos. Essa abundância foi estatisticamente maior do que nos outros pontos. O ponto que mostrou menor quantidade de genes nessa categoria foi TITR. Os processos metabólicos relacionados à degradação de moléculas portadoras e de assimilação do enxofre detectados nos diferentes metagenomas estão resumidos na figura 21.

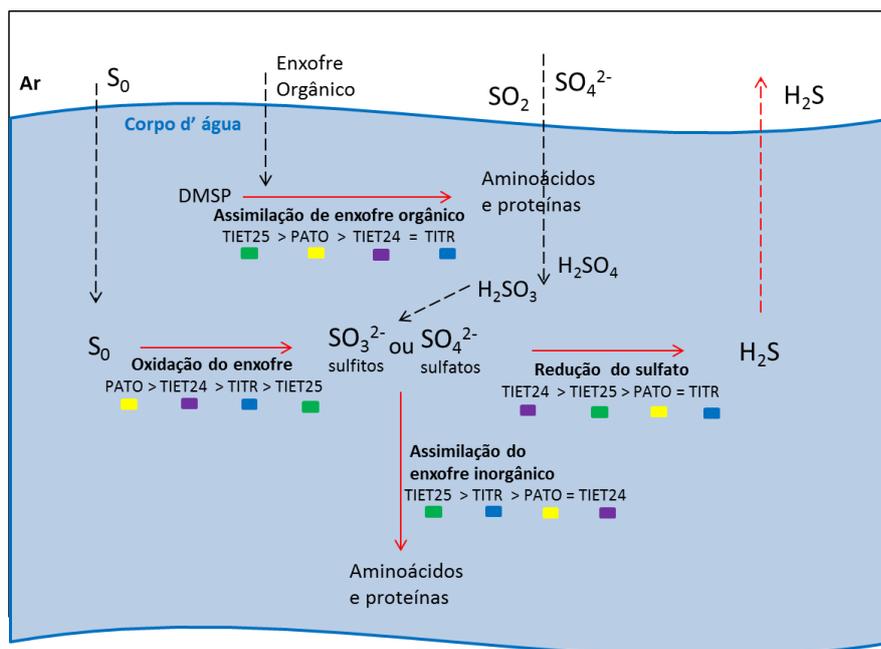


Figura 21 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do enxofre analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems. Diferenças estatísticas entre os pontos de amostragem foram calculadas por ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni. DMSP – Dimetilsulfoniopropionato A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Processos associados ao catabolismo como a oxidação do enxofre e a redução do sulfato foram estatisticamente mais abundantes nos locais mais contaminados, TIET24 e PATO. Já a assimilação do enxofre orgânico e inorgânico foi mais abundante nas amostras do ponto TIET25. A assimilação do enxofre inorgânico foi significativamente maior nos pontos localizados em áreas menos poluídas, TIET25 e TITR, do que nos pontos mais contaminados. A concentração de enxofre não está entre os parâmetros físico-químicos determinados pela CETESB na água, assim, não é possível relacionar a concentração desse elemento com a abundância de genes associados ao seu metabolismo nos diferentes metagenomas.

5.6.2.3 Ciclo do carbono e obtenção de energia

O primeiro nível de classificação do SEED-Subsystem agrupa todas as funções relacionadas ao metabolismo do carbono em uma única categoria chamada de *Carboidratos*, uma das mais abundantes no metagenoma de todas as amostras (Fig 16). A abundância dessa categoria foi estatisticamente maior nas amostras de TITR comparada com os demais pontos (Fig 17). Na figura 22 estão representados os processos metabólicos associados ao metabolismo de carboidratos nos níveis 2 e 3, detectados nos metagenomas. A glicólise, gliconeogênese e o ciclo de Krebs (ácidos tri-carboxílicos) foram mais abundantes nas

amostras de TITR e PATO. Os processos de glicólise e gliconeogênese foram analisados em mais detalhe. O processo alternativo para a degradação dos açúcares, via das pentoses, foi mais abundante nos locais com qualidade da água “ótima” e “boa” (TITR e TIET25), não existindo diferenças significativas na abundância entre esses dois pontos. Genes associados à fotossíntese e fixação de carbono também foram mais abundantes em TITR local com melhor qualidade de água (maior concentração de OD e menor Turbidez).

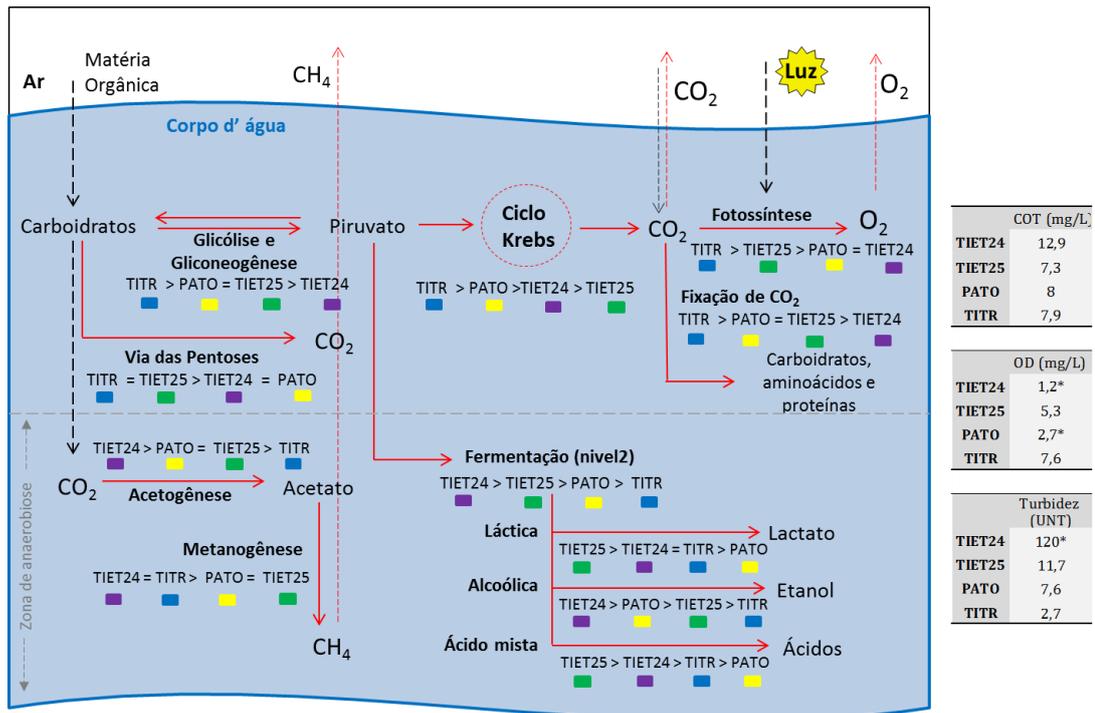


Figura 22 – Esquema representativo dos processos associados ao metabolismo do carbono, analisados nos níveis 2 e 3 do SEED-Subsystems. Diferenças estatísticas entre os pontos de amostragem foram calculadas por ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”. COT- Carbono Orgânico Total; OD - Oxigênio Dissolvido.

Como esperado, processos que normalmente ocorrem em condições de anaerobiose (baixa concentração de OD) como acetogênese, metanogênese e fermentação foram mais abundantes nas amostras do ponto TIET24. A fermentação também se mostrou abundante no ponto TIET25 e, quando analisada até o nível de função, os resultados mostraram que a produção de lactato (fermentação láctica) e de ácidos (fermentação ácido mista) foram maiores nesse ponto de amostragem. O processo fermentativo do tipo alcoólico foi mais abundante nas amostras TIET24 e PATO. O resultado quanto à produção de metano via metanogênese demonstrou uma abundância de genes associados a essa reação no ponto TIET24 igual à exibida pelas amostras de TITR.

5.6.2.3.1 Glicólise e gliconeogênese

A glicólise e a gliconeogênese são classificadas no nível 3 do SEED-*Subsystem* como uma única categoria. Foi realizada uma análise nível de função com o objetivo de separar os dois processos e determinar se existem diferenças entre os pontos de amostragem. Na tabela 8 são apresentadas as enzimas relacionadas ao metabolismo da glicose que foram detectadas em todos os metagenomas.

Tabela 8 – Enzimas associadas aos processos de glicólise e gliconeogênese detectadas no metagenoma de amostras de água do rio Tietê e abundância em cada ponto de amostragem. Valores em negrito representam a maior abundância entre os pontos de amostragem.

Enzima	Processo	Abundância relativa (%)			
		TIET24	TIET25	PATO	TITR
Phosphoglycerate kinase	Glicólise	0,06170	0,05052	0,07272	0,00103
Triosephosphate isomerase	Glicólise	0,02786	0,02251	0,03200	0,00082
Glucokinase	Glicólise	0,01199	0,02276	0,01612	0,00071
6-phosphofruktokinase	Glicólise	0,00959	0,01151	0,00629	0,01733
		0,11115	0,10731	0,12713	0,01989
Phosphoenolpyruvate synthase	Gluconeogênese	0,07635	0,09682	0,09380	0,00321
Pyruvate,phosphate dikinase	Gluconeogênese	0,02640	0,02526	0,01386	0,00100
Fructose-1,6-bisphosphatase	Gluconeogênese	0,01660	0,01868	0,01558	0,02021
Putative phosphoenolpyruvate synthase /pyruvate phosphate dikinase	Gluconeogênese	0,00066	0,00008	0,00052	0,00034
		0,12000	0,14085	0,12376	0,02477
Glucose-6-phosphate isomerase	Glicólise e Gluconeogênese	0,05655	0,05353	0,06943	0,00100
Fructose-bisphosphate aldolase	Glicólise e Gluconeogênese	0,03087	0,02544	0,03244	0,04097
Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase	Glicólise e Gluconeogênese	0,00126	0,00249	0,00072	0,00524
		0,08867	0,08147	0,10259	0,04721

Em total foram encontradas 11 enzimas, das quais 4 são exclusivas da glicólise, 4 são exclusivas da gliconeogênese e 3 catalisam reações em ambas vias metabólicas. Quatro dessas enzimas foram mais abundantes no ponto TITR, três no ponto PATO e duas nos pontos TIET25 e TIET24. No entanto, a soma das abundâncias de todas as enzimas associadas a cada processo permitiu determinar que a glicólise e as enzimas associadas a ambos os processos foram significativamente mais abundantes em PATO do que nos demais pontos. A gliconeogênese, por sua vez, foi mais abundante nos pontos TIET24 e PATO.

5.6.2.3.2 Produção de Hidrolases

Dentro do metabolismo de carboidratos, as enzimas responsáveis pela degradação, modificação e criação dos enlaces glicosídicos estão classificadas em cinco diferentes grupos, na base de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes database*). Nos metagenomas foram detectadas enzimas classificadas nos cinco grupos CAZy: Glicosil Hidrolases (GHs), Glicosil Transferases (GTs), Polissacarídeo Liases (PLs) e Carboidrato Esterases (CEs) e Atividades Auxiliares (AAs).

Classificadas no nível 2 do SEED-*Subsystems* as GHs mostram abundâncias diferentes entre os pontos de amostragem, tendo sido encontradas com maior frequência no ponto TIET25 seguidas pelo ponto TIET24 (Fig. 23).

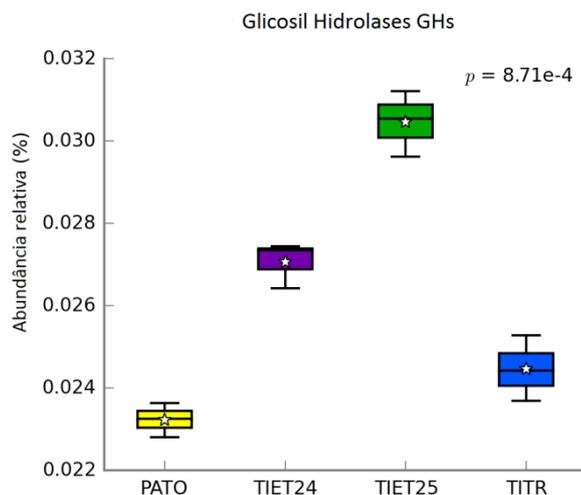


Figura 23 – Abundância de genes associados a Glicosil Hidrolases (GHs) detectados no metagenoma de diferentes pontos de amostragem. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Dentro GHs foi analisada ocorrência de genes relacionados à degradação polissacarídeos como a celulose. Os resultados do nível 3 do SEED-*Subsystems* mostraram a presença de genes associados ao celulosomo, complexo enzimático responsável pela degradação desse polissacarídeo. A abundância destes genes foi significativamente maior nas amostras do ponto TIET25, seguido por TIET24 (Fig. 24 a). Entre as enzimas responsáveis pela degradação da celulose, presentes no celulosomo, foram detectadas a alfa-glicosidase EC 3.2.1.20 (Fig. 24 b), que foi estatisticamente mais abundante no ponto TIET25, a endoglucanase EC 3.2.1.4 cuja abundância não apresentou diferença estatística entre os pontos de amostragem e a proteína regulatória SusR, que também foi mais abundante nas amostras de TIET25. Dentro das enzimas presentes no celulosomo, também foi detectada a presença de alfa-amilase EC 3.2.1.1, enzima associada à degradação de amido. A abundância dessa enzima também foi significativamente maior nas amostras do ponto TIET25 (Fig. 24 b).

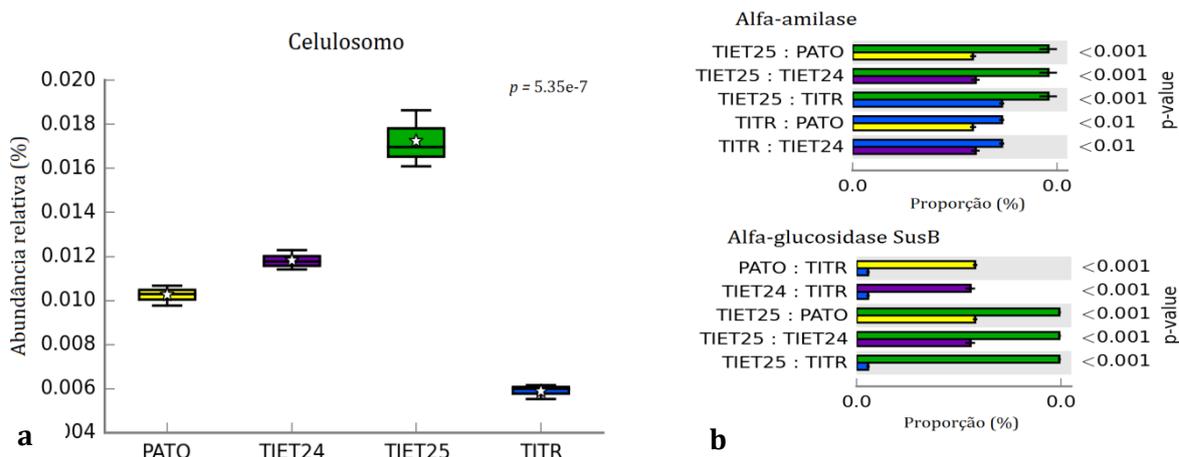


Figura 24 – Abundância de genes relacionados à degradação de polissacarídeos no celulosomo. a) Diferença nas na abundância de genes associados ao Celulosomo em diferentes pontos de amostragem. b) Principais enzimas do celulosomo detectadas nos metagenomas no nível de função. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Genes relacionados à produção de pectinases foram também detectados nos metagenomas, estas enzimas estão classificadas no grupo CAZy das PLs e são as responsáveis por clivar o ácido galacturônico, principal componente da pectina. De forma similar às glicosil hidrolases, os resultados demonstraram, que houve uma abundância significativamente maior de pectinases nas amostras de TIET25 (0,132%). As amostras de PATO foram as segundas mais abundantes (0,115%). Entre as pectinases detectadas nos metagenomas foram identificadas a pectato liase EC 4.2.2.2 que foi mais abundante no ponto TIET25 e a pectina liase EC 4.2.2.10 mais frequente em PATO.

5.6.2.4 Resistência a metais

A resistência a metais também foi pesquisada nos metagenomas com o intuito de verificar a existência de diferenças entre os pontos de amostragem. A resistência a metais está classificada no nível 3 do SEED-Subsystem, fazendo parte das categorias *Virulência, defesa e patogenicidade* (nível 1) e Resistência a antibióticos e compostos tóxicos (nível 2). Nas figuras 15 e 16 foi observado que no nível 1, abundância de genes foi maior nas amostras do ponto TIET24 e a menor abundância foi exibida pelo ponto TITR. Na categoria Resistência a antibióticos e compostos tóxicos do nível 2, as amostras de TIET24 foram também as que apresentara maior abundância, seguidas pelas amostras de PATO (Fig. 25).

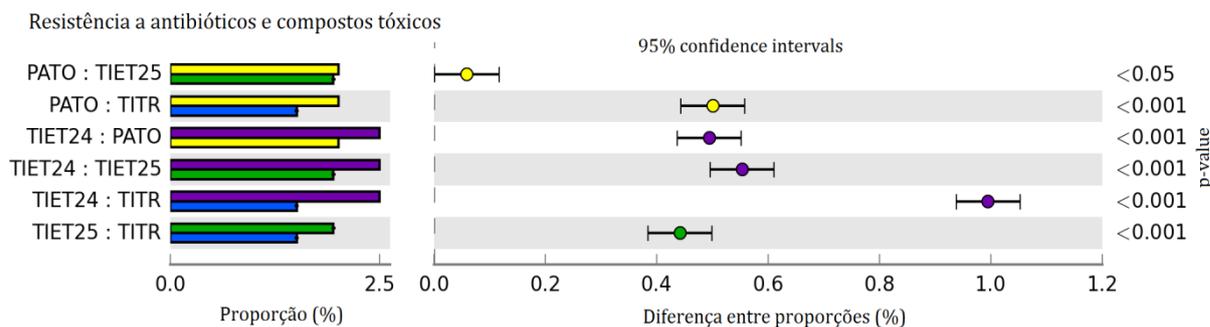


Figura 25 – Diferenças na abundância de genes associados à Resistência a antibióticos e compostos tóxicos no nível 2 do SEED-Subsystems, em amostras de água de diferentes pontos do rio. Análise estatística por ANOVA e Tukey ($p < 0,05$) com correção de Bonferroni. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

Os resultados do nível 3 mostraram a ocorrência de resistência aos metais Cd, Co, Zn, Cr e Hg assim como tolerância ao Cu. Houve diferenças estatísticas na abundância de genes do sistema de resistência Co-Zn-Cd e na resistência a Hg entre todos os pontos de amostragem (Fig 26).

Quanto à resistência a cobalto-zinco-cádmio (Fig 26 a), as amostras do ponto TIET24 foram estatisticamente mais abundantes do que as amostras dos outros pontos. Ao analisar essa resistência no nível de função, foram encontradas diversas enzimas associadas a tal capacidade, entre elas, proteínas das famílias *Czc* e *Cus* e algumas proteínas transportadoras. A tolerância a cobre, cuja abundância foi maior nas amostras de TIET24 e PATO, está relacionada às proteínas codificadas pelos genes *cor*, que funcionam como bombas de efluxo, e *cur*, que promovem a homeostase da célula.

Os genes de resistência ao Cr, que também foram mais abundantes nos pontos com IQA mais baixo, codificam proteínas da família *Crh*, com funções de transporte e resistência a cromato, e que aparentemente trabalham de forma similar à enzima superóxido dismutase. Alguns genes menos abundantes relacionados à resistência exclusiva a Zn (Fig. 26 e) ou Cd (Fig. 26 f) também foram detectados nos metagenomas. A resistência exclusiva ao Zn foi mais abundante nos pontos TIET24 e TITR, não existindo diferenças estatísticas entre eles. No nível de função, essa resistência está associada a um sistema regulatório de dois componentes, que reage à presença do metal. A resistência ao Cd foi mais abundante nas amostras do ponto TIET25 e, funcionalmente, se mostrou relacionada a uma proteína transportadora e a uma bomba de efluxo exclusivas para esse metal. Os genes de resistência ao Hg (Fig. 26 e), que também foram mais abundantes no ponto TIET25, estão classificados numa categoria chamada *Operon de Resistência a Mercúrio*, e codificam a família de

proteínas *Mer*, com funções de transporte e resistência específicas para esse metal. Na tabela 5A do anexo, estão descritas todas as funções associadas à resistência a metais tóxicos detectadas nos metagenomas e a respectiva abundância em cada ponto de amostragem.

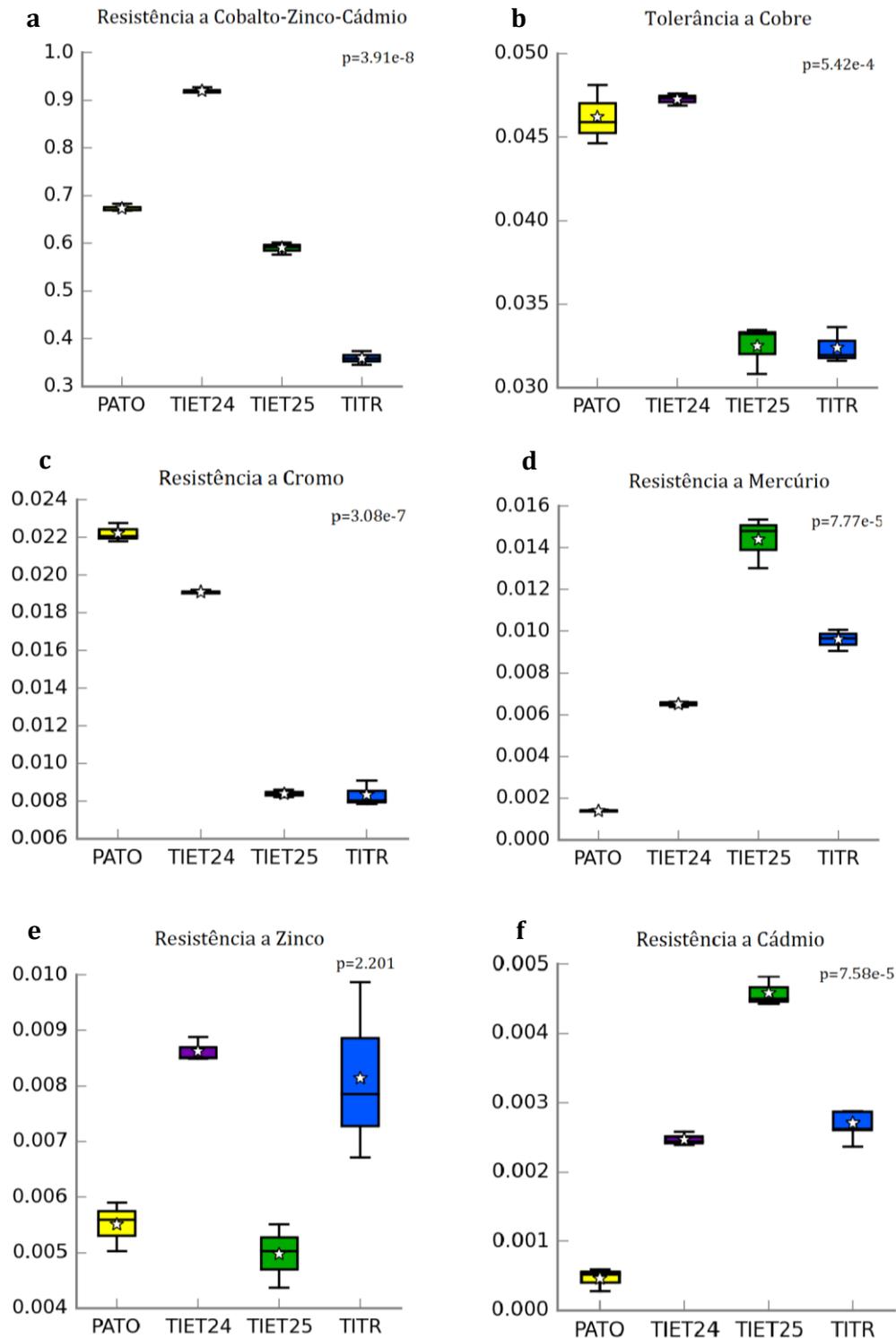


Figura 26 – Abundância de genes associados à resistência a metais tóxicos detectados nos metagenomas de amostras de água de diferentes pontos do rio. Análise estatística por ANOVA e Tukey ($p<0,05$) com correção de Bonferroni. A classificação da água com base no Índice de Qualidade da Água (IQA) em cada ponto de amostragem está indicada pelas cores azul: “ótima”; verde: “boa”; amarelo: “regular”; roxo: “péssima”.

5.7 Construção de bibliotecas metagenômicas e prospecção de clones resistentes aos metais Cd e Ni.

A construção de bibliotecas de DNA metagenômico foi realizada a partir do DNA extraído da amostra de água PATO e das duas amostras de sedimentos localizadas em regiões contrastantes do rio. As amostras de sedimento foram coletadas nos meses de Junho (PINH04500) e Julho (TIPR02800) de 2014. Todas as análises físico-químicas, ecotoxicológicas e microbiológicas foram realizadas pela CETESB. A amostra NBS09, que corresponde ao ponto PINH04500, está localizada na UGHRI 6, com vocação industrial. Em muitos dos parâmetros avaliados, este ponto de amostragem está classificado como “péssimo”. A amostra NBS11, correspondente ao ponto TIPR02800, está localizada nas UGRHI 16, com vocação agrícola. Levando em consideração a maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados, este ponto de amostragem pode ser considerado como “bom”. A tabela 9 apresenta os principais resultados das análises realizadas nas amostras de sedimento.

Tabela 9 – Parâmetros físico-químicos avaliados pela CETESB nas amostras de sedimento.

Parâmetro		TEL	PEL	PINH04500 NBS09	TIPR02800 NBS11
Metais	Cobre (mg/kg)	35,7	197	58,1*	18,2
	Niquel (mg/kg)	18	35,9	108**	19,1*
	Zinco (mg/kg)	123	315	122	29,7
Nutrientes	Carbono orgânico %	-	-	<1	1,76
	N Kjendahl (mg/kg)	-	-	326	1824
	Fósforo (mg/kg)	-	-	435	519
Hidrocarbontetos aromáticos polinucleares (PAH)	Acenafteno (µg/kg)	6,71	88,9	>575**	<20
	Antraceno (µg/kg)	46,9	245	>575**	<20
	Benzo(a)antraceno (µg/kg)	31,7	385	>575**	<20
	Benzo(a)pireno (µg/kg)	31,1	782	750*	<10
	Fluoranteno (µg/kg)	111	2355	638*	<20
	Naftaleno (µg/kg)	34,6	391	>575**	<30
Microbiológicos	Pireno (µg/kg)	53	875	>575**	<20
	<i>Clostridium perfringens</i> (NMP/100g)	-	-	4,9x10 ⁶	1,4x10 ⁴
	<i>E. coli</i> (NMP/100g)	-	-	1,3x10 ⁵	1,1x10 ³

TEL - concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos biológicos adversos; PEL - concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos biológicos para arsênio, metais pesados e compostos orgânicos; (*) Valores acima do TEL; (**) Valores acima do PEL; NMP – Número Mais Provável.

Antes da construção das bibliotecas metagenômicas, as amostras de sedimento dos locais PINH04500 (NBS09) e TIPR02900 (NBS11), também foram enviadas para sequenciamento na plataforma Illumina® HiSeq2000 e os resultados do sequenciamento

foram submetidos no servidor MG-RAST versão 4.0.2., para a geração dos perfis taxonômicos e funcionais. Os resultados do sequenciamento são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do sequenciamento do metagenoma de amostras de sedimento

Amostra	No. Sequências	Filtradas	Após filtragem	Conteúdo de GC
NBS09_R1	39.091.854	3.469.130	35.622.724	54%
NBS09_R2	42.470.615	1.272.364	41.198.251	52%
NBS09_R3	42.448.487	950.989	41.497.498	50%
NBS11_R1	39.327.991	1.950.695	37.377.296	54%
NBS11_R2	40.519.688	4.228.647	36.291.041	55%
NBS11_R3	42.448.487	3.042.286	39.406.201	55%
Total	246.307.122	14.914.111	231.393.011	53%

A quantidade de sequências filtradas por baixa qualidade variou de uma amostra para outra, mas em todos os casos foi menor a 10% do total de sequências. O conteúdo de GC, foi de aproximadamente 53%, mostrando-se um pouco maior do que o exibido pelas amostras de água. Depois da filtragem, os resultados mostraram que em todas as amostras, aproximadamente 7% das sequências foram classificadas como genes de RNA ribossomal e 63% correspondem a proteínas de função desconhecida. Houve uma diferença quanto à porcentagem de sequências classificadas como proteínas de função conhecida; nas amostras de NBS09 esta porcentagem foi em média, de 24%, entretanto, as amostras do NBS09 mostraram apenas 14% de proteínas anotadas. A classificação taxonômica no nível de domínio mostrou que mais de 90% das sequências pertencem ao domínio Bacteria, 1,2% foram classificadas no Domínio Eucarya, 0,1% e pertencem a Virus. As amostras do ponto NBS11 mostraram uma quantidade de sequências pertencente ao Domínio Archaea (6,3% em média) maior do que nas amostras de NBS09 com uma porcentagem aproximada de 3,5%.

5.7.1 Perfil taxonômico das amostras de sedimento

A classificação taxonômica das amostras de sedimento foi realizada usando os resultados de abundância gerados por comparação das sequências com a base de dados RefSeq do NCBI. O filo Proteobacteria foi o mais abundante em ambos os pontos de amostragem, no entanto, as amostras de NBS09 exibiram maiores abundâncias do que as amostras de NBS11 (Fig. 26).

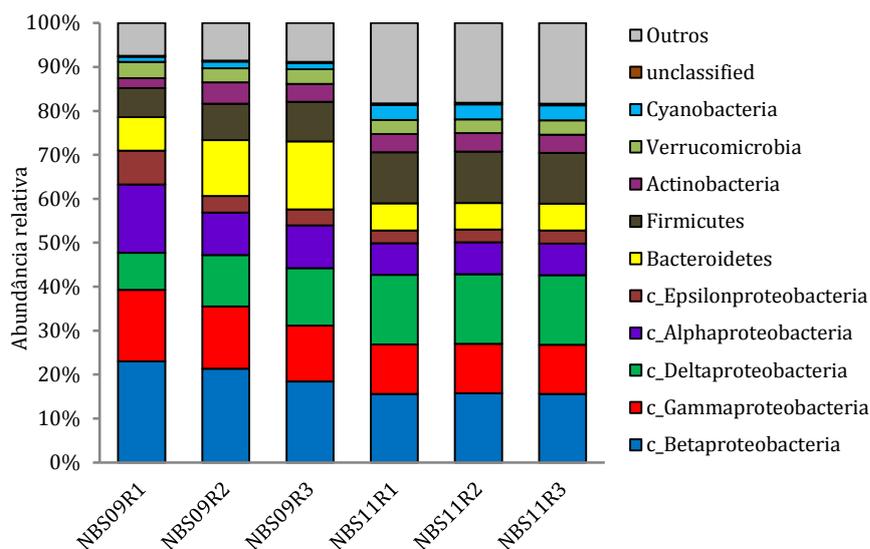


Figura 27 - Filos e classes do filo Proteobacteria mais abundantes nas amostras de sedimento ao longo do rio

Referente à classificação taxonômica no nível de classe, o perfil mostrado por todas as amostras foi similar. Prevalência de Betaproteobacteria e menores quantidades de Epsilonbacteria e Alphaproteobacteria foram observadas. As amostras de NBS11 mostraram uma maior abundância de Deltaproteobacteria (15,7%) do que as amostras de NBS09, onde Gammaproteobacteria (14,40%) foi mais abundante.

Dentro da classe Betaproteobacteria as ordens mais abundantes foram Burkholderiales e Rhodocyclales nas amostras do ponto NBS09, com valores médios de 12,5% e 3,6%, nas amostras do ponto NBS11, Burkholderiales também foi a ordem mais frequente com uma abundância média de 6,2%, mostrando também uma abundância de Rhodocyclales menor a exibida pelas amostras de NBS09 (Fig. 4A no anexo). No nível de família foram observadas algumas diferenças entre os pontos de amostragem, em NBS09, as famílias mais abundantes dentro da ordem Burkholderiales foram Comamonadaceae (8,24%) e Burkholderiaceae (3,7%), já nas amostras de NBS11 a família mais abundante foi Burkholderiaceae seguida por Comamonadaceae com abundâncias menores, 2,61% e 2,29% respectivamente. Dentro dos Rhodocyclales a única família detectada nos dois pontos de amostragem foi Rhodocyclaceae com uma abundância média de 3,2% no ponto NBS09 e de 1,54% no ponto NBS11.

O segundo filo mais abundante foi diferente entre os pontos de amostragem, as amostras NBS09 tiveram uma maior quantidade de Bacteroidetes (11,9%) e menor de Firmicutes (7,97%), nas amostras do ponto NBS11 aconteceu o oposto, com abundâncias maiores de Firmicutes (11,55%) e menores de Bacteroidetes (6,09%). A quantidade de filos classificados na categoria 'outros' foi maior nas amostras NBS11. Esse resultado pode ser comparado com

o resultado das amostras de água, onde as amostras localizadas em pontos menos contaminados, também apresentaram maior quantidade de filós na categoria ‘Outros’. Dentro do filo Bacteroidetes

Os cinco gêneros bacterianos mais abundantes nas amostras de NBS09 foram *Bacteroides*, *Acidovorax*, *Pseudomonas*, *Geobacter* e *Dechloromonas*. Nas amostras NBS11 esses gêneros não se mostraram tão abundantes, com exceção de *Geobacter*, que inclusive foi o mais abundante nessas amostras. Outros Gêneros encontrados em alta abundância nas amostras NBS09 foram *Sideroxydans*, *Clostridium* e *Methylobacter*.

5.7.1.1 Índices de diversidade

O cálculo dos estimadores de riqueza e índices de diversidade nas amostras de sedimento também foi realizado com auxílio do programa PAST 7.12., utilizando como *input* os valores de abundância do gene 16S rRNA da base de dados GreenGens. Na tabela 11 são apresentados os valores médios dos índices de diversidade e estimadores de riqueza calculados em cada ponto de amostragem.

Tabela 11 – Índices de diversidade calculados em diferentes pontos de sedimento. Diferenças estatísticas foram calculadas com Duncan ($p < 0,05$). Em negrito os maiores valores para cada índice.

	Simpson_1-D	Shannon_H	Chao-1	Dominance_D	Evenness
NBS09	0,9909 b	5,490 b	659,6 b	0,0092 a	0,3692 a
NBS11	0,9941 a	5,765 a	876,0 a	0,0058 b	0,2931 b

Os índices de diversidade Simpson e Shannon mostraram que as amostras de NBS11 são significativamente mais diversas, e conseqüentemente, exibiram o menor valor de dominância. O valor de riqueza, determinado por Chao, também foi significativamente maior em NBS11.

5.7.2 Construção de bibliotecas com DNA metagenômico

A construção das bibliotecas foi realizada utilizando o *CopyControl® Fosmid DNA Construction kit* da Epicentre. Seguindo as instruções do fabricante podem obter-se bibliotecas de clones de entre 1×10^3 até 8×10^4 . O rendimento da reação depende da qualidade e quantidade do gDNA a ser clonado. Para a montagem de bibliotecas metagenômicas, a quantidade e a qualidade do DNA total são essenciais, por isso a extração é

o passo mais importante. Para começar o processo de montagem, foram escolhidas as amostras de sedimento NBS09 e NBS11, cujo primeiro passo foi verificar o tamanho do DNA em gel de Campo Pulsado (Fig. 10 b).

O protocolo do *kit* sugere que se pelo menos 10% do DNA da amostra corra juntamente com o DNA controle, a amostra pode ser usada diretamente, sem ter que realizar a etapa de corte no gel, o que é muito desejável, pois evita perda de material genético. Já que o DNA das amostras de sedimento correu junto com o DNA controle não foi necessário cortar a banda do gel (Fig. 10). Após esta etapa, as bibliotecas NBS09 e NBS11 renderam 10400 e 5600 clones, respectivamente. A diferença no rendimento pode ter sido devida à concentração inicial do DNA que foi um pouco maior na amostra NBS09. Uma nova reação de clonagem foi realizada utilizando DNA da amostra de água PATO, que estava entre as mais diversas pela análise de T-RFLP. O rendimento dessa biblioteca foi de 13800 clones. Todos os clones foram coletados e preservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em placas de Elisa de 96 poços contendo $150\text{ }\mu\text{l}$ de meio LB acrescido de cloranfenicol e glicerol.

Uma vez preservadas, a validação das bibliotecas metagenômicas foi realizada com o objetivo de verificar se a diversidade microbiana de cada ponto de amostragem estava bem representada, ou seja, se foi possível obter clones que carregam diferentes fragmentos de DNA. Foi realizada através da restrição enzimática de clones selecionados aleatoriamente. Para isso, o DNA fosmidial de clones aleatórios foi extraído seguindo o protocolo de lise alcalina. A qualidade do DNA fosmidial foi verificada através de eletroforese em gel de agarose, a restrição foi realizada com a enzima *NotI* e o perfil bandas foi verificado através de PFGE. Na figura 28 é mostrada a validação das três bibliotecas de DNA metagenômico.

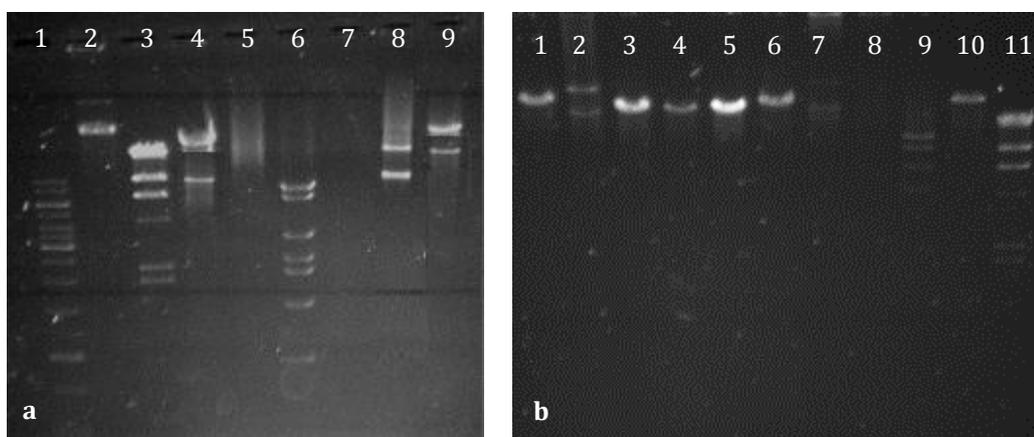


Figura 28 – Validação das bibliotecas metagenômicas. Gel PFGE 1% do DNA fosmidial de amostras de digerido com *NotI*- a. Bibliotecas DNA de sedimento - Poço 1: Marcador 1kb.; poços 2-5 DNA da biblioteca NBS09; poços 6-9 DNA da biblioteca NBS11. b. Bibliotecas DNA de água e sedimento – Poços 1-3 DNA

biblioteca NBS11; poços 4-6 DNA biblioteca NBS09; poços 7-9 DNA biblioteca PATO; poço 10: λ (25ng); 11: λ -HindIII.

5.7.3 Identificação de clones resistentes a metais tóxicos nas bibliotecas metagenômicas de água e sedimento do Rio Tietê.

Foram selecionados aleatoriamente 2880 clones de das bibliotecas construídas com DNA metagenômico (960 de cada uma das três bibliotecas metagenômicas construídas a partir de DNA de amostras de água e sedimento do Rio Tietê) com o objetivo de identificar clones resistente/tolerante aos metais Ni e Cd.

Foi avaliada a capacidade de crescimento dos isolados em placas com concentrações 1 mM, 2 mM e 4 mM de ambos os metais. Essa capacidade foi depois verificada através de crescimento em meio de cultura liquido acrescido do metal, em iguais concentrações. Em todas as avaliações foi utilizada a linhagem hospedeira do DNA metagenômico, *E. coli* EPI1300-TR1, que mostrou uma CIM de 1 mM, como controle negativo. Foram considerados como tolerantes aqueles clones que exibiram a capacidade de crescer tanto nas placas, quanto no meio liquido. Na tabela 12 é apresentado um resumo dos resultados de avaliação.

Tabela 12 – Clones com tolerância a 1 mM dos metais tóxicos Cd e Ni detectados nas bibliotecas metagenômicas

Biblioteca	Tipo de amostra	Clones testados	Tolerantes a Cd	Tolerantes a Ni
PATO	Água	960	1	0
NBS09	Sedimento	960	5	0
NBS11	Sedimento	960	1	0
Total	-	2880	7	0

Depois de realizados os testes de crescimento, sete clones exibiram tolerância ao Cd na concentração 1 mM. Cinco dos clones resistentes possuem DNA metagenômico da amostra NBS11, um clone da amostra NBS11 e um clone contém DNA da amostra PATO. Não foram encontrados clones resistentes a concentrações de Cd maiores nem clones com resistência a Ni. Na figura 29 são mostrados os as etapas iniciais da seleção de clones tolerantes.

Os clones que foram selecionados pela sua tolerância a Cd, serão submetidos à extração do inserto (fossímideo contendo o DNA metagenômico) para posterior sequenciamento e anotação dos genes implicados na tolerância a esse metal.

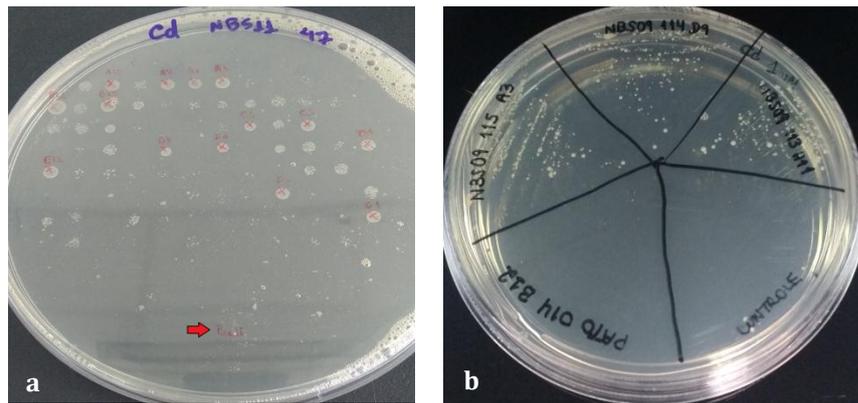


Figura 29 – Seleção de clones resistentes a metais tóxicos. a) *Screening* inicial; a seta vermelha indica o local onde foi inoculado o controle negativo (EPI300-TR1). b) Crescimento dos clones resistentes em meio contendo o metal.

6 DISCUSSÃO

6.1 Composição e funcionamento das comunidades microbianas ao longo do rio

Como mencionado anteriormente, a caracterização das comunidades bacterianas presentes em diversos tipos de ambientes, pode ser realizada utilizando diferentes abordagens. Estudos realizados no grupo de pesquisa NAP/BIOP analisaram a composição das comunidades bacterianas e fúngicas em 33 pontos de água do Rio Tietê, utilizando métodos independentes de cultivo como T-RLFP e sequenciamento do gene 16S rRNA (LIMA, 2015; ORTIZ, 2015). Os resultados desses trabalhos demonstraram o efeito das condições ambientais sobre a estruturação, diversidade e riqueza das comunidades presentes em diferentes pontos ao longo da bacia hidrográfica.

O objetivo do presente trabalho foi entender o funcionamento das comunidades microbianas em locais contrastantes ao longo rio Tietê. Para isso, foram empregadas diferentes abordagens, incluindo técnicas dependentes e independentes de cultivo. A utilização de métodos de cultivo pode não ser eficiente para estimar a diversidade microbiana presente num determinado ambiente (SPIEGELMAN; WHISSELL; GREER, 2005), pois, como é sabido, 99% dos micro-organismos não podem ser cultivados em condições padrão de laboratório (SINGH, 2010). No entanto, micro-organismos isolados facilitam a prospecção de atividades interessantes do ponto de vista biotecnológico ou ambiental (SINGH, 2010), como por exemplo a produção de hidrolases ou a capacidade para degradar compostos tóxicos ou de difícil remoção do ambiente (ADRIO; DEMAIN, 2014; KARTIK; JINAL; AMARESAN, 2016). Levando em consideração aspectos ecológicos e ambientais, e baseados nos resultados prévios de diversidade e riqueza, foram selecionados quatro pontos contrastantes da bacia para análise mais aprofundada. A abordagem metagenômica permite acessar o funcionamento da comunidade, através da identificação dos genes presentes no ambiente (SINGH et al., 2009)

Os resultados referentes à composição taxonômica e perfil funcional, dos diferentes pontos ao longo da bacia demonstraram uma forte influência do local de amostragem, que pode estar diretamente relacionada com a qualidade da água. De forma geral foi visto que os perfis de pontos de amostragem com qualidades de água de boa e ótima (TIET24 e TITR) foram mais semelhantes entre eles. De forma similar, perfis taxonômicos e funcionais das amostras de água TIET24 e PATO, classificadas como péssima e regular, respectivamente, foram muito semelhantes. Em todas as amostras de água, o filo mais abundante foi Proteobacteria seguido por Bacteroidetes nas amostras TIET24 e PATO, e Cyanobacteria nas amostras TIET25 e

TITR. Resultados similares foram observados na análise da composição bacteriana ao longo do rio Tietê pelo método de amplificação do gene 16S rRNA, onde os filos mais abundantes em amostras com qualidades de água “ruins” e “péssimas” foram Proteobacteria (51,8%), Bacteroidetes (29,4%), Actinobacteria (5,7%) e Firmicutes (4,3%). No entanto, os pontos com qualidades de água “boa” e “ótima” mostraram prevalência de Bacteroidetes, não tendo sido abundante o filo Cyanobacteria em nenhuma dessas amostras (LIMA, 2015). Os filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria têm sido reportados como os mais abundantes em diversos ambientes, incluindo ecossistemas aquáticos (BOLHUIS et al., 2014; DE OLIVEIRA; MARGIS, 2015; HU et al., 2014; SUH et al., 2015). O filo Cyanobacteria também tem sido frequentemente reportado como abundante em ambientes aquáticos, não entanto, está mais relacionado a processos eutrofização (LOZA; PERONA; MATEO, 2013). A presença desse filo bacteriano em maior porcentagem nas amostras TITR e TIET25, explica também abundância significativamente maior de genes associados aos processos de Fotossíntese e Fixação de carbono, observado nessas amostras, quando comparadas com os pontos TIET24 e PATO. A abundância relativa do filo Cyanobacteria nessas últimas amostras foi menor do que 1%. A quantidade de luz no ambiente é um parâmetro importante a ser levado em consideração ao falar do processo fotossintético. Em ecossistemas aquáticos, a turbidez pode dar indicio sobre a quantidade de luz disponível no ambiente, em locais com maior turbidez existe uma menor penetração dos raios solares, assim a disponibilidade de luz é muito menor (LLAMES et al., 2009). As amostras dos ambientes contaminados TIET24 e PATO mostram os maiores valores de turbidez, explicando a baixa abundância de genes relacionados a fotossíntese nesses pontos. A ocorrência de filos menos abundantes, classificados na categoria ‘Outros’ que mostram uma maior porcentagem nas amostras do ponto TITR, pode estar relacionada à presença de grupos raros, mais frequentemente encontrados em locais menos impactados; estas amostras também exibiram uma maior abundância do filo Actinobacteria, característico de ambientes aquáticos oligotróficos (SAVIO et al., 2015; WILKINS et al., 2013). Dentro dos filos menos abundantes, as amostras TIET24 e TITR mostraram uma maior porcentagem de Planctomycetes, este filo bacteriano recorrente de ambientes aquáticos de água doce, tem características particulares, como a ausência de peptidoglicano na parede e, algumas espécies, possuem a capacidade de oxidar o amônio de forma anaeróbica, processo conhecido como ANAMMOX (FUERST; SAGULENKO, 2011; LAGE; BONDOSO, 2014). Quando analisado o perfil funcional das amostras relacionado ao metabolismo do nitrogênio, não foram detectadas sequências associadas ao processo ANAMMOX. Embora o filo Planctomycetes, associado a esse processo

tenha sido detectado nas amostras limpas, a sua abundância foi baixa comparada com a de outros filos. A porcentagem desse filo nas amostras TIET24 e PATO foi bem mais baixa, sugerindo uma possível influencia negativa dos contaminantes presentes na água neste grupo de bactérias.

O perfil exibido no nível de ordem também mostra diferenças entre os pontos de amostragem. Tomando como base o perfil taxonômico de TITR, que poderia ser considerado como o ponto de amostragem que melhor representa as características físico-químicas de ecossistemas de água doce, foi observada uma divisão mais homogênea das ordens, encontrando diferenças pequenas na porcentagem de uma ordem para outra. Os perfis exibidos pelas amostras TIET24, TIET25 e PATO foram marcadamente diferentes (Fig.13). Essas mudanças na composição das comunidades podem estar relacionados às concentrações de matéria orgânica e poluentes nesses locais (HALE et al., 2014; NEWTON; MCLELLAN, 2015), e também à entrada de micro-organismos alóctones, provenientes dos ambientes urbanos e que podem ser arrastados para o rio. Já que a densidade bacteriana nas águas pluviais e no esgoto doméstico é muito mais alta do que nos corpos receptores, os microrganismos nativos podem terminar sendo substituídos por micro-organismos melhor adaptados (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). As amostras de TIET24, o local do com IQA mais baixo e maior concentração de contaminantes de tipo orgânico e industrial, mostraram abundância mais alta de Rhodocyclales, esta Ordem bacteriana tem sido descrita como abundante nos sistemas de tratamento de esgoto (LIU et al., 2006; TSUNEDA et al., 2005) e os micro-organismos representantes possuem diversas capacidades fisiológicas benéficas para a degradação e transformação de poluentes, como nitrogênio, fósforo e compostos aromáticos (HESSELSON et al., 2009). Os Aeromonadales que também foram detectados apenas nas amostras de TIET24, são micro-organismos típicos de ecossistemas de água doce e estão entre as ordens mais recorrentes em ecossistemas aquáticos urbanos (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). A composição taxonômica observada nos locais, com maior concentração de contaminantes, TIET24 e PATO, mostra a presença de micro-organismos metabolicamente diversos, com capacidade para degradar as altas quantidades de matéria orgânica presentes. A análise funcional das amostras referente ao metabolismo dos nutrientes Nitrogênio e Carbono mostrou algumas diferenças entre os pontos de amostragem. Genes associados ao metabolismo de N foram mais abundantes nos pontos TIET24 e PATO, a análise físico-química mostrou uma alta quantidade de nitrogênio nesses locais (Tabela 4). O processo de nitrificação que era esperado, dadas as altas concentrações de amônio nos

locais mais contaminados, não foi detectado no metagenoma de nenhuma das amostras avaliadas. Os gêneros bacterianos conhecidos por realizar esse processo, *Nitrosomonas*, *Nitrosobacter* e *Nitrosolobus* (PLAZA; TRELA; HULTMAN, 2001) foram detectados em abundâncias menores a 0,4% nas amostras TIET24 e PATO, e menores a 0,1% nas amostras TITR e PATO. Em ambientes impactados com matéria orgânica, o processo de desnitrificação é um dos processos mais importantes da ciclagem do nitrogênio, já que o Nitrato é reduzido a N_2 e liberado para a atmosfera (BURGIN; HAMILTON, 2007). Os genes associados a nitrificação e outras reações associadas com a redução de Nitrato e Nitrito para N_2 foram mais abundantes nos pontos TIET24 e PATO, sugerindo que os contaminantes estão sendo degradados pelos micro-organismos presentes. Os resultados também sugerem que uma parte do N_2 liberado durante a desnitrificação é utilizado pelos micro-organismos presentes para realizar o processo de fixação de Nitrogênio, que também foi mais abundante nas amostras de TIET24 e PATO. Este processo é favorecido em concentrações baixas de oxigênio, assim, o ponto TIET24 oferece condições adequadas (baixo OD) para que a fixação de N ocorra.

O metabolismo do Carbono é realizado por todos os micro-organismos para obtenção de energia e a assimilação dos nutrientes, e a forma como esse metabolismo ocorre é altamente influenciada pela quantidade de oxigênio presente no ambiente (SARDANS; PEÑUELAS; RIVAS-UBACH, 2011), conhecido como OD nos ecossistemas aquáticos. O perfil funcional das amostras associado esse metabolismo mostrou diferentes comportamentos. O metabolismo dos açúcares, avaliado pelos processos de Glicólise, Gliconeogênese e Ciclo das pentoses foram mais abundantes nas amostras de TITR, estes são independentes da concentração de oxigênio presente (GHAI et al., 2011). Uma vez produzido o piruvato, o passo seguinte do metabolismo vai depender da quantidade de oxigênio disponível. O ciclo de Krebs, que promove a redução do carbono orgânico a CO_2 foi também mais abundante nas amostras de TITR, esse ponto exibiu o maior valor de OD em comparação com os demais pontos de amostragem. A utilização desse ciclo para obtenção de energia é exclusiva dos micro-organismos aeróbicos, o que explicaria a sua maior abundância em locais com mais oxigênio dissolvido na água como TITR. Em contrapartida, os processos de acetogênese e metanogênese, típicos de ambientes anaeróbicos, foram mais abundantes no ponto TIET24, que mostrou a concentração mais baixa de OD entre os pontos, resultados similares foram observados em lagos da mata atlântica Brasileira, onde ambientes com baixa concentração de oxigênio mostraram a ocorrência de micro-organismos metanogênicos e metanotróficos

(ÁVILA et al., 2017). Os genes associados a outro dos processos realizado em condições de anaerobiose, a fermentação, foi também mais abundantes amostras de TIET24.

A caracterização funcional de comunidades microbianas em diferentes ambientes resulta útil, não apenas para entender o funcionamento da comunidade em termos de ciclagem de nutrientes, ela também é uma ferramenta importante para a prospecção de genes de interesse biotecnológico. A ocorrência de hidrolases, enzimas de grande utilidade em diferentes tipos de indústrias (ADRIO; DEMAIN, 2014; NACKE et al., 2012), foi analisada nos diferentes metagenomas. Foram detectados genes associados ao celulosomo, que codificam para amilases e endoglucanases, enzimas degradadoras de polissacarídeos como amido e celulose, estas enzimas são usadas na produção de biocombustíveis (LI et al., 2011; WANG et al., 2009). Igualmente foram detectadas pectinases, reesponsáveis pela degradação da pectina e amplamente utilizadas na indústria de alimentos e também na indústria têxtil (GARG et al., 2016). A abundância destes genes foi maior no ponto de amostragem TIET25, que por estar localizado numa região agrícola, pode ter maiores concentrações de matéria orgânica de origem vegetal na água.

O resultado referente aos índices de diversidade nas amostras de água reforçam alguns dos resultados até aqui discutidos. Os índices Simpson e Shannon, indicaram que a diversidade é maior nos pontos TITR e TIET25, já o estimador de riqueza, calculado com Chao-1, determinou que as amostras de TIET24 são mais ricas. Os pontos de amostragem com qualidades de água “ótima” e “boa” mostraram um maior número de espécies. Esse resultado pode comparar-se à maior quantidade de filos raros encontrados nessas amostras (Figs. 13 e 1A anexo) TIET24, o local com pior qualidade de água mostrou maiores abundâncias das espécies presentes. Lima, 2015, também observou maiores valores de riqueza em amostras de água localizadas em regiões contaminadas do Rio Tietê, não entanto, a diversidade não foi influenciada pelo local de amostragem. Nas amostras de sedimento, os maiores valores de riqueza e diversidade foram observados nas amostras localizadas na região não poluída do rio, sugerindo que os contaminantes podem ter uma influencia sob a diversidade bacteriana (GARRIDO et al., 2014; VAN ROSSUM et al., 2015).

Apesar de serem abordagens diferentes, os resultados de diversidade podem ter alguma relação com resultados da estimativa da população ao longo da bacia. Pontos de amostragem classificados com qualidades péssimas de ruins mostraram maiores concentrações de bactérias do que locais com qualidade de água boa ou ótima. O que pode dar uma indicia sobre a riqueza nesses ambientes. Por outro lado, a presença de microrganismos pigmentados,

observada nos locais de amostragem mais limpos tem sido utilizada como indicador de qualidade de água devido a que estes estão associados a águas oligotróficas não contaminadas (FORD, 1994). Locais com baixa quantidade de nutrientes costumam apresentar uma maior diversidade de microrganismos em menor concentração (MA et al., 2016).

O aumento na estimativa da população bacteriana de 2013 a 2014 poderia ser explicado desde o ponto de vista ambiental, na temporada de chuvas é possível que a matéria orgânica presente nas beiras dos rios seja arrastada para a água disponibilizando uma maior quantidade de nutrientes para os microrganismos presentes e promovendo seu crescimento. Estudos avaliando o efeito sazonal em ecossistemas aquáticos tem demonstrado que a quantidade de carbono e nitrogênio dissolvido em corpos d'água é maior na época de chuva do que na temporada seca (ÁVILA et al., 2017; GARCÍA-ARMISEN et al., 2014; STALEY et al., 2015a). Outra hipótese seria a diluição dos poluentes presentes na água devido à precipitação, isso pode ocorrer se a chuva cair diretamente no corpo d'água (DATTA et al., 2009). A diluição dos contaminantes, que em altas concentrações resultam tóxicos para alguns microrganismos, permitiria a sobrevivência deles no ambiente, garantindo seu posterior crescimento no laboratório.

Como foi visto, a composição e funcionamento das comunidades microbianas são influenciados pela concentração e o tipo de nutrientes disponíveis na água. A forma como os micro-organismos competem pelos nutrientes também é influenciada por esses parâmetros. O modelo de crescimento populacional r/k classifica os micro-organismos segundo sua estratégia de crescimento (GOLOVLEV, 2001). Em ambientes com alta quantidade de matéria orgânica (nutrientes) como TIET24 e PATO prevalecem os chamados estrategistas r, esses organismos colonizam rapidamente o ambiente, exibindo uma grande diversidade metabólica e alta capacidade de adaptação (EVANS; WALLENSTEIN, 2014; VUONO et al., 2014). O perfil taxonômico exibido nos metagenomas mostrou a prevalência de microrganismos quimio-órgano-heterótrofos nos ambientes mais contaminados. De maneira similar foi visto que na população bacteriana cultivável dos pontos mais contaminados houve prevalência de gêneros conhecidos pela sua diversidade metabólica como *Pseudomonas* e *Comamonas*. A população de bactérias em pontos considerados contaminados também foi maior do que em locais não contaminados.

Em ambientes com menor concentração de matéria orgânica como TIET25 e TITR prevalecem os estrategistas k, que precisam encontrar estratégias adequadas para sobreviver com os nutrientes disponíveis. Nos metagenomas foi visto que em ambientes menos

contaminados houve prevalência de micro-organismos associados a metabolismos autótrofos e litótrofos. O crescimento destes organismos costuma ser mais lento e, conseqüentemente a população menor. Referente à população bacteriana cultivável, foi visto que as amostras de pontos localizados em locais menos poluídos apresentaram menor concentração de bactérias (Tabela 2 e Fig. 6).

6.2 Tolerância a metais

Os resultados mostrados no presente trabalho referentes à resistência ou tolerância a metais tóxicos, tanto nos isolados bacterianos, quanto na análise metagenômica e durante a prospecção nas bibliotecas de clones, sugerem a existência de uma relação entre as condições ambientais e a capacidade de adaptação da comunidade bacteriana. A maior porcentagem de bactérias que exibiram a capacidade de crescer em concentrações de até 4 mM de cádmio ou níquel foi isolada de locais com qualidades de água péssima a regular. Nesses locais a concentração de metais tóxicos na água estava muito acima dos níveis normais. A análise metagenômica revelou a presença de genes associados à resistência a metais tóxicos nas amostras de água. A abundância de genes relacionados à resistência ou tolerância a diversos metais, de forma geral, também foi maior nos pontos com qualidades de água “péssima” e “regular”, TIET24 e PATO, respectivamente (Fig. 22). Por fim, dos 7 clones pré-selecionados das bibliotecas metagenômicas, 5 pertencem à biblioteca NBS09, construída com DNA metagenômico do ponto de sedimento PINH04500, classificado como “péssimo” pelas variáveis físico-químicas analisadas. Devido à pressão ambiental desses locais é possível que algumas das bactérias presentes no ambiente tenham adquirido a capacidade de tolerar as altas concentrações de metais que, normalmente, são tóxicos para as células, entre eles o cádmio e o níquel. A presença do metal na água pode então funcionar como gatilho, e conferir vantagens adaptativas aos organismos presentes, garantindo a sua sobrevivência nessas condições ambientais. A diversidade metabólica e a alta capacidade de adaptação faz possível que muitos micro-organismos exibam a habilidade de crescer em altas concentrações de metais tóxicos e algumas vezes acumulá-los (PRABHAKARAN; ASHRAF; AQMA, 2016; WHEATON et al., 2015).

Algumas das bactérias que exibiram a capacidade para crescer nas maiores concentrações de cádmio e níquel testadas foram isoladas de locais que apresentaram qualidades de água “boas” ou “ótimas”, onde a concentração de metais na água, ou no sedimento, estava dentro dos limites considerados seguros. Em sistemas lóticos, a ocorrência

de micro-organismos resistentes à jusante de locais contaminados poderia estar relacionada ao transporte deles ao longo da bacia hidrográfica, como consequência de fatores ambientais como chuvas ou correnteza (MCLELLAN; FISHER; NEWTON, 2015). A resistência bacteriana a compostos tóxicos, muitas vezes está codificada em plasmídeos e transposons (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000) e pode ser facilmente transferida a outros micro-organismos presentes no ambiente pelo mecanismo de transferência horizontal de genes (SALLOTO et al., 2012). No entanto, chama muito a atenção à alta quantidade de bactérias resistentes a NiCl_2 e CdCl_2 encontradas na nascente do rio. É provável que essa tolerância seja natural, pois apesar de não terem sido medidos os parâmetros físico-químicos no local, não há motivos para pensar que existam altas concentrações desses metais numa região ambiental protegida. A presença de Cd e Ni nos ecossistemas aquáticos está relacionada à descarga de efluentes industriais principalmente as galvanoplastias, produção de equipamentos eletrônicos e à queima de combustíveis fósseis (PAGANINI, 2008).

Como foi visto, a habilidade de um micro-organismo crescer em altas concentrações de metais tóxicos pode ser natural (NIES, 1999; RAJENDRAN; MUTHUKRISHNAN; GUNASEKARAN, 2003) ou adquirida a través de processos de adaptação (AYANGBENRO; BABALOLA, 2017; STALEY et al., 2015b). A resistência natural pode ser a resposta para a ocorrência destes micro-organismos em locais não poluídos como a Nascente. Em algumas espécies bacterianas como *Klebsiella aerogenes* e *Pseudomonas putida*, a produção de cápsula ou exopolissacarídeo constitui uma barreira importante para evitar a entrada de metais que possam danificar os componentes da célula (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000).

Quando analisados os dados físico-químicos, o fato de não terem sido detectadas concentrações de cádmio na água é chamativo. Em nenhum dos pontos amostrados houve descumprimento a legislação, mesmo nos locais com alta atividade industrial. Uma possível explicação seria a rápida deposição desse metal no sedimento, levando a um acúmulo no fundo do rio e não na coluna d' água. A análise físico-química dos sedimentos coletados mostrou concentrações de cádmio acima do valor de referência TEL (concentração abaixo da qual raramente são esperados efeitos biológicos adversos) na maioria das amostras, mas abaixo do valor de referência PEL (concentração acima da qual frequentemente são esperados efeitos biológicos), o que indica que existe um controle efetivo do lançamento de cádmio no rio (CETESB, 2015, 2016, 2017). Mesmo com as baixas concentrações de Cd atuais na água, historicamente, o rio tem carregado altas concentrações de metais tóxicos ao longo dos anos, que podem ter decorrido em adaptações das comunidades presentes. Por outro lado, os

mecanismos de resistência a metais exibidos pelos micro-organismos, muitas vezes não são exclusivos a um único metal. As bombas de efluxo, que são os sistemas mais eficientes de resistência funcionam eficientemente para íons Cd(II), Zn (II) e Co(II) (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000; DAS; DASH; CHAKRABORTY, 2016). Os genes que codificam as bombas de efluxo para Cd e o operon *czc* utilizado na remoção de Cd, Zn e Co do citoplasma, foram detectados no metagenoma das amostras de água dos quatro pontos analisados, tendo sido estatisticamente mais abundantes no ponto TIET24, o ponto mais contaminado. Proteínas da família *Cuz* e outras proteínas transportadoras associadas à resistência a Cd-Zn-Co também foram detectadas no metagenomas de todos os pontos amostragem, sendo mais frequentes no ponto TIET24. Genes de resistência exclusiva a Cd foram mais abundantes nas amostras do ponto TIET25 e, funcionalmente, se mostrou relacionada a uma proteína transportadora e a uma bomba de efluxo exclusivas para esse metal. Resistência aos metais tóxicos Cr, Cu e Hg também foram detectados nos metagenomas dos diferentes pontos de amostragem. Isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Comamonas* apresentaram capacidade de crescer em concentrações de 4 mM de Cd e Ni. O gênero *Pseudomonas* tem sido descrito por diversos autores pela sua capacidade para resistir a altas concentrações de metais tóxicos (BRUINS; KAPIL; OEHME, 2000; NEETA; MAANSI; HARPREET, 2016; NIES, 2003). Representantes do gênero *Comamonas* isolados de regiões industrializadas também mostraram uma alta capacidade para crescer em altas concentrações de metais tóxicos (GHANBARINIA; KHEIRBADI; MOLLANIA, 2015; GHANE et al., 2013).

7 CONCLUSÕES

O sucesso na caracterização microbiológica de amostras ambientais depende da qualidade do DNA a ser sequenciado ou clonado. Por esse motivo o processo de extração do DNA é fundamental para a obtenção de bons resultados.

A análise taxonômica e funcional de amostras de água coletadas em pontos amostragem com diferentes características físico-químicas demonstrou que os fatores ambientais têm influência na composição da comunidade e conseqüentemente no seu funcionamento.

- O metabolismo do nitrogênio e os processos metabólicos associados, foram mais abundantes nos pontos TIET24 e PATO, localizados em regiões do Rio Tietê com alta concentração de matéria orgânica. Esses locais também mostraram os maiores valores de concentração de nitrogênio na água.

- Processos associados ao metabolismo aeróbio foram mais abundantes em regiões com menor quantidade de matéria orgânica e maior concentração de oxigênio dissolvido na água, TIET25 e TITR. Nesses locais, processos como a fotossíntese e a fixação de CO₂ foram também mais abundantes.

- Funções relacionadas a condições anaeróbias como metanogênese, acetogênese e produção de álcool via fermentação, tiveram uma maior abundância no ponto TIET24 que apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido entre as amostras.

- O funcionamento das comunidades bacterianas é influenciado pela composição química do ambiente e disponibilidade de nutrientes. Em locais poluídos e com alta concentração de matéria orgânica houve prevalência de micro-organismos e funções associadas à heterotrofia, em contrapartida, locais menos poluídos e com menor quantidade de nutrientes na água mostraram prevalência de micro-organismos e metabolismo relacionados à fotoautotrofia e litotrofia.

Dentro das comunidades microbianas, condições ambientais desfavoráveis podem favorecer a aquisição de mecanismos de defesa ou adaptações que lhes garantam a sobrevivência no ambiente.

A maior quantidade de bactérias tolerantes aos metais tóxicos Cd e Ni foi isolada de pontos do Rio Tietê localizados em regiões industrializadas ou em processo de industrialização.

- Os genes relacionados a mecanismos de resistência a metais detectados nos metagenomas foram mais abundantes no ponto de amostragem TIET24, localizado numa região industrializada do Rio Tietê.

- Clones tolerantes aos metais tóxicos Ni e Cd são mais prevalentes na biblioteca NBS09, proveniente de sedimento com qualidade “ruim” pelas suas características físico-químicas. O local de amostragem se encontra localizado numa região industrializada do Rio Tietê.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados e conclusões mostradas no presente trabalho fica claro que as condições ambientais alteram de forma consistente a composição e funcionamento das comunidades microbianas presentes na bacia do Rio Tietê. A abordagem metagenômica permitiu ter uma visão geral dos processos metabólicos realizados pelos micro-organismos presentes em locais classificados com diferentes qualidades de água, constituindo-se como ponto de partida para a realização de muitas outras pesquisas.

A informação contida nos metagenomas auxiliará na prospecção, dentro das bibliotecas construídas com DNA metagenômico, de biomoléculas de interesse biotecnológico como hidrolases, antibióticos, bioplásticos, enzimas envolvidas em degradação de poluentes, entre outras.

Visto que não foi realizado no presente trabalho, seria importante fazer a análise metagenômica da nascente do Rio Tietê, pois daria informações ao respeito das comunidades microbianas autóctones do rio e seu funcionamento à jusante do início do despejo de poluentes na bacia. Essa informação permitiria verificar como a comunidade da nascente do rio é afetada pela poluição presente na Grande São Paulo e como esta comunidade se restabelece do ponto de vista funcional e taxonômico ao longo da Bacia do Rio Tietê.

REFERÊNCIAS¹

AB RAZAK, N. H. et al. Drinking water studies: A review on heavy metal, application of biomarker and health risk assessment (a special focus in Malaysia) *Journal of Epidemiology and Global Health*, **Journal of Epidemiology and Global Health**, 2015.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

AFIUNE, G.; MOTA, J. **Projeto Tietê**. Disponível em: <<http://apublica.org/projeto-tiete/>>. Acesso em: 05 de Abril de 2017.

ALLEN, R. C. et al. The mercury resistance (*mer*) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 83, n. 1, p. 135–148, 2013.

AMOS, G. C. A. et al. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Veterinary Microbiology*, v. 171, n. 3–4, p. 441–447, 2014.

ANCION, P.-Y.; LEAR, G.; LEWIS, G. D. Three common metal contaminants of urban runoff (Zn, Cu & Pb) accumulate in freshwater biofilm and modify embedded bacterial communities. *Environmental Pollution*, v. 158, n. 8, p. 2738–2745, 2010.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 16, p. 3149–3153, 2007.

ÁVILA, M. P. et al. Seasonality of freshwater bacterioplankton diversity in two tropical shallow lakes from the Brazilian Atlantic Forest. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 93, p. f1w218, 2017.

AYANGBENRO, A.; BABALOLA, O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, n. 1, p. 94, 2017.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AYUSO-SACIDO, A.; GENILLOUD, O. New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 1, p. 10–24, 2005.

BELILA, A.; SNOUSSI, M.; HASSAN, A. Rapid qualitative characterization of bacterial community in eutrophicated wastewater stabilization plant by T-RFLP method based on 16S rRNA genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 135–143, 2012.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, 2005.

BHATNAGAR, S.; KUMARI, R. Bioremediation : A Sustainable Tool for Environmental Management – A Review. **Annual Review & Research in Biology**, v. 3, n. 4, p. 974–993, 2013.

BOLHUIS, H. et al. Molecular analysis of bacterial diversity in mudflats along the salinity gradient of an acidified tropical Bornean estuary (South East Asia). **Aquatic Biosystems**, v. 10, n. 1, p. 10, 2014.

BROWN, M. E.; CHANG, M. C. Y. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 1–7, 2014.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial Resistance to Metals in the Environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 3, p. 198–207, 2000.

BURGIN, A. J.; HAMILTON, S. K. Have we overemphasized in aquatic removal of nitrate the role ecosystems? pathways of denitrification review. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 5, n. 2, p. 89–96, 2007.

CASTRO, A. P. DE et al. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with high clay content. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 11, p. 2169–75, 2011.

CERQUEIRA, V. S. et al. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1203–1222, 2012.

CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2013**. São Paulo: CETESB, 2014. 303 p.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 2015. 520 p.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2015**. 2. ed. São Paulo: CETESB, 2016. 562 p.

CETESB. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo: CETESB, 2017. 287 p.

CHRISTY, P. M.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167–173, 2014.

COLE, J. J. et al. Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. **Ecosystems**, v. 10, n. 1, p. 171–184, 2007.

DA SILVA, I. S. et al. Heavy metal distribution in recent sediments of the Tietê -Pinheiros river system in São Paulo state , Brazil. **Applied Geochemistry**, v. 17, p. 105–116, 2002.

DAEE. **Histórico do Rio Tietê**. Disponível em: <http://www.daee.sp.gov.br/index.php?option=com_content&id=793:historico-do-rio-tiete&Itemid=53>. Acesso em: 01 janeiro de 2017.

DAS, S.; DASH, H. R.; CHAKRABORTY, J. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 2967–2984, 2016.

DE OLIVEIRA, L. F. V.; MARGIS, R. The source of the river as a nursery for microbial diversity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–11, 2015.

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

DOPSON, M. et al. Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 10–13, 2014.

DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 2, p. 163–

82, 2006.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; DE LEÓN, A. V. P.; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. DEC, p. 1–15, 2015.

EVANS, S. E.; WALLENSTEIN, M. D. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. **Ecology Letters**, v. 17, n. 2, p. 155–164, 2014.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. BIN. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, v. 42, n. 1, p. 19–33, 2013.

FISHER, J. C. et al. Urban microbial ecology of a freshwater estuary of Lake Michigan. **Elementa (Wash D C)**, v. 22, n. 2, p. 134–139, 2015.

FUERST, J. A.; SAGULENKO, E. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 403–413, 2011.

GARCÍA-ARMISEN, T. et al. Seasonal variations and resilience of bacterial communities in a sewage polluted urban river. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

GARRIDO, L. et al. Dynamics of microbial diversity profiles in waters of different qualities. Approximation to an ecological quality indicator. **Science of The Total Environment**, v. 468, p. 1154–1161, 2014.

GHAI, R. et al. Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23785, 2011.

GHANBARINIA, F.; KHEIRBADI, M.; MOLLANIA, N. Comamonas sp. halotolerant bacterium from industrial zone of Jovein of Sabzevar introduced as good candidate to remove industrial pollution. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 273–280, 2015.

GHANE, M. et al. Isolation and characterization of a heavy metal resistant Comamonas sp. from industrial effluents. **Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science**, v. 37, n. 2, p. 173–179, 2013.

GOLOVLEV, E. L. Ecological strategy of bacteria: specific nature of the problem. **Mikrobiologiya**, v. 70, n. 4, p. 437–43, 2001.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.-P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119–142, 2010.

GRAHAM, E. B. et al. Microbes as engines of ecosystem function: When does community structure enhance predictions of ecosystem processes? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.

GUPTA, M. K. et al. Bioremediation of heavy metal polluted environment using resistant bacteria. **Journal of Environmental Research and Development**, v. 8, n. 4, p. 883–889, 2014.

HALE, R. L. et al. Stormwater Infrastructure Controls Runoff and Dissolved Material Export from Arid Urban Watersheds. **Ecosystems**, v. 18, n. 1, p. 62–75, 2014.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.

HEMME, C. L. et al. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. **ISME Journal**, v. 4, n. 5, p. 660–672, 2010.

HESSELSON, M. et al. Isotope array analysis of Rhodocyclales uncovers functional redundancy and versatility in an activated sludge. **The ISME journal**, v. 3, n. 12, p. 1349–64, 2009.

HU, A. et al. Response of bacterial communities to environmental changes in a mesoscale subtropical watershed, Southeast China. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 746–756, 2014.

IBEKWE, A. M.; MA, J.; MURINDA, S. E. Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources. **Science of the Total Environment**, v. 566–567, p. 1176–1185, 2016.

INTORNE, A. C. et al. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. **International Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 69–78, 2012.

ISLAM, M. S. et al. Heavy metal pollution in surface water and sediment: A preliminary assessment of an urban river in a developing country. **Ecological Indicators**, v. 48, p. 282–291, 2015.

JEON, Y. S. et al. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 60–69, 2015.

KANE, A. L. et al. Toward bioremediation of methylmercury using silica encapsulated *Escherichia coli* harboring the mer operon. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2016.

KARTIK, V. P.; JINAL, H. N.; AMARESAN, N. Characterization of cadmium-resistant bacteria for its potential in promoting plant growth and cadmium accumulation in *Sesbania bispinosa* root. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 11, p. 1061–1066, 2016.

KING, G. M. Urban microbiomes and urban ecology: How do microbes in the built environment affect human sustainability in cities? **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 721–728, 2014.

KNIETSCH, A. et al. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: Generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1408–1416, 2003.

LADE, H. et al. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. **Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences**, p. 158–174, 2015.

LAGE, O. M.; BONDOSO, J. Planctomycetes and macroalgae, a striking association. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–9, 2014.

LAL, D. et al. *Cupriavidus metallidurans*: A Modern Alchemist. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 114–115, 2013.

LEMONS, L. N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 1, p. 42–51, 2011.

LI, L.-L. et al. Bioprospecting metagenomics of decaying wood: mining for new glycoside hydrolases. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 23, 2011.

LIMA, F. R. **Caracterização da comunidade bacteriana da bacia do Rio Tietê por métodos independentes de cultivo**. 2015. São Paulo, 2015.

LITCHFIELD, K. et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. **Nature communications**, v. 6, p. 5973, 2015.

LIU, B. et al. Thauera and Azoarcus as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, n. 2, p. 274, 2006.

LLAMES, M. E. et al. The effects of light availability in shallow, turbid waters: A mesocosm study. **Journal of Plankton Research**, v. 31, n. 12, p. 1517–1529, 2009.

LOZA, V.; PERONA, E.; MATEO, P. Molecular fingerprinting of cyanobacteria from river biofilms as a water quality monitoring tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1459–1472, 2013.

MA, L. et al. Spatial-temporal changes of bacterioplankton community along an exorheic river. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–12, 2016.

MADSEN, E. L. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 456–464, 2011.

MANI, D.; KUMAR, C. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: An overview with special reference to phytoremediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 843–872, 2014.

MAZARI-HIRIART, M. et al. Final opportunity to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

MCLELLAN, S. L.; FISHER, J. C.; NEWTON, R. J. The microbiome of urban waters. **International Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 135–140, 2015.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server -- a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 2008.

MEZITI, A. et al. Anthropogenic effects on bacterial diversity and function along a river-to-estuary gradient in Northwest Greece revealed by metagenomics. **Environmental Microbiology**, v. 18, p. 4640–4652, 2016.

MORTATTI, J.; MENEGHEL DE MORAES, G.; PROBST, J. L. Heavy metal distribution in recent sediments along the Tietê River basin. **Geochemical Journal**, v. 46, p. 13–19, 2011.

MORTATTI, J.; PROBST, J. Characteristics of heavy metals and their evaluation in suspended sediments from Piracicaba river basin (São Paulo , Brazil). **Revista Brasileira de Geociências**, v. 40, n. 3, p. 375–379, 2010.

NACKE, H. et al. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 4, p. 663–675, 2012.

NEETA, B.; MAANSI, V.; HARPREET, S. B. Characterization of heavy metal (cadmium and nickel) tolerant Gram negative enteric bacteria from polluted Yamuna River, Delhi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 5, p. 127–137, 2016.

NEWTON, R. J. et al. A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. **Microbiology and Molecular Biology reviews: MMBR**,. v. 75, n.1, p. 14-49, 2011

NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L. A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–13, 2015.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 6, p. 730–750, 1999.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 313–339, 2003.

NZILA, A.; RAZZAK, S. A.; ZHU, J. Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 9, 2016.

ORTIZ, M. P. V. **Caracterização da comunidade fúngica do sedimento e da água do Rio Tietê**. 2015. São Paulo, 2015.

ORTIZ DE GARCÍA, S. A. et al. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1517–1533, 2014.

OULAS, A. et al. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. **Bioinformatics and Biology Insights**.

v. 9, p. 75–88, 2015.

PAGANINI, W. DA S. **A identidade de um rio de contrastes. O Tietê e seus múltiplos usos.** 2da Edição ed. São Paulo: AESABESP, 2008.

PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715–721, 2010.

PLAZA, E.; TRELA, J.; HULTMAN, B. Impact of seeding with nitrifying bacteria on nitrification process efficiency. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 155–164, 2001.

PRABHAKARAN, P.; ASHRAF, M. A.; AQMA, W. S. Microbial stress response to heavy metals in the environment. **RSC Adv.**, v. 6, n. 111, p. 109862–109877, 2016.

RAJENDRAN, P.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbes in heavy metal remediation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, n. 9, p. 935–944, 2003.

REDDY, B. et al. Insights into resistome and stress responses genes in *Bubalus bubalis* rumen through metagenomic analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 10, p. 6405–6417, 2014.

REN, L. et al. Warming and nutrient enrichment in combination increase stochasticity and beta diversity of bacterioplankton assemblages across freshwater mesocosms. **The ISME Journal**, p. 1–13, 2016.

RIBEIRO, M. **Despoluição do Tietê avança, mas num ritmo aquém do esperado.** Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/opiniaocolumna/2016/10/07/despoluicao-do-tiete-avanca-mas-num-ritmo-aquem-do-esperado.htm>>. Acesso em: 04 de Abril de 2017.

ROY, A. S. et al. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 79–89, 2014.

SALLOTO, G. R. B. et al. Pollution Impacts on Bacterioplankton Diversity in a Tropical Urban Coastal Lagoon System. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.

SAMAD, M. A. et al. Chemical Profile and Heavy Metal Concentration in Water and Freshwater Species of Rupsha River, Bangladesh. **American Journal of Environmental Protection**, v. 3, n. 6, p. 180–186, 2015.

SARDANS, J.; PEÑUELAS, J.; RIVAS-UBACH, A. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. **Chemoecology**, v. 21, n. 4, p. 191–225, 2011.

SAVIO, D. et al. Bacterial diversity along a 2600 km river continuum. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 4994–5007, 2015.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 955–962, 2007.

SHELAKE, R. et al. Transcription Factors, Smtbs, From Freshwater *Synechococcus* Sp. PCC 7942, And Marine *Synechococcus* Sp. PCC 7002: Evolutionary And Structural Aspects. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 2, n. 12, p. 274–284, 2013.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: Past and future trends. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153–1161, 2011.

SINGH, B. K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 111–116, 2010.

SINGH, J. et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480–494, 2009.

SINHA, R. K. et al. **Bioremediation of contaminated sites: a low-cost nature's biotechnology for environmental clean up by versatile microbes, plants & earthworms**. Em: TIMO, F; JOHANN, H (eds) *Soilwaste management and environmental remediation*. Nova Sciences Publishers, Inc. New York, 2010.

SOS MATA ATLÂNTICA. **Mancha de poluição no Tietê recua 11,5%, mas se mantém acima dos níveis pré-crise hídrica**. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/105428/mancha-de-poluicao-tiete-recua-115-mas-se-mantem-acima-dos-niveis-pre-crise-hidrica/>>. Acesso em: 04 de Abril de 2017.

SPIEGELMAN, D.; WHISSELL, G.; GREER, C. W. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 355–386, 2005.

STALEY, C. et al. Species sorting and seasonal dynamics primarily shape bacterial communities in the Upper Mississippi River. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 435–445, 2015a.

STALEY, C. et al. Frequencies of heavy metal resistance are associated with land cover type in the Upper Mississippi River. **Science of the Total Environment**, v. 511, p. 461–468, 2015b.

SUH, S.-S. et al. Seasonal Dynamics of Marine Microbial Community in the South Sea of Korea. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0131633, 2015.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

THUNG, D. T. et al. Mobster: accurate detection of mobile element insertions in next generation sequencing data. **Genome biology**, v. 15, n. 10, p. 488, 2014.

TSUNEDA, S. et al. Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 403–407, 2005.

VAN ROSSUM, T. V. et al. Year-long metagenomic study of river microbiomes across land use and water quality. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–15, 2015.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555–561, 2010.

VUONO, D. C. et al. Disturbance and temporal partitioning of the activated sludge metacommunity. **The ISME journal**, p. 1–11, 2014.

WANG, F. et al. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiological Research**, v. 164, n. 6, p. 650–657, 2009.

WANG, S. et al. Heavy metal pollution in coastal areas of South China : A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 76, n. 1–2, p. 7–15, 2013.

WHEATON, G. et al. The Confluence of Heavy Metal Biooxidation and Heavy Metal Resistance: Implications for Bioleaching by Extreme Thermoacidophiles. **Minerals**, v. 5, n. 3, p. 397–451, 2015.

WILKINS, D. et al. Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 3, p. 303–335, 2013.

YERGEAU, E. et al. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated canadian high arctic soils. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

ZEGLIN, L. H. Stream microbial diversity in response to environmental changes: Review and synthesis of existing research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–15, 2015.

ZHAO, J. et al. Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China. **Journal Zhejiang University Science B**, v. 15, n. 7, p. 670–680, 2014.

ZINGER, L.; GOBET, A.; POMMIER, T. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1878–1896, 2012.

ZWART, G. et al. Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 28, n. 2, p. 141–155, 2002.

FIGURAS EM ANEXO

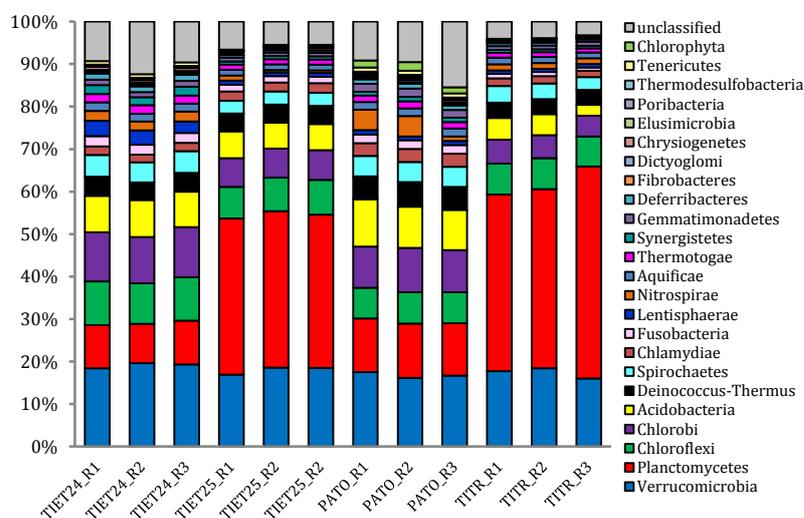


Figura 1A - Filos menos abundantes no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos ao longo do rio.

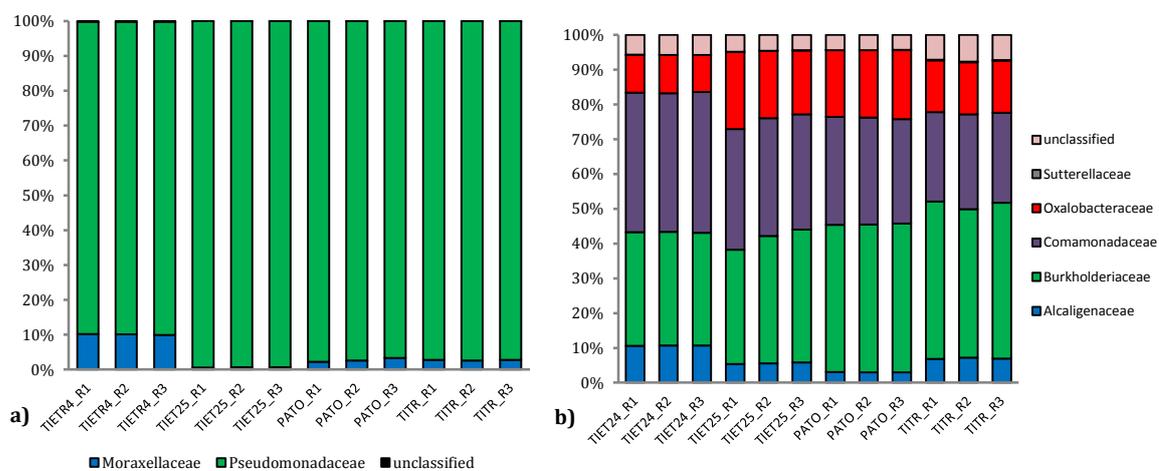


Figura 2A- Abundância relativa de famílias que mostraram diferenças no táxon ordem, detectadas no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio. a) ordem *Pseudomonadales*; b) ordem *Burkholderiales*

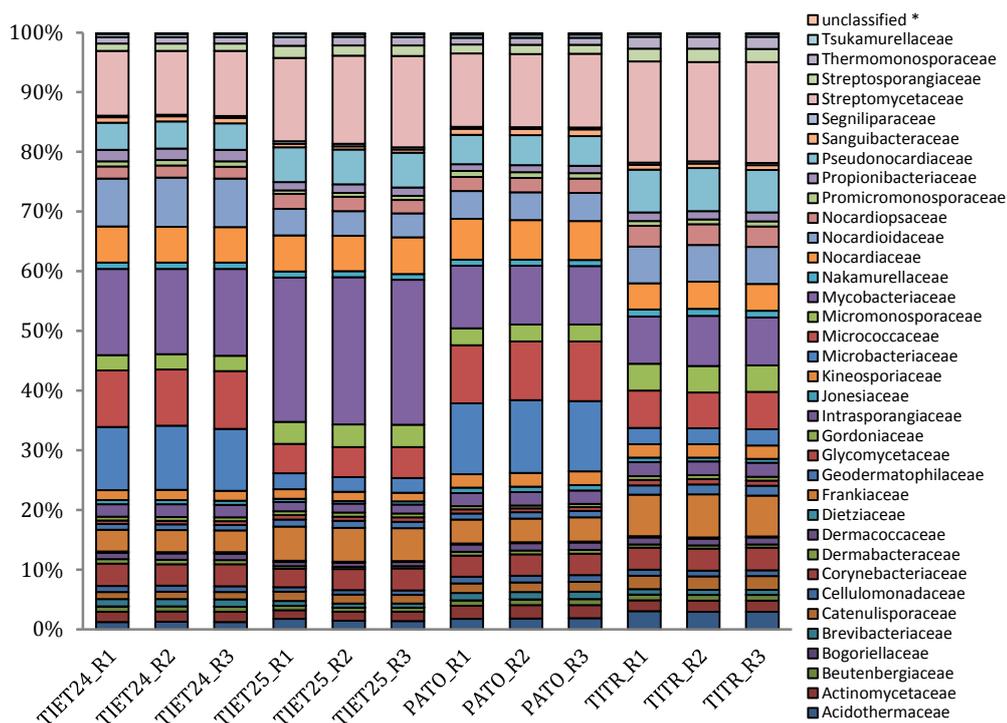


Figura 3A- Abundância relativa de famílias pertencentes à ordem Actinomycetales detectadas no metagenoma de amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio.

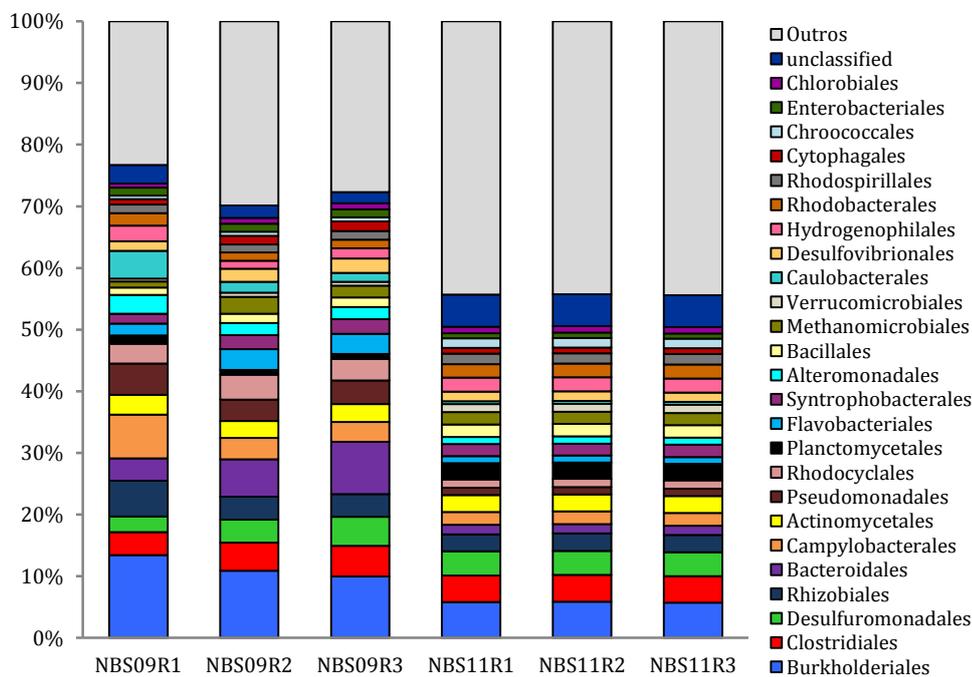


Figura 4A- Abundância relativa das ordens detectadas no metagenoma de amostras de sedimento de diferentes locais do rio.

TABELAS EM ANEXO

Tabela 1A – Parâmetros físico-químicos das amostras de água nos dois anos de coleta

Cód. CETESB	IQA		Al total		C.O.T.		Condutividade		D.B.O.	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	12	14	10,3	5,7	80,9	44,7	1843	1014	120	48
TATU04850	12	16	2,0	0,4	10,1	41,9	737	561	107	52
TIRG02900	14	21	1,5	1,9	46,6	20,9	646	475	136	23
TAMT04900	15	19	2,2	2,1	90,9	28,4	733	469	162	40
TIET04200	15	15	3,9	1,5	58,8	27,2	590	448	96	31
TIPI04900	15	18	1,6	2,1	49,2	23,9	633	399	99	26
PINH04500	17	16	0,6	10,1	38	17,4	522	309	55	46
TIET02450	25	19	8,0	8,7	10,9	19,5	552	225	13	33
JUNA 04900	27	16	3,0	0,5	24,7	64,6	359	678	47	96
TIET02400	27	19	8,5	12,8	13,7	25,4	655	265	14	36
CPIV02700	28	34	17	0,3	6,9	20,7	209	410	34	18
RGRA 02990	35	31	0,4	0,4	6,1	12,3	205	230	11	11
SORO02100	47	43	0,8	1,3	9,5	8,9	123	156	7	6
LENS03950	55	61	0,3	0,4	4,1	7,6	146	196	4	3
JCGU03900	59	58	0,2	0,3	3,9	7,5	72	71	2	2
CMDC02900	61	50	1,3	0,6	4,8	9,1	196	142	7	8
TIET02500	74	62	0,2	0,1	4,1	6,6	230	289	3	3
JPEP03600	76	70	0,1	0,2	1,5	5,7	45	100	2	2
PATO02900	78	54	0,1	0,1	2,7	10,4	95	90	2	3
NASCENTE	85	85	N.A	0,1	N.A	1,0	N.A	30	N.A	3
TIET02600	89	53	0,1	0,1	4,8	4,4	175	237	2	2
TITR02100	91	91	0,1	0,1	3,7	3,3	147	155	2	2
TITR02800	91	89	0,1	0,1	5,2	5,7	158	149,1	2	2
ESGT02050	92	59	0,1	0,1	6,8	15,7	148	159	2	11
ISOL02995	92	93	0,1	0,1	1,6	2,0	51	47	2	2
TIET02700	92	88	0,1	0,1	3,4	3,2	149	180	2	2
TIPR02990	92	90	0,1	0,1	3,7	4,0	149	173	2	2
PARN02100	93	90	0,1	0,1	2,7	1,5	78	79,3	2	2

IQA –Índice de Qualidade de Água; Al – Alumínio; C.O.T – Carbono Orgânico Total; D.B.O – Demanda Bioquímica de Oxigênio; N.A – Não analisado

Tabela 1 (continuação) – Parâmetros físico-químicos das amostras de água nos dois anos de coleta.

Cód. CETESB	Fe dissolvido		Fe total		Fósforo Total		N-Amoniacal		N-Nitrato	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	0,33	0,52	3,9	2,6	2,4	1,2	31,0	14,2	0,2	0,5
TATU04850	0,7	0,3	3,0	2,0	3,0	1,0	26,0	13,0	0,4	0,08
TIRG02900	0,89	0,5	2,9	3,3	3,1	1,2	19,1	12,6	0,2	0,2
TAMT04900	2,02	0,32	5,4	2,3	3,8	1,2	23,2	9,9	0,2	0,2
TIET04200	0,76	0,97	3,7	2,3	2,3	0,9	13,1	9,3	0,2	0,2
TIPI04900	0,43	1,3	2,1	3,1	2,5	1,3	19,3	9,8	0,2	0,2
PINH04500	0,44	0,4	1,8	5,2	2,2	0,5	17,1	4,7	0,2	0,2
TIET02450	0,1	0,1	7,9	4,2	1,4	1,3	17,9	3,2	0,7	1,8
JUNA 04900	0,3	0,3	2,0	0,9	0,7	1,0	4,0	7,0	3,0	0,7
TIET02400	0,1	0,1	8,1	7,9	1,7	1,3	22,1	3,2	0,1	2,1
CPIV02700	0,4	0,3	8,5	0,3	0,3	0,4	3,0	5,0	1,0	3,0
RGRA 02990	0,69	0,82	2,3	2,5	0,3	0,8	3,9	4,9	0,5	1,0
SORO02100	0,1	0,1	1,0	1,4	0,1	0,2	0,8	1,1	0,3	0,5
LENS03950	0,48	0,74	1,8	2,3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,7	1,0
JCGU03900	0,48	0,86	1,6	2,2	0,09	0,1	0,1	0,1	1,1	1,1
CMDC02900	0,5	0,3	2,5	1,0	0,3	0,3	3,0	0,5	2,0	3,0
TIET02500	0,1	0,1	0,1	0,2	0,06	0,2	0,1	0,1	3,9	2,3
JPEP03600	0,47	1,21	1,5	2,9	0,02	0,08	0,1	0,3	0,7	1,2
PATO02900	0,85	1,5	1,7	2,3	0,08	0,4	0,1	0,2	1,2	1,0
NASCENTE	N.A	0,01	N.A	0,01	N.A	0,02	N.A	0,2	N.A	0,4
TIET02600	0,06	0,02	0,07	0,08	0,007	0,02	0,1	0,2	2,2	1,0
TITR02100	0,02	0,04	0,04	0,08	0,007	0,02	0,1	0,1	0,08	1,0
TITR02800	0,01	0,02	0,02	0,01	0,007	0,02	0,1	0,1	0,7	1,0
ESGT02050	0,06	0,13	0,1	0,2	0,007	0,04	0,2	0,1	1,2	1,0
ISOL02995	0,02	0,02	0,02	0,03	0,007	0,02	0,1	0,1	0,3	0,3
TIET02700	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,1	0,1	1,0	1,0
TIPR02990	0,04	0,02	0,2	0,02	0,007	0,02	0,1	0,2	1,0	1,0
PARN02100	0,02	0,02	0,03	0,03	0,007	0,02	0,1	0,1	0,4	1,0

Fe – Ferro; N.A – Não analisado

Tabela 1A (continuação) – Parâmetros físico-químicos das amostras de água nos dois anos de coleta.

Cód. CETESB	O.D.		pH		Turbidez		Cádmio total		Níquel total	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
BQGU03850	0,2	0,07	71,3	41,5	8,0	7,8	< 0,0007	< 0,0007	0,027	0,04
TATU04850	0,1	0,3	70,3	49,1	7,3	7,2	0,001	0,001	0,1	0,1
TIRG02900	0,5	1,0	18,4	14,7	7,8	7,3	< 0,0007	< 0,0007	0,019	0,027
TAMT04900	0,3	1,1	47,6	14,5	7,3	7,2	< 0,0007	< 0,0007	0,07	0,03
TIET04200	0,4	0,7	33,9	18,7	7,0	7,1	< 0,0007	< 0,0007	0,03	0,04
TIPI04900	0,6	0,3	19,2	21,4	7,2	7,1	< 0,0007	< 0,0007	0,02	0,02
PINH04500	1,5	0,7	25,8	101	6,9	6,8	< 0,0007	< 0,0007	< 0,02	< 0,02
TIET02450	0,7	1,8	24,0	180	7,4	6,8	< 0,0007	< 0,0007	0,024	0,024
JUNA 04900	4,7	0,4	52,0	47,0	7,2	7,1	< 0,001	< 0,001	0,02	0,05
TIET02400	0,8	1,6	17,0	150	7,4	6,7	< 0,0007	< 0,0007	0,029	0,027
CPIV02700	3,2	2,8	23,0	24	7,3	8,1	< 0,001	< 0,001	< 0,02	0,04
RGRA 02990	5,5	2,8	67,0	31	7,2	7,2	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
SORO02100	6,2	4,4	12,0	24	7,0	6,8	< 0,0007	< 0,0007	< 0,02	< 0,02
LENS03950	7,4	6,8	59,0	42	7,4	7,4	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
JCGU03900	5,7	5,5	31,0	25	7,1	6,9	< 0,0007	< 0,0007	< 0,01	< 0,01
CMDC02900	6,5	5,4	22,0	62	7,0	6,9	< 0,001	< 0,001	< 0,02	< 0,02
TIET02500	6,4	2,5	1,8	4,3	7,3	7,0	< 0,0007	< 0,0007	< 0,01	< 0,01
JPEP03600	7,8	6,9	14,0	23,0	7,1	7,2	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
PATO02900	7,1	2,4	3,5	17,0	7,0	6,6	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
NASCENTE	NA	7,5	NA	1,0	NA	5,8	NA	NA	NA	NA
TIET02600	5,7	1,2	2,0	2,6	7,3	7,0	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
TITR02100	7,5	7,0	1,9	2,3	7,7	7,7	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
TITR02800	8,8	5,7	2,2	1,0	8,7	7,6	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
ESGT02050	8,0	8,4	1,4	66	7,7	8,8	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
ISOL02995	7,4	7,4	1,1	1,3	7,5	7,9	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
TIET02700	7,9	5,4	3,3	1,6	7,8	7,0	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
TIPR02990	8,5	5,9	1,3	0,9	8,2	7,0	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01
PARN02100	7,5	6,2	0,9	1,8	7,4	7,3	< 0,002	< 0,002	< 0,01	< 0,01

O.D – Oxigênio dissolvido; N.A – Não analisado

Tabela 2A – Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento nos dois anos de coleta.

	Descrição da Variável	Valores Referência		Rio Atibaia		Rio Piracicaba		Rio Pinheiros		Reservatório Itupararanga		Reservatório Barra Bonita		Reservatório Barra Promissão	
				ATIB02800		PCAB02195		PINH04500		SOIT02850		TIBB02900		TIPR 02800	
				5		5		6		10		10		16	
				Industrial		Industrial		Industrial		Industrial		Industrial		Agropecuária	
		TEL	PEL	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
	CHUVAS NAS ÚLTIMAS 24H			NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	N.A	NÃO
Metais e Semimetais	ALUMÍNIO (mg/kg)	-	-	16474	70484	66079	77486	13937	5054	104970	1E+05	38101	62793	N.A	40230
	ARSENIO (mg/kg)	5,9	17	< 1	1,82	< 1	2,98	< 1	1,2	< 1	9,8	2	8,31	N.A	2,43
	CÁDMIO (mg/kg)	0,6	3,5	< 0,5	0,5	0,76	0,6	0,72	0,6	< 0,5	0,6	< 0,5	0,6	N.A	0,6
	CHUMBO (mg/kg)	35	91,3	< 10	30	23,7	33	33,6	30	16,1	30	16,6	39,8	N.A	< 30
	COBRE (mg/kg)	35,7	197	19,8	71,7	106	92,5	55,9	58,1	25,8	12,4	42,6	70,7	N.A	< 18,2
	CROMO (mg/kg)	37,3	90	17,8	48	68,4	61	38,9	12,4	64,9	46,4	69,6	55,8	N.A	35,9
	FERRO (mg/kg)	-	-	14489	41465	52490	44941	17362	7355	83275	67550	79639	54133	N.A	39390
	MANGANÊS (mg/kg)	-	-	125	285	609	422	243	67,7	226	465	1911	2245	N.A	412
	MERCÚRIO (mg/kg)	0,17	0,486	0,06	0,1	0,12	0,1	0,09	0,1	0,07	0,1	0,06	0,1	N.A	0,1
	NIQUEL (mg/kg)	18	35,9	10,2	25,7	22,1	25,5	15,7	108	5,51	14,4	28,2	64,9	N.A	19,1
	ZINCO (mg/kg)	123	315	50,2	166	201	170	168	122	31	75,4	58,2	114	N.A	29,7
Nutrientes	CARBONO ORGÂNICO TOTAL (%)			< 1	2,23	2,31	2,22	1,46	1	2,05	1,86	1,32	2,91	N.A	1,76
	NITROGÊNIO KJELDAHL (mg/kg)			526	1868	3279	2744	1136	326	2396	2534	-	4487	N.A	1824
	FÓSFORO (mg/kg)	-	-	566	1568	2037	1587	665	435	1177	598	1146	3361	N.A	519
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAH)	ACENAFTENO (µg/kg)	6,71	88,9	N.A	< 20	< 20	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	ANTRACENO (µg/kg)	46,9	245	N.A	< 20	< 20	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	BENZO(A)ANTRACENO (µg/kg)	31,7	385	N.A	24	< 20	< 20	315	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	BENZO(A)PIRENO (µg/kg)	31,9	782	N.A	22,7	< 29	10,8	< 250	750	< 10	< 10	N.A	< 10	N.A	< 10
	BENZO(B)FLUORANTENO (µg/kg)	-	-	N.A	20,4	< 20	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	BENZO(G,H,I)PERILENO (µg/kg)	-	-	N.A	< 80	< 80	< 80	353	< 575	< 80	< 80	N.A	< 80	N.A	< 80
	BENZO(K)FLUORANTENO (µg/kg)	-	-	N.A	10	11,4	10	< 250	< 575	< 10	< 10	N.A	< 10	N.A	< 10
	CRISENO (µg/kg)	57,1	862	N.A	< 20	38,7	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	DIBENZO(A,H)ANTRACENO (µg/kg)	6,22	135	N.A	< 30	< 30	< 30	344	< 575	< 30	< 30	N.A	< 30	N.A	< 30
	FENANTRENO (µg/kg)	41,9	515	N.A	< 20	44,1	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	PI	N.A	< 20
	FLUORANTENO (µg/kg)	111	2355	N.A	PI	119	< 60	452	638	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	FLUORENO (µg/kg)	21,2	144	N.A	< 20	< 20	< 20	< 250	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
	INDENO(1,2,3-CD)PIRENO (µg/kg)	-	-	N.A	< 80	< 80	< 80	459	711	< 80	< 80	N.A	< 80	N.A	< 80
	NAFTALENO (µg/kg)	34,6	391	N.A	< 30	< 30	< 30	< 250	< 575	< 30	< 30	N.A	< 30	N.A	< 30
	PIRENO (µg/kg)	53	875	N.A	47,6	< 20	46,4	378	< 575	< 20	< 20	N.A	< 20	N.A	< 20
Microbio bética	CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (NMP/100g)			3500000	220000	5E+06	8E+06	7900000	5E+06	49000	2E+05	N.A	1700000	N.A	14000
	ESCHERICHIA COLI (NMP/100g)			230000	490	4E+06	79000	49000	130000	78	78	N.A	78	N.A	1100
Físico-Químicos	TEOR DE UMIDADE (%)			41,7	43,7	63,8	57	40,1	26	78,7	76	45,2	82	N.A	63
	pH			N.A	6,94	N.A	6,84	N.A	6,84	N.A	N.A	N.A	6,81	N.A	N.A
	POTENCIAL REDOX (mV)			N.A	-187,7	N.A	-191	N.A	-139,7	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
	SÓLIDOS FIXOS TOTAIS (%)			98	90	88	90	96	98	86	85	93	87	N.A	95
	SÓLIDOS TOTAIS (%)			67	53	38	42	63	74	20	24	44	18	N.A	36
	SÓLIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (%)			2	10	12	10	4	2	14	15	7	13	N.A	5
Granulometria	COLORAÇÃO			Cinza	Marron	Cinza	Cinza	N.A	Preta	Marron	N.A	Marron	Marron	N.A	Cinza
	AREIA (%)			85,53	65,34	5,41	13,2	80,84	80,68	5,94	2,37	54,10	6,4	N.A	65,20
	ARGILA (%)			6,29	20,6	47,74	50,9	8,2	5,6	62,33	73,75	28,37	60,7	N.A	20,43
	SILTE (%)			8,18	14,11	46,85	35,9	10,95	13,7	31,73	23,88	17,53	32,95	N.A	14,37

Entre TEL e PEL; Acima de PEL; P.I - Presença de interferentes; N.A – Não analisado; N.T – Não tóxico.
Fonte: Cetesb, 2014, 2015

Tabela 3A – Parâmetros físico-químicos medidos nas amostras de água selecionadas para análise metagenômica.

Parâmetro	Unidades	Padrão CONAMA	TIET02400	TIET02500	PATO02900	TITR02800
Chuvas em 24h	-	-	Sim	Sim	Não	Não
Coloração	-	-	Marrom	Verde	Verde	Verde
Condutividade	µS/cm	-	685	441	209	171
Oxigênio dissolvido	mg/L	>5	1,2	5,26	2,7	7,6
pH	U.pH	6 até 9	7,4	7,45	7	8,8
T° da água	°C	-	26,2	26,83	24,6	25,9
T° do ar	°C	-	30	25,4	28,5	25,1
Alumínio dissolvido	mg/L	< 0,1	0,27	< 0,1	0,075	< 0,05
Alumínio total	mg/L	-	13,8	0,26	0,118	< 0,05
Bário total	mg/L	< 0,7	0,14	0,04	0,076	0,055
Boro total	mg/L	< 0,5	N.A	0,05	N.A	N.A
Cádmio total	mg/L	< 0,001	< 0,0007	< 0,0007	< 0,001	< 0,001
Carbono orgânico total	mg/L	-	12,9	7,27	8	7,9
Chumbo total	mg/L	< 0,01	< 0,009	< 0,009	< 0,008	< 0,008
Cloreto total	mg/L	< 250	69,5	49,4	21	14
Cobre dissolvido	mg/L	< 0,009	< 0,009	< 0,009	< 0,005	< 0,005
Cobre total	mg/L	-	0,05	< 0,01	< 0,005	< 0,005
Cromo total	mg/L	< 0,05	0,04	< 0,02	< 0,005	< 0,005
DBO (5, 20)	mg/L	< 5	55	6	7	< 2
Ferro Dissolvido	mg/L	< 0,3	0,44	< 0,1	1,47	0,011
Ferro Total	mg/L	-	8,5	0,25	2,13	0,034
Fósforo Total	mg/L	< 0,1	3,36	0,56	0,456	0,017
Manganês Total	mg/L	< 0,1	0,34	0,07	0,065	0,013
Mercúrio Total	mg/L	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002	< 0,0002
Níquel Total	mg/L	< 0,025	0,04	< 0,02	< 0,01	< 0,01
Nitrogênio Amoniacal	mg/L	< 3,7	22,3	0,4	3,42	< 0,1
Nitrogênio Kjeldahl	mg/L	-	23,5	1,64	4,38	0,62
Nitrogênio-Nitrato	mg/L	< 10	< 0,2	5,66	< 1	< 1
Nitrogênio-Nitrito	mg/L	< 1	< 0,1	0,31	0,7	< 0,2
Potássio	mg/L	-	16,1	10,8	6,87	6,18
Sódio	mg/L	-	71,6	51,2	27,7	23,1
Sólido Dissolvido Total	mg/L	< 500	304	258	181	123
Sólido Total	mg/L	-	542	264	200	150
Subst. Tensoat. reagem c/ azul de metileno	mg/L	< 0,5	0,34	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Turbidez	UNT	< 100	120	11,7	7,6	2,7
Zinco Total	mg/L	< 0,18	0,26	< 0,02	< 0,005	0,006
Ens. Ecotoxicológico c/ Ceriodaphnia dubia	NA	Não tóxico	N.A	Não tóxico	Não tóxico	Não tóxico
Clorofila-a	µg/L	<30	N.A	32,41	1,07	10,16
Feofitina-a	µg/L	N.A	N.A	5,01	1,55	1,82
E.coli	UFC/100mL	<600	6900	80	468	1

Valores em vermelho representam medidas acima do padrão Conama 357/05; N.A – Não analisado

Tabela 4A – Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento selecionadas para análise metagenômica.

	Descrição da Variável	Valores Referência		Rio Pinheiros	R. Promissão
				PINH04500	TIPR 02800
				6	16
VOCAÇÃO				Industrial	Agropecuária
Metais	CHUVAS NAS ÚLTIMAS 24H	TEL	PEL	Não	Não
	TEMPERATURA DO AR (°C)	-	-	25,6	N.A
	ALUMÍNIO (mg/kg)	-	-	5054	40230
	ARSÊNIO (mg/kg)	5,9	17	1,2	2,43
	CÁDMIO (mg/kg)	0,6	3,5	< ¹ 0,6	< ¹ 0,6
	CHUMBO (mg/kg)	35	91,3	< 30	< 30
	COBRE (mg/kg)	35,7	197	58,1	18,2
	CROMO (mg/kg)	37,3	90	12,4	35,9
	ESCÂNDIO (mg/kg)	-	-	-	6,5
	FERRO (mg/kg)	-	-	7355	39390
	MANGANÊS (mg/kg)	-	-	67,7	412
	MERCÚRIO (mg/kg)	0,17	0,486	< 0,1	< 0,1
	NÍQUEL (mg/kg)	18	35,9	108	19,1
ZINCO (mg/kg)	123	315	122	29,7	
Nutrientes	CARBONO ORGÂNICO TOTAL (%)	-	-	< 1	1,76
	NITROGÊNIO KJELDAHL (mg/kg)	-	-	326	1824
	FÓSFORO (mg/kg)	-	-	435	519
Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (PAH)	ACENAFTENO (µg/kg)	6,71	88,9	< ² 575	< ¹ 20
	ANTRACENO (µg/kg)	46,9	245	< ² 575	< 20
	BENZO(A)ANTRACENO (µg/kg)	31,7	385	< ² 575	< 20
	BENZO(A)PIRENO (µg/kg)	31,9	782	750	< 10
	BENZO(B)FLUORANTENO (µg/kg)	-	-	< 575	< 20
	BENZO(G,H,I)PERILENO (µg/kg)	-	-	< 575	< 80
	BENZO(K)FLUORANTENO (µg/kg)	-	-	< 575	< 10
	CRISENO (µg/kg)	57,1	862	< ¹ 575	< 20
	DIBENZO(A,H)ANTRACENO (µg/kg)	6,22	135	< ² 575	< ¹ 30
	FENANTRENO (µg/kg)	41,9	515	< ² 575	< 20
	FLUORANTENO (µg/kg)	111	2355	638	< 20
	FLUORENO (µg/kg)	21,2	144	< ² 575	< 20
	INDENO(1,2,3-CD)PIRENO (µg/kg)	-	-	711	< 80
	NAFTALENO (µg/kg)	34,6	391	< ² 575	< 30
PIRENO (µg/kg)	53	875	< ¹ 575	< 20	
Pesticidas Organoclorados	ALDRIN (µg/kg)	-	-	N.A	< 0,57
	ALFA BHC (µg/kg)	-	-	N.A	< 2,86
	BETA BHC (µg/kg)	-	-	N.A	< 2,86
	DELTA BHC (µg/kg)	-	-	N.A	< 2,86
	CIS-CLORDANO (µg/kg)	-	-	N.A	< 5,71
	TRANS-CLORDANO (µg/kg)	-	-	N.A	< 5,71
	DDD (µg/kg)	3,54	8,51	N.A	< 0,57
	DDE (µg/kg)	1,42	6,75	N.A	< 0,57
	DDT (µg/kg)	1,19	4,77	N.A	< ¹ 1,71
	DIELDRIN (µg/kg)	2,85	6,67	N.A	< 0,57
	ENDOSULFAN I (µg/kg)	-	-	N.A	< 5,71
	ENDOSULFAN II (µg/kg)	-	-	N.A	< 5,71
	ENDOSULFAN SULFATO (µg/kg)	-	-	N.A	< 5,71
	ENDRIN (µg/kg)	2,67	62,4	N.A	< 1,14
	HEPTACLORO (µg/kg)	0,3	10	N.A	< ¹ 1,43
	HEPTACLORO EPÓXIDO (µg/kg)	0,6	2,74	N.A	< ¹ 1,43
	HEXACLOROBENZENO (µg/kg)	-	-	N.A	< 0,86
	LINDANO (µg/kg)	0,94	1,38	N.A	< ² 1,43
	METOXICLORO (µg/kg)	-	-	N.A	< 2,86
	MIREX (µg/kg)	7	1300	N.A	< 0,57
TOXAFENO (µg/kg)	-	-	N.A	< 114	

N.A – Não analisado; N.T – Não tóxico; <¹ = TEL < Limite de Quantificação < PEL; <² = Limite de Quantificação > PEL

Tabela 4A (continuação) – Parâmetros físico-químicos das amostras de sedimento selecionadas para análise metagenômica.

	Descrição da Variável	Valores Referência		Rio Pinheiros	R. Promissão
				PINH04500	TIPR 02800
				6	16
	UGRHI				
	VOCAÇÃO			Industrial	Agropecuária
Ecotoxicológicos	Ensaio Ecotoxicológico com <i>Chironomus sancticaroli</i>	-	-	N.A	N.T.
	Ensaio Ecotoxicológico com <i>Hyalella azteca</i>	-	-	N.A	N.T.
	Ensaio Ecotoxicológico com <i>Vibrio fischeri</i> (%)	-	-	65,2	11,7
Microbiológicos	<i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> (NMP/100g)	-	-	4900000	14000
	<i>ESCHERICHIA COLI</i> (NMP/100g)	-	-	130000	1100
Físico-Químicos	TEOR DE UMIDADE (%)	-	-	26	63
	pH	-	-	6,84	N.A
	POTENCIAL REDOX (mV)	-	-	-139,7	N.A
	SÓLIDOS FIXOS TOTAIS (%)	-	-	98	95
	SÓLIDOS TOTAIS (%)	-	-	74	36
	SÓLIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (%)	-	-	2	5
Granulometria	COLORAÇÃO	-	-	Preta	Cinza
	AREIA (%)	-	-	80,68	65,2
	ARGILA (%)	-	-	5,62	20,43
	SILTE (%)	-	-	13,7	14,37
	CLASSIFICAÇÃO	-	-	areia	areia argilosa

N.A – Não analisado; N.T – Não tóxico; <¹ = TEL < Limite de Quantificação < PEL; <² = Limite de Quantificação > PEL. Fonte: CETESB

Tabela 5A – Abundância de genes associados à resistência/tolerância a metais tóxicos no nível de função do SEED-Subsystem detectados no metagenoma de amostras de água.

NÍVEL 3	FUNÇÃO	Abundância relativa			
		TIET24	TIET25	PATO	TITR
Arsenic resistance	Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD	0,002484	0,000264	0,000497	0,000002
	Arsenical resistance operon repressor	0,002223	0,003396	0,000825	0,001743
	Arsenic efflux pump protein	0,005844	0,007709	0,007179	0,003317
	Arsenical-resistance protein ACR3	0,038663	0,020141	0,025247	0,019241
	Arsenic resistance protein ArsH	0,007059	0,012274	0,007044	0,006437
	Arsenical pump-driving ATPase	0,023222	0,039160	0,017042	0,029365
Cadmium resistance	Cadmium-transporting ATPase	0,003017	0,005365	0,000665	0,003379
	Cadmium efflux system accessory protein	0,000473	0,001129	0,000002	0,000486
	Cadmium resistance protein	0,000114	0,000126	0	0,000006
Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	0,354720	0,202368	0,267537	0,136244
	Cation efflux system protein CusA	0,352084	0,201971	0,266825	0,135912
	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein	0,406768	0,245858	0,299706	0,168428
	Probable Co/Zn/Cd efflux system membrane fusion protein	0,051501	0,029699	0,042703	0,011052
	Heavy metal sensor histidine kinase	0,018908	0,031158	0,011728	0,010362
	DNA-binding heavy metal response regulator	0,021598	0,030800	0,012930	0,011349
	Cobalt/zinc/cadmium efflux RND transporter, membrane fusion protein, CzcB family	0,021816	0,015399	0,009207	0,004459
	Heavy metal RND efflux outer membrane protein, CzcC family	0,026565	0,019282	0,016866	0,008047

Valores em negrito representam valores a maior abundância detectada para cada categoria.

Tabela 5A (continuação) – Abundância de genes associados à resistência/tolerância a metais tóxicos no nível de função do SEED-Subsystem detectados no metagenoma de amostras de água.

NÍVEL 3	FUNÇÃO	Abundância relativa			
		TIET24	TIET25	PATO	TITR
Cobalt-zinc-cadmium resistance	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	0,022159	0,016015	0,008510	0,010171
	Transcriptional regulator, MerR family	0,032467	0,031334	0,026072	0,013404
	Cadmium-transporting ATPase	0,003017	0,005365	0,000665	0,003379
	Copper-sensing two-component system response regulator CusR	0,008829	0,009177	0,003825	0,002468
	Cd(II)/Pb(II)-responsive transcriptional regulator	0,002519	0,002751	0,001838	0,000828
	Cation efflux system protein CusC precursor	0,000274	0,000198	0,000002	0,000001
	Putative silver efflux pump	0,000464	0,000149	0,000386	0,000524
	Cation efflux system protein CusF precursor	0,000115	0,000065	0	0
	Copper sensory histidine kinase CusS	0,006326	0,007148	0,003380	0,002179
	Heavy metal resistance transcriptional regulator HmrR	0,000280	0,000005	0,000522	0,000002
	Hypothetical protein involved in heavy metal export	0,000005	0,000001	0,000068	0
	Zn(II) and Co(II) transmembrane diffusion facilitator	0,000007	0	0,000034	0,000002
	Zinc transporter ZitB	0,000437	0,000369	0,000796	0,000778
	Probable cadmium-transporting ATPase	0,004239	0,005310	0,003103	0,002731
Copper homeostasis	Blue copper oxidase CueO precursor	0,001611	0,000899	0,000339	0,003531
	Copper-translocating P-type ATPase	0,188090	0,142548	0,121403	0,106633
	Multidrug resistance transporter, Bcr/CflA family	0,011497	0,013777	0,012805	0,003695
	Multicopper oxidase	0,040935	0,028730	0,026912	0,017293
	Copper-sensing two-component system response regulator CusR	0,008829	0,009177	0,003825	0,002468
	Copper resistance protein C precursor	0,001180	0,002662	0,000937	0,000758
	Copper resistance protein B	0,004736	0,003092	0,001385	0,003134
	CopG protein	0,005908	0,004484	0,002660	0,002619
	Cu(I)-responsive transcriptional regulator	0,003840	0,004991	0,002232	0,001108
	Copper tolerance protein	0,006734	0,005478	0,006717	0,002589
	Copper resistance protein D	0,004385	0,008909	0,004026	0,005511
	Sensor protein copS	0,000259	0,000008	0,000034	0,001166
	Cytochrome c heme lyase subunit CcmF	0,044455	0,028238	0,031909	0,028154
	Copper-binding periplasmic protein	0,000002	0,000107	0,000003	0,000002
	Copper sensory histidine kinase CusS	0,006326	0,007148	0,003380	0,002179
	Transcriptional activator protein CopR	0,000370	0,000344	0,000209	0,000063
	Copper chaperone	0,000982	0,001736	0,001324	0,000647
	Heavy metal-(Cd/Co/Hg/Pb/Zn)-translocating P-type ATPase:Heavy metal translocating P-type ATPase	0,000004	0,000002	0,000009	0,000001

Valores em negrito representam a maior abundância detectada para cada categoria.

Tabela 5A (continuação) – Abundância de genes associados à resistência/tolerância a metais tóxicos no nível de função do SEED-Subsystem detectados no metagenoma de amostras de água.

NÍVEL 3	FUNÇÃO	Abundância relativa			
		TIET24	TIET25	PATO	TITR
Copper homeostasis: copper tolerance	Copper homeostasis protein CutE	0,030396	0,022356	0,026713	0,012998
	Secreted protein, suppressor for copper-sensitivity ScsC	0,001009	0,000179	0	0,001412
	Magnesium and cobalt efflux protein CorC	0,029390	0,021263	0,037562	0,022435
	Copper homeostasis protein CutF precursor	0,000170	0,000188	0,000002	0,000830
	Membrane protein, suppressor for copper-sensitivity ScsB	0,002398	0,000636	0,000005	0,003813
	Membrane protein, suppressor for copper-sensitivity ScsD	0,000670	0,000006	0	0,000598
	Cytoplasmic copper homeostasis protein <i>cutC</i>	0,001592	0,000957	0,000775	0,002054
	Suppression of copper sensitivity: putative copper binding protein ScsA	0,000311	0,000004	0	0,000389
Periplasmic divalent cation tolerance protein cutA	0,002704	0,001341	0,001882	0,002545	
Mercuric reductase	Mercuric ion reductase	0,004600	0,017645	0,000592	0,012825
	PF00070 family, FAD-dependent NAD(P)-disulphide oxidoreductase	0,005584	0,001718	0,003631	0,002490
Mercury resistance operon	Mercuric transport protein, MerE	0,000216	0,000003	0,000034	0,000000
	Mercuric ion reductase	0,004600	0,017645	0,000592	0,012825
	Periplasmic mercury(+2) binding protein	0,001055	0,000396	0,000131	0,000075
	Mercuric transport protein, MerT	0,001094	0,000321	0,000008	0,000004
	Mercuric resistance operon coregulator	0,000309	0,000004	0,000066	0
	Mercuric transport protein, MerC	0,000291	0,000007	0,000034	0
	Mercuric resistance operon regulatory protein	0,001851	0,002240	0,001145	0,001070
Organomercurial lyase	0,000004	0,000007	0,000008	0	
Resistance to chromium compounds	Chromate transport protein ChrA	0,024736	0,011762	0,029451	0,011769
	Superoxide dismutase SodM-like protein ChrF	0,000989	0,000183	0,000755	0,000149
	Chromate resistance protein ChrB	0,001579	0,000219	0,001776	0,000119
	Superoxide dismutase ChrC	0,000427	0,000043	0,000212	0,000007
Zinc resistance	Response regulator of zinc sigma-54-dependent two-component system	0,011488	0,006491	0,007475	0,011405
	Zinc resistance-associated protein	0,000250	0,000055	0	0
	Sensor protein of zinc sigma-54-dependent two-component system	0,001017	0,000694	0,000504	0,000429

Valores em negrito representam a maior abundância detectada para cada categoria.