



**ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE**

**BIOFILMES BACTERIANOS COMO INDICADORES DOS EFEITOS DO USO DO SOLO  
SOBRE OS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS NA REGIÃO DE CACONDE**

Por

**SOLANGE ACETO DOS SANTOS**

**NAZARÉ PAULISTA, 2017**



**ESCOLA SUPERIOR DE CONSERVAÇÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE**

**BIOFILMES BACTERIANOS COMO INDICADORES DOS EFEITOS DO USO DO SOLO  
SOBRE OS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS NA REGIÃO DE CACONDE**

Por

SOLANGE ACETO DOS SANTOS

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

PROF. Pedro M. Pedro

PROF. Alexandre Uezu

PROF.<sup>a</sup> Milena Dropa

**TRABALHO FINAL APRESENTADO AO PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL  
EM CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**

**IPÊ – INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS**

**NAZARÉ PAULISTA, 2017**

### **Ficha Catalográfica**

Aceto dos Santos, Solange

Biofilmes Bacterianos como Indicadores dos Efeitos do Uso do Solo sobre os Ecossistemas Aquáticos na Região de Caconde, 2017 pp.

Trabalho Final (mestrado): IPÊ – Instituto de Pesquisas ecológicas

1. Biofilme bacteriano
2. APPs
3. SIG
4. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)
  - I. Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade, IPÊ – Nazaré Paulista/SP.

### **BANCA EXAMINADORA**

NAZARÉ PAULISTA/SP, 23 DE FEVEREIRO DE 2017

---

Prof. Dr. Pedro M. Pedro

---

Prof. Dr. Alexandre Uezu

---

Profª Dra. Milena Dropa

A meu amigo Jeová Deus, por ser extremamente companheiro e piedoso comigo...

Ao meu marido e filho que foram muito pacientes em todas as horas...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, criador da essência da vida, cuja força me forneceu para realizar mais esta etapa importante na minha vida, pela oportunidade de existir e de desfrutar da sua criação e pela sua presença incondicional;

Agradeço ao meu marido Paulo e ao meu filho Jonathan por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos. Por compreender a importância dessa conquista e aceitar a minha ausência quando necessário.

Ao IPÊ pela grande oportunidade que me foi dada de cursar este Mestrado e da pesquisa científica envolvida nele.

Ao Pedro, meu orientador, pela oportunidade, paciência, credibilidade e pelas contribuições ao desenvolvimento do trabalho. Agradeço por tudo que aprendi nesses dois anos.

A AES – Tietê Energia S/A e o projeto de número 0064-1035/2014 do P&D da ANEEL- Agência Nacional de Energia Elétrica, que financiou a bolsa de estudo para esta pesquisa sem o qual eu não poderia ter me dedicado a esse Mestrado. Especialmente a enorme dedicação e apoio incondicional da gerente do projeto Tatiane Rech. Manifesto também meus agradecimentos ao Sr. Fábio Dotto da Farol Consultoria pela gestão financeira do projeto.

A Milena por disponibilizar o Laboratório de Pesquisa em Saúde Pública na Universidade de São Paulo (USP) para realização de trabalhos relacionados a essa pesquisa.

Ao Alexandre, meu coorientador, pelas importantes dicas que ajudaram a moldar o trabalho, pelo empenho, sugestões, por toda a ajuda na escrita dos trabalhos realizados, cuja ajuda foi essencial para completar minha pesquisa.

A Cristiana por toda atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao Ruan pela ajuda com o SIG.

A Rose pela paciência.

A todos meus colegas e amigos do curso, especialmente as colegas Carol, Erika e Irina, pelas boas conversas e pela grande amizade.

Aos demais colegas e amigos da minha turma de mestrado.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para eu concretizar este trabalho, sou, sinceramente,  
Muito grata!

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	V
LISTA DE TABELAS .....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
LISTA DE ABREVIACOES .....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO I.....	9
REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
<b>1. ECOSISTEMAS AQUÁTICOS</b> .....	9
<b>2. DISTRIBUIÇÃO E SAÚDE DA ÁGUA DOCE</b> .....	9
<b>3. A IMPORTÂNCIA DAS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE (APPs) ....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Funções Hidrológicas das APPs</b> .....	<b>12</b>
<b>4. PARÂMETROS CONVENCIONAIS PARA ANÁLISE DA ÁGUA E SUAS LIMITAÇÕES</b> .....	<b>15</b>
<b>5. BIOFILMES BENTÔNICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>6. BACTÉRIAS COMO BIOINDICADORAS</b> .....	<b>17</b>
<b>7. AVANÇOS NO BIOMONITORAMENTO</b> .....	<b>18</b>
<b>8. GERAÇÕES DE SEQUENCIADORES</b> .....	<b>19</b>
<b>8. PAISAGENS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA</b> .....	<b>20</b>
<b>8.1. Estrutura da Paisagem</b> .....	<b>20</b>
<b>9. SOLO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA</b> .....	<b>21</b>
<b>9.1. Infiltração</b> .....	<b>21</b>
<b>9.2. Declividade</b> .....	<b>22</b>
<b>9.3. Composição e Uso de Solo</b> .....	<b>22</b>
<b>10. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>23</b>
<b>11. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>11.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>24</b>
<b>11.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>24</b>
CAPÍTULO II.....	25
BIOFILMES BACTERIANOS COMO INDICADORES DOS EFEITOS DO USO DO SOLO SOBRE OS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS NA REGIÃO DE CACONDE .....	25
<b>12. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>13. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>

13.1.	Área de Estudo.....	28
13.1.1.	Caconde.....	28
13.1.2.	Geomorfologia.....	29
13.1.3.	Usina Graminha – Represa Caconde .....	30
13.1.4.	AES Tiête .....	30
13.2.	Amostragem dos Biofilmes .....	31
13.3.	Extração de DNA e PCR.....	31
13.4.	Análise de Dados.....	33
13.4.1.	Filtragem de qualidade.....	33
13.4.2.	<i>Out-clustering</i> e atribuição.....	33
13.5.	Parâmetros físico-químicos .....	33
13.6.	Uso de Solo .....	34
14.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
14.1.	Índices da Diversidade Alfa.....	36
14.2.	Índices da Diversidade Beta .....	37
14.3.	Modelos Lineares Generalizados (GLM).....	38
15.	RESULTADOS.....	39
16.	DISCUSSÃO.....	56
17.	CONCLUSÃO .....	62
18.	RECOMENDAÇÕES.....	64
	CAPÍTULO III .....	65
	AS BACTERIAS MAIS ABUNDANTES EM NOSSO ESTUDO E SEUS PAPÉIS DENTRO DOS ECOSSISTEMAS HÍDRICOS .....	65
19.	INTRODUÇÃO.....	65
20.	REVISÃO DA LITERATURA .....	68
20.1.	<i>Cellvibrionaceae</i> .....	68
20.2.	<i>Pelomonas</i> .....	68
20.3.	<i>Rhodoferax</i> .....	69
20.4.	<i>Ideonella</i> .....	69
20.5.	<i>Elstera</i> .....	70
20.6.	<i>Rhodospirillaceae</i> .....	70
20.7.	<i>Rhizobiales</i> .....	71
20.8.	<i>Caulobacter</i> .....	71
21.	A IMPORTÂNCIA DO PROCESSO DE DESNITRIFICAÇÃO EM CORPOS HÍDRICOS.....	72



21.1.	<i>Dechloromonas</i> .....	74
22.	ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES .....	77
22.1.	<i>Dechloromonas</i> e <i>Elstera</i> .....	77
22.2.	<i>Dechloromonas</i> , <i>Ideonella</i> e <i>Pelomonas</i> .....	77
22.3.	<i>Dechloromonas</i> , <i>Ideonella</i> e <i>Rhodoferax</i> .....	78
22.4.	<i>Pelomonas</i> , <i>Rhodoferax</i> e <i>Ideonella</i> .....	78
23.	DISCUSSÃO .....	79
24.	CONCLUSÃO .....	80
25.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
	ANEXO A .....	98
	ANEXO B .....	101
	ANEXO C .....	132
	ANEXO D .....	133
	ANEXO E .....	144

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores de referência do Alfakit.....	34
<b>Tabela 2:</b> As dez Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) mais abundantes nos 31 pontos amostrais em Caconde. ....	39
<b>Tabela 3:</b> Resultados dos testes de Mantel sobre a correlação entre matrizes de distância (espacial e geográfica) e de diversidade beta entre os 31 pontos amostrados na pesquisa. ....	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa de uso de solo da região de Caconde com os 31 pontos amostrais.....	28
<b>Figura 2:</b> Abundância das dez OTUs mais frequentes em cada ponto de coleta na região de Caconde, SP. As cores estão relacionadas com os seguintes OTUs: vermelho OTU 1, amarelo OTU 5, verde escuro OTU 2, marrom OTU 7, verde OTU 3, ouro OTU 14, azul OTU 17, laranja OTU 9, azul claro OTU 6, e roxo OTU 4.....	40
<b>Figura 3:</b> Frequência da OTU 1 ( <i>Cellvibrionaceae</i> ) entre as amostras.....	41
<b>Figura 4:</b> Porcentagens do uso de solo nas Bacias: Café (marrom), Eucalipto (verde claro), Florestas (verde escuro), Lagos (azul), Pasto (amarelo) e Urbana (roxo) nas diferentes distâncias do ponto de coleta (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 e 10.000 metros).....	42
<b>Figura 5:</b> Porcentagens do uso de solo nas APPs: Café (marrom), Eucalipto (verde claro), Florestas (verde escuro), Lagos (azul), Pasto (amarelo) e Urbana (roxo) nas diferentes distâncias do ponto de coleta (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 e 10.000 metros).....	42
<b>Figura 6:</b> Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta D e gráficos de porcentagens (bacia e APP).....	43
<b>Figura 7:</b> Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta I e gráficos de porcentagens (bacia e APP).....	44
<b>Figura 8:</b> Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta P e gráficos de porcentagens (bacia e APP).....	45
<b>Figura 9:</b> Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta W e gráficos de porcentagens (bacia e APP).....	46
<b>Figura 10:</b> Variação do grau de explicação (pseudo $R^2$ ) da abundância das 10 OTUs mais frequentes “pela porcentagem das áreas de pasto” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs. ....	48
<b>Figura 11:</b> Variação do grau de explicação (pseudo $R^2$ ) da abundância das 10 OTUs mais frequentes “pela porcentagem das áreas de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs. ....	48

<b>Figura 12:</b> Variação do grau de explicação (pseudo $R^2$ ) da concentração dos índices de diversidade de Simpson, de Pielou e da Riqueza total de OTUs (S) “pela porcentagem das áreas de pasto” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs. ....	49
<b>Figura 13:</b> Variação do grau de explicação (pseudo $R^2$ ) dos índices de diversidade de Simpson, de Pielou e da Riqueza total de OTUs (S) “pela porcentagem das áreas de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs. ....	50
<b>Figura 14:</b> Variação do grau de explicação (pseudo $R^2$ ) da concentração de nitrato pela ordem “porcentagem das áreas de pasto” e “porcentagem de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.....	51
<b>Figura 15:</b> Estimativa de três medidas para diversidade alfa nos pontos de coleta.....	52
<b>Figura 16:</b> Correlação da matriz de diversidade beta com a matriz de distância. ....	53
<b>Figura 17:</b> Cladograma dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método UNIFRAC <i>weighted</i> . ....	54
<b>Figura 18:</b> Cladograma dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método Bray Curtis.....	54
<b>Figura 19:</b> Cladograma gerado dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método Jaccard. ....	55
<b>Figura 20:</b> Cladograma dos OTUs seqüenciados dos pontos amostrais usando o método UNIFRAC <i>unweighted</i> . ....	55
<b>Figura 21:</b> Porcentagens das 10 OTUs mais abundantes em cada ponto de amostragem. ....	66
<b>Figura 22:</b> As três principais etapas do ciclo do nitrogênio: fixação, nitrificação e desnitrificação.....	73

## LISTA DE ABREVIACÕES

ANEEL- Agência Nacional de Energia Elétrica

ANA - Agência Nacional de Águas

APPs – Áreas de Preservação Permanente

AusRivAS - *Australian Rivers Assessment System*

BMWP - *Biological Monitoring Working Party score system*

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

FAO - *Food and Agriculture Organization*

GLM - Modelos Lineares Generalizados

GPS - Sistema de Posicionamento Global

IQA - Índice da Qualidade da Água

MID – *Multiplex Identifier*

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NGS - *Next-Generation Sequencing*

NIG - *National Human Genome*

NMDS - Dimensionamento Multidimensionais não Métricos

ONU - Organização das Nações Unidas

OTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais

PAR - *Rapid Assessment Approaches*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PGM - *Personal Genome Machine*

RIVPACS - *River Invertebrate Prediction And Classification System*

SIG – Sistema de Informação Geográfica

SMRT - *Single Molecule Real Time*

WWF – *World Wide Found for Nature*

## RESUMO

Resumo do Trabalho Final apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

### BIOFILMES BACTERIANOS COMO INDICADORES DOS EFEITOS DO USO DO SOLO SOBRE OS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS NA REGIÃO DE CACONDE

Por

Solange Aceto dos Santos

Fevereiro 2017

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. Pedro

As atividades antropogênicas e ocupação do solo mudam drasticamente a paisagem, modificando a integridade dos ecossistemas hídricos. As bactérias podem nos dar um diagnóstico da saúde desses corpos hídricos e executam um papel chave no que tange a determinar o destino do nitrogênio nesses ecossistemas. Em torno do reservatório de Caconde administrado pela AES Tietê, no estado de São Paulo, analisamos em 31 pontos de amostragem se a diversidade de bactérias e os diferentes usos do solo nas APPs e nas bacias de drenagem em diferentes faixas influenciaram a diversidade ou composição dessas comunidades e de algum modo estão associadas com a saúde desses corpos hídricos. Através do sequenciamento da Nova Geração identificamos as dez OTUs mais abundantes, na sua maioria pertencente às Proteobacterias. Concluímos que as áreas destinadas a atividades agropecuárias são bastante expressivas e que de maneira geral o impacto bacteriano é maior a distâncias menores que 2.000 metros do ponto de coleta com características de paisagem semelhantes. A correlação nitrato com a paisagem dominante, tanto no uso de solo “pasto” como no uso de solo “florestas” apresentou uma correlação com as APPs muito similar indicando uma relação deste ecossistema com o componente nitrato. Dentre as Proteobacterias identificadas destacam-se os gêneros *Pelomonas*, *Rhodoferrax* e *Ideonella* e a *Dechloromonas*, cuja literatura mostra que a associação entre elas ajuda o processo de desnitrificação por participarem na atenuação ou remoção completa dos poluentes em corpos hídricos. Sendo assim, estes gêneros poderiam ser melhor

estudados para potencialmente serem usados como bioindicadores da saúde hídrica que associados a projetos para a conservação e ou restauração das APPs podem contemplar a preservação e melhoria da água quanto à sua quantidade e sua qualidade, como forma mais adequada de gestão dos recursos hídricos na região de Caconde.

**Palavras-chave:** Uso do solo. APPs. Composições da paisagem. Configurações da paisagem. Bioindicadores da qualidade da água. SIG. Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Índices de biodiversidade.

## ABSTRACT

Abstract do Trabalho Final apresentado ao Programa de Mestrado Profissional em Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

### BACTERIAL BIOFILMS AS INDICATORS OF EFFECTS OF SOIL USE ON AQUATIC ECOSYSTEMS IN THE REGION OF CACONDE

By

Solange Aceto dos Santos

February 2017

Advisor: Prof. Dr. Pedro M. Pedro

Anthropogenic activities and land occupation drastically change the landscape, modifying the integrity of water ecosystems. Bacteria can give us a diagnosis of the health of these water bodies and play a key role in determining the fate of nitrogen in these ecosystems. Around the Caconde reservoir managed by AES Tietê, in the state of São Paulo, we analyzed at 31 sampling points whether the diversity of bacteria and the different soil uses in Areas of Permanent Preservation (APPs) and drainage basins in different ranges influenced the diversity or composition of these communities and are somehow associated with the health of these water bodies. Through the sequencing of the New Generation we identified the ten most abundant OTUs, most of them belonging to Proteobacteria. We conclude that the areas destined to agricultural activities are quite expressive and that in general the bacterial impact is greater at distances less than 2,000 meters from the point of collection with similar landscape characteristics. The nitrate correlation with the dominant landscape, both in the use of "pasture" soil and in the use of "forest" soil, showed a very similar correlation with APPs indicating a relation of this ecosystem with the nitrate component. Among the identified Proteobacteria, the genus *Pelomonas*, *Rhodoferrax* and *Ideonella* and *Dechloromonas* are highlighted, whose literature shows that the association between them helps the denitrification process by participating in the attenuation or complete removal of the pollutants in water bodies. Thus, these genera could be better studied to potentially be used as bioindicators of water health that associated to projects for the conservation and / or restoration of APPs



can contemplate the preservation and improvement of water in terms of quantity and quality as a more management of water resources in the Caconde region.

**Keywords:** Land use. APPs. Landscape Compositions. Landscape configuration. Bioindicators of water quality. GIS. New Generation Sequencing (NGS). Biodiversity indexes.

# CAPÍTULO I

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS

Um ecossistema aquático é qualquer ambiente baseado na água, no qual plantas e animais interagem química e fisicamente com o próprio ambiente. Os ecossistemas aquáticos são de fundamental importância para as mais diversas formas de vida e são divididos em ecossistema de água marinha e ecossistema de água doce.

Muitos resíduos estão sendo lançados nesses ambientes por ações antropogênicas provocando impactos negativos e esse processo se intensificou principalmente após a Revolução Industrial. Essas ações causam alterações significativas, e muitas vezes irreversíveis nos ecossistemas aquáticos, entre as quais se destacam: efeitos físicos, mudanças bióticas e mudanças ecológicas (BRENDOGAN, 2003).

### 2. DISTRIBUIÇÃO E SAÚDE DA ÁGUA DOCE

Para a manutenção e qualidade de vida em nosso planeta é indiscutível a importância da água conforme publicação OPAS/OMS – Água e Saúde, Washington, D.C., 1998:

*“A água e a saúde da população são duas coisas inseparáveis. A disponibilidade da água de qualidade é condição indispensável para a própria vida e, mais do que qualquer outro fator, a qualidade da água condiciona a qualidade da vida”.*

A garantia da qualidade da água para o consumo humano é essencial para as políticas de saúde pública, pois a água doce é um bem escasso e finito, um recurso natural compartilhado por todos e que deve ser utilizado com racionalidade. Levando

em consideração que 97,5% de toda a água do planeta é salgada e que apenas 2,5% é doce, sendo que a maior parte desta está confinada em geleiras e calotas polares, somente nos resta 0,8% disponíveis superficialmente para consumo (TUNDISI, 2003).

Além da pouca água doce disponível, outro agravante para a atual crise da água é a relação população e consumo. Segundo Criado, a população mundial hoje é cerca de sete bilhões, um número três vezes maior do que em 1950. Enquanto a população mundial triplicou, o consumo de água sextuplicou, e as fontes de água potável diminuíram (CRIADO, 2012). Ademais, a projeção de aumento populacional para o ano de 2050 será de 9,6 bilhões de pessoas onde a demanda por produtos agrícolas e alimentares aumentará porque a população mundial é crescente (FAO, 2014).

Conforme levantamento estatístico da *Food and Agriculture Organization* (FAO), uma das agências da Organização das Nações Unidas (ONU): “no ano de 2025 1,8 bilhão de pessoas estarão vivendo em países com escassez hídrica absoluta e dois terços da população mundial estarão sob condições de estresse hídrico” (FAO, 2014).

Já o Brasil, onde o clima é tropical úmido, com maior descarga de água doce totalizando 13,8% da água disponível para consumo do planeta, tem sua distribuição hídrica de maneira irregular nas regiões brasileiras conforme segue: 68,5% estão na Região Norte do País, onde se encontra a Amazônia, e, 15,7%, no Centro-Oeste, onde está a maior parte do Cerrado e apenas 15,8% nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, onde a predominância da Mata Atlântica é maior (PROJETO CONSERVADOR DAS ÁGUAS, 2001).

Além da má distribuição da água entre os biomas brasileiros, inúmeros estressores, tais como a devastação ambiental como consequência da expansão agropecuária, o uso de contaminantes químicos e o uso indiscriminado da água potável, está afetando negativamente a estrutura e função dos ecossistemas hídricos, pois altera a proporção de componentes em suspensão e dissolvidos na água e suas características, resultando na proliferação de algas nocivas, das espécies invasoras, na contaminação e a redução dos mananciais (CRIADO, 2012).

Este quadro tem intensificado a necessidade de desenvolvermos um monitoramento ambiental eficaz e de baixo custo que vise avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos. Meyer (1991) definiu um ecossistema saudável como:

”sustentável e resiliente, mantendo a sua estrutura e função ecológica ao longo do tempo, continuando a atender as necessidades e expectativas da sociedade”. Ou seja, para ser saudável e sustentável, deve ser capaz de manter sua estrutura (organização) e função (vigor) ao longo do tempo apesar do estresse externo (resiliência) (COSTANZA, et al. 1999).

### **3. A IMPORTÂNCIA DAS ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE (APPs)**

Segundo a Lei 12.651 de 25 de maio de 2012, em seu inc. II, art. 3º encontramos a definição legal de Área de Preservação Permanente nos seguintes termos.

Art. 3º para os efeitos desta Lei entende-se por:

(...)

II - Área de Preservação Permanente - APP: área protegida, coberta ou não por vegetação nativa, com a **função ambiental de preservar os recursos hídricos**, a paisagem, a estabilidade geológica e a biodiversidade, facilitar o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas.

Segundo a WWF Brasil, as matas ciliares (APPs) são vegetações que margeiam os rios, os córregos e as nascentes tendo a função de proteger e evitar erosões, assoreamentos, desbarrancamentos, etc. O nome mata ciliar se deve ao fato da importância desta vegetação para a proteção dos rios e lagos como os cílios são para os nossos olhos.

Sendo assim, para garantir o equilíbrio hídrico e sedimentológico de uma bacia hidrográfica é necessária a manutenção da cobertura vegetal nas matas ciliares (APPs), pois isto contribuirá para o aumento da infiltração de água no solo, reduzindo o escoamento superficial e, conseqüentemente, os processos erosivos.

Ao diminuir e reter o fluxo superficial de água, a mata ciliar garantirá o abastecimento de água para os rios em períodos de estiagem, mantendo a perenidade dos mesmos, pois diminuirá o assoreamento dos corpos d'água e nascentes. Isso se dá, pois segundo estatísticas a taxa de infiltração em solo de mata ciliar pode ser de 10 a 15

vezes maior do que em solos com pastagem e 40 vezes maior que em solos expostos (CRIADO, 2012).

A cobertura vegetal tem um papel fundamental tanto no deflúvio superficial, como o deflúvio de base. A água, uma vez precipitada sobre o solo, pode seguir o deflúvio superficial, onde parte da chuva escoar pela superfície do solo, e seguir o deflúvio base para atingir o curso d'água. O deflúvio de base, constituído basicamente do escoamento subterrâneo, é o resultado da percolação da água no solo que se desloca em baixas velocidades e é o responsável pela alimentação de rios e lagos durante o período de estiagem. Além disso, a cobertura vegetal limita a possibilidade de erosão do solo, minimizando a poluição dos cursos de água por sedimentos.

Por outro lado, a remoção da cobertura vegetal provoca a redução do intervalo de tempo entre a queda da chuva e os efeitos nos cursos de água, diminui a capacidade de retenção de água nas bacias hidrográficas e conseqüentemente aumenta o pico das cheias (VIEIRA, 2013).

Cabe ressaltar que a erosão é um processo natural dentro do equilíbrio ambiental, mas quando esse processo passa a ser acelerado e intenso por conta de desastres naturais e principalmente por ações antrópicas dificultando a resiliência do ecossistema, surgem ravinas e voçorocas, assoreamento dos corpos d'água dentre outros.

Portanto, a cobertura vegetal exerce um papel de defesa contra os agentes erosivos, a diminuição da carga de sedimentos carregada para o leito do rio, o aumento na infiltração das águas pluviais e conseqüentemente dos lençóis freáticos e aquíferos que é controlada pela atuação do sistema radicular da mata ciliar (CRIADO, 2012).

### **3.1. Funções Hidrológicas das APPs**

As funções hidrológicas das matas ciliares estão ligadas à sua influência sobre uma série de fatores importantes para a manutenção de uma bacia. Podemos classificar as funções hidrológicas que as APPs hídricas desempenham através dos seguintes processos principais:

## **Deflúvio direto e de base**

O deflúvio direto é o volume de água que causa o aumento rápido da vazão de microbacias durante e imediatamente após a ocorrência de uma chuva. O deflúvio base é constituído basicamente do escoamento subterrâneo, ou seja, é o resultado da percolação da água no solo que se desloca em baixas velocidades responsável pela alimentação de rios e lagos durante o período de estiagem.

## **Quantidade e Qualidade da água**

A conservação da vegetação ciliar aumenta a capacidade de armazenamento da água na microbacia ao longo da zona ripária, o que contribui para o aumento da vazão na estação seca do ano.

Segundo Lima (2010), o sistema radicular da vegetação ciliar que estrutura as camadas superficiais do solo, semelhante a uma tela ou manta protetora, permite a estabilidade das margens dos cursos d'água, pois forma uma malha densa de raízes fornecendo para as camadas superiores uma resistência significativa contra as enxurradas. Esse sistema radicular juntamente com a serapilheira (acúmulo de matéria orgânica sobre o solo) funciona como uma esponja por absorver parte da água do escoamento superficial, reduzindo assim as enxurradas.

A presença da mata ciliar beneficia diretamente a qualidade da água, pois ela exerce uma função tampão (KUNTSCHIK et al., 2011) por filtrar a água proveniente das áreas adjacentes que escoam para dentro dos cursos d'água retendo uma grande quantidade de sedimentos, produtos tóxicos como herbicidas, e nutrientes, tais como o fósforo (P) e o nitrogênio (N), que em excesso provocam o crescimento de algas e plantas aquáticas de maneira exagerada acarretando um total desequilíbrio ambiental. Isto está de acordo com o estudo de Muscutt et al. (1993) que constatou que a eficácia da retenção de sedimentos e nutrientes tais como o nitrogênio (N) e o fósforo (P) pelas matas ciliares variam de acordo com seguintes mecanismos: (1) infiltração que reduz o

escoamento superficial; (2) redução das velocidades de fluxo superficial devido ao aumento da rugosidade da mata; (3) o efeito físico de filtração da vegetação densa.

Donadio et al. (2005) ao analisar como as características e diferentes usos do solo influenciam na qualidade da água das microbacias entre duas nascentes com vegetação natural e duas com predominância de atividades agrícolas, constatou que as variáveis cor, turbidez, alcalinidade e nitrogênio total foram as que apresentaram maior importância relativa para demonstrar que a qualidade da água é melhor nas nascentes com vegetação nativa, indicando que a vegetação natural atua como mecanismo eficiente na preservação da qualidade da água.

Primavesi et al. (2002) avaliou a qualidade da água entre microbacias com mata ciliar e com uso de solo em atividades agropecuárias, cujos resultados apontaram valores maiores de fósforo, turbidez, condutividade elétrica e cor em microbacias com atividades de pecuárias.

As matas conseguem reter cerca de 80% do fósforo e 89% do nitrogênio oriundos do escoamento superficial das áreas adjacentes dependendo do tipo, desenvolvimento e largura da faixa da mata ciliar, do tipo de solo, relevo, regime pluviométrico entre outros, influenciando de maneira determinante nas características físicas, químicas e biológicas dos corpos d'água (LIMA, 2010).

Dessa forma, ao atravessar a zona da mata ciliar, tais nutrientes podem ser eficazmente retidos por absorção pelo sistema radicular da vegetação influenciando significativamente na qualidade da água nos corpos hídricos.

O efeito de filtragem de particulados e de nutrientes em solução, proporcionado pela mata ciliar, confere significativa estabilidade em termos do processo de ciclagem geoquímica de nutrientes pela microbacia.

## **Interação direta com o ecossistema aquático**

Existe uma interação funcional permanente entre a vegetação ciliar, os processos geomórficos e hidráulicos do canal e a biota aquática. Essa interação decorre de três maneiras: Primeiro, a estabilização das margens pelo sistema radicular da vegetação

ciliar. Segundo: o abastecimento contínuo de matéria orgânica para cumprir sua função como fonte nutricional para a biota aquática através da serapilheira fornecida pela mata ciliar. Terceiro: a atenuação da radiação solar proporcionada pela mata ciliar, favorecendo o equilíbrio térmico da água e influenciando positivamente a produção primária do ecossistema lótico (LIMA, 2008).

## **Estabilidade térmica da água**

Ao fornecer sombra, a vegetação ciliar previne a elevação da temperatura da água, mantendo assim mais alta a quantidade de oxigênio e conseqüentemente auxiliando a qualidade dos corpos hídricos.

Além dessas funções hidrológicas, as matas ciliares (APPs) cumprem o papel de corredores ecológicos, pois, ao interligarem os fragmentos florestais na região, facilitando assim o trânsito de diversas espécies de animais, polens e sementes, favorecem o crescimento das populações de espécies nativas, as trocas gênicas e, conseqüentemente, a reprodução e a sobrevivência dessas espécies (Primack & Rodrigues 2001).

## **4. PARÂMETROS CONVENCIONAIS PARA ANÁLISE DA ÁGUA E SUAS LIMITAÇÕES**

Com o objetivo de definir estratégias de restauração e conservação dos recursos hídricos, métricas foram formalizadas para quantificar esses efeitos estressores e monitorar os ecossistemas aquáticos, tais como métricas físicas, químicas, biológicas e integradas (ROLEY et al., 2014), levando em consideração a escala temporal e espacial, a frequência da amostragem e a localização (PROIA, 2012).

Essas métricas mensuram os efeitos causados pelo que a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) define como “Impacto Ambiental” em seu artigo 1º: “qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio



ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas [...]” (BRASIL, 1986).

Mas toda métrica tem suas limitações, por exemplo, no Brasil a ANA (Agência Nacional de Águas), relata o seguinte a respeito de seu IQA (Índice da Qualidade da Água) “A avaliação da qualidade da água obtida pelo IQA apresenta limitações, já que este índice não analisa vários parâmetros importantes para o abastecimento público, tais como substâncias tóxicas (ex: metais pesados, pesticidas, compostos orgânicos), protozoários patogênicos e substâncias que interferem nas propriedades organolépticas da água.”

Os parâmetros biológicos se tornaram mais populares e sofisticados nos últimos 30 anos, principalmente quanto à identificação de invertebrados. Mas para obter melhor resultado a identificação é em nível de espécie, e o processo acaba se tornando muito caro e demorado, pois exige pessoal especializado. Além disso, para uma melhor exatidão das métricas de peixe, por exemplo, é necessário aumentar a área de pesquisa, o que pode tornar-se inviável visto que põe limitações práticas quanto a equipamentos e mão de obra, colocando novamente em questão o custo.

Outra desvantagem dos parâmetros convencionais é que a amostragem pontual pode não refletir com precisão a saúde do ecossistema em estudo, tal como condições físicas e químicas subjacentes na área pesquisada, como por exemplo, o uso de pesticidas numa área agrícola próxima ao corpo hídrico em estudo um dia antes da coleta (ROLEY et al. 2014). Portanto, é fundamental usarmos uma técnica capaz de determinar tais lapsos de tempo o suficiente para caracterizar com precisão a saúde do corpo hídrico, tal como o uso de biofilmes bentônicos.

## **5. BIOFILMES BENTÔNICOS**

Os biofilmes são micro ecossistemas de comunidades microbianas estruturadas de organismos autotróficos (diatomáceas, algas e cianobactérias verdes) e heterotróficos (bactérias, fungos, protozoários) incorporados numa matriz polimérica interagindo de maneira complexa. São componentes de suma importância para a captação,

armazenamento e ciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo bem como são transdutores de energia e de matéria orgânica a níveis tróficos mais elevados (PROIA, 2012).

Essas estruturas microbianas são diretamente influenciadas por fatores físicos, tais como temperatura, penetração de luminosidade e fluxo da água, e fatores químicos, como pH e disponibilidade de nutrientes. (SABATER, 2007). Logo, o grau de agregação do biofilme está diretamente relacionado à quantidade de nutrientes disponíveis no sistema aquático para que haja a replicação celular, já em ambientes extremamente oligotróficos somente os organismos mais resistentes sobrevivem.

As comunidades dos biofilmes sustentam o bom funcionamento do ecossistema por contribuir para o mecanismo de absorção de nutrientes orgânicos e inorgânicos, e retenção (herbicidas e metais pesados entre outros), que leva à autodepuração, ou seja, estende-se a processos de purificação de água. Portanto, por interagir rapidamente com essas substâncias dissolvidas por conta de seu pequeno tamanho, rápido crescimento, alta riqueza de espécies e grande variedade fisiológica, os organismos formados nos biofilmes podem ser utilizados como bioindicadores de um ecossistema degradado bem como bons indicadores de alerta precoce (PROIA, 2012).

## **6. BACTÉRIAS COMO BIOINDICADORAS**

Entre as comunidades microbianas que podem ser usadas como bioindicadoras estão as bactérias oxidantes de amônia que fazem parte do processo de nitrificação que é a oxidação da amônia a nitrito e nitrito a nitrato, exercendo um papel de extrema importância para o equilíbrio do ecossistema, pois elevadas concentrações de N podem causar eutrofização nos corpos hídricos (GOUVEIA, 2013).

Outras características que fazem das bactérias ótimas bioindicadoras é o fato de elas serem ubíquas, ou seja, estão presentes em todo lugar dentro dos corpos hídricos, seja na água ou nos sedimentos e respondem rapidamente às mudanças ambientais devido ao seu rápido ciclo de vida (CHAPMAN, 1996).

Os avanços recentes em técnicas de sequenciamento do marcador molecular 16S rRNA, um gene universal que permite construir um esboço da árvore filogenética de bactérias baseada nas suas relações genotípicas (YOUNG, 1992), cuja similaridade

entre as sequências indica uma origem comum de genes correspondentes (VARUZZA, L., 2013), nos proporcionam um quadro detalhado da estrutura das comunidades bacterianas em ecossistemas hídricos complexos, possibilitando detectar possíveis mudanças ambientais (MUYZER & SMALLA, 1998).

## 7. AVANÇOS NO BIOMONITORAMENTO

Biomonitoramento pode ser definido como a avaliação das mudanças ocorridas no ambiente, principalmente por ações antropogênicas, através do uso sistemático de organismos vivos (MATTHEWS et al., 1982), que por sua vez, fazem o papel de bioindicadores por sua sensibilidade, tolerância ou resistência a vários parâmetros.

No decorrer de décadas foram desenvolvidas várias metodologias de avaliação com diversos organismos, desde bactérias, fungos e protozoários a peixes, macrófitas aquáticas e macroinvertebrados, sendo este último o mais amplamente utilizado em vários países.

Dentre essas metodologias destacam-se o sistema saprótico desenvolvido por Kolkwitz & Marsson (1909), em que a avaliação se concentra na abundância dos organismos resistentes no ambiente. No entanto, esses mesmos organismos são encontrados em grandes quantidades também em sistemas íntegros, de modo que se passou a considerar a abundância dos organismos sensíveis à poluição o método mais eficiente para a avaliação ambiental.

Vários índices bióticos surgiram e foram testados tendo em destaque o *Biological Monitoring Working Party score system* (BMWP) criado na Grã-Bretanha em 1976 e posteriormente revisado, que considera os macroinvertebrados identificados ao nível taxonômico de família, atribuindo valores baseados em sua sensibilidade aos poluentes.

Modelos preventivos também foram criados, tais como RIVPACS (*River Invertebrate Prediction And Classification System*) e AusRivAS (*Australian Rivers Assessment System*) que são sistemas de previsão utilizados para avaliar a saúde biológica dos sistemas hídricos. Esses modelos avaliam as variáveis ambientais

associadas às comunidades esperadas, ou seja, prevem o que pode acontecer com a fauna de macroinvertebrados aquáticos em um local na ausência de estresse ambiental.

Além dessas abordagens quantitativas passou-se a dar ênfase em abordagens qualitativas através de protocolos de avaliação rápida da qualidade da água, PAR (*Rapid Assessment Approaches*) em que uma ou mais medidas bioindicadoras podem ser utilizadas tendo como referência um local com excelente qualidade ambiental (BUSS et al., 2003).

No entanto a aplicabilidade de qualquer desses métodos implica num enorme esforço de coleta e análise em grande escala além de ser monetariamente inviável. Assim a precisão métrica deve ser pesada contra as restrições orçamentais, e o campo emergente da metagenômica vem ao encontro para resolver esse *trade-off* entre a precisão e o custo. Com a tecnologia avançada, atualmente o uso de sequenciamento de DNA de nova geração vem sendo largamente usado por suprir essas necessidades de maneira rápida e mais econômica.

## 8. GERAÇÕES DE SEQUENCIADORES

Os sequenciadores de DNA (ácido desoxirribonucléico) foram uma grande revolução no campo da genética. São equipamentos que fazem a leitura de amostras de DNA e geram arquivos eletrônicos representando as bases nitrogenadas (A, C, G, T) da amostra. A primeira geração de sequenciadores começa com a determinação de cadeia de Sanger em 1977 seguido pelo lançamento do primeiro sequenciador automático (ABI 370) em 1996 e o sequenciador de eletroforese capilar (ABI 3700) em 1988.

Em 2005 surgiu a próxima geração NGS (*Next-Generation Sequencing*) com o sequenciador em síntese que aumentou cerca de cem vezes mais o resultado obtido pelo método de Sanger com o objetivo de acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento (VARUZZA, L. 2013). Dentre os novos métodos estão as plataformas 454 da *Life Science*, *Illumina* e *SOLiD* da *Applied Biosystems* (DE SOUSA, 2009)

A terceira geração aparece com um novo método de decodificação do DNA que não exige amplificação e fornecendo maior precisão dos dados, a nova tecnologia *Single Molecule Real Time* (SMRT) com as plataformas *Ion Torrent* (PGM) iniciando a era

dos sequenciadores pós-luz por usar um semicondutor com sistema de detecção de base (PINHEIRO, 2015).

Conforme previsão do NHG (*National Human Genome*), as plataformas de sequenciamento de nova geração são uma alternativa poderosa para estudos de genômica estrutural e funcional com previsão de um aumento dinâmico na natureza dos dados de sequências geradas e dos custos associados para os próximos anos.

Para além da utilização dos avanços da tecnologia em sequenciar comunidades bacterianas de biofilmes para biomonitoramento, conjugar a análise de escalas do uso e ocupação do solo fornece parâmetros de como esses microorganismos estão sendo influenciados por alterações na paisagem da bacia que drena os rios e córregos.

## **8. PAISAGENS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA**

### **8.1. Estrutura da Paisagem**

Turner & Gardner (1989) definem paisagem como uma área espacialmente heterogênea cujas características devem ser consideradas: estrutura, função e alterações.

- Estrutura: a estrutura da paisagem é composta pelos elementos: fragmento, matriz e corredor. Deve ser caracterizada e ter seus padrões definidos com base na sua configuração (distribuição física ou caracterização dos elementos na paisagem levando em consideração a localização, o grau de isolamento e sua vizinhança) e composição (presença ou ausência dos elementos na paisagem considerando a variedade e abundância).
- Função: toda interação entre os elementos espaciais, ou seja, os fluxos de energia, materiais e organismos que compõem os ecossistemas.
- Alterações: toda alteração na estrutura da paisagem e na função do mosaico ecológico em função do tempo.

Logo, quantificar a estrutura da paisagem está diretamente relacionado ao estudo da função e das alterações da mesma (MCGARIGAL & MARKS, 1995; VALENTE R.

D. O. A., 2001). Portanto, avaliar as mudanças na estrutura da paisagem, que na maioria das vezes é antropogênica, nos fornece informações importantes ao planejamento, à conservação e à preservação da qualidade da água em torno desses ecossistemas (LANG et al., 2009).

## **9. SOLO E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A QUALIDADE DA ÁGUA**

### **9.1. Infiltração**

O tipo de solo, além de influenciar o armazenamento de águas subterrâneas, regime de nascentes e cursos d'água, pode alterar significativamente a qualidade e quantidade de água nesses ecossistemas. Visto que o solo funciona como um reservatório dinâmico de água cuja infiltração afeta de maneira direta os corpos hídricos, a identificação do tipo de solo deve ser analisada como corpos tridimensionais juntamente com sua profundidade e relevo (MENEZES et al., 2009).

O processo de infiltração depende de diversos fatores, tais como: porosidade, umidade, atividade biológica, cobertura vegetal, rugosidade superficial e declividade do terreno, dentre outras (SOBRINHO et al., 2003).

Segundo Lepsch (2016), a retenção de água no solo depende de sua textura e estrutura:

- Textura: é definida pela distribuição das partículas (REINERT & REICHERT, 2006), ou seja, depende do tipo de solo para retenção de água. Por exemplo, solos argilosos ricos em húmus retêm maior teor de água que os arenosos com menos húmus, de modo que, dependendo do tipo de solo, maior ou menor será a capacidade de retenção de água;
- Estrutura: é definida pelo arranjo das partículas (poros pequenos, médios e grandes) em agregados do solo. Ou seja, o tipo de agregado presente num solo determina o tipo de estrutura do solo (REINERT & REICHERT, 2006).

## **9.2. Declividade**

Diversos fatores podem influenciar a qualidade da água nas bacias hidrográficas, tais como o clima, a cobertura vegetal, geologia, uso e manejo do solo e a topografia, tais como a declividade (VAZHEMIN, 1972; PEREIRA, 1997).

A declividade está fortemente relacionada com a erosão, que é a forma mais prejudicial de degradação do solo. Quanto maior a declividade maior a erosão hídrica e conseqüentemente maiores as perdas de solo por que aumentam o volume e velocidade da enxurrada. Esse processo aumenta o transporte de partículas de solo provocando assoreamento dos corpos hídricos e afetando a qualidade e quantidade de água desses ecossistemas (ANTUNES & PÉRICLES, 1969).

## **9.3. Composição e Uso de Solo**

O uso do solo pode ser definido como atividades antrópicas relacionadas diretamente com a terra (IBGE, 2013), de modo que o levantamento do uso e ocupação do solo para analisar os efeitos que sua utilização desordenada tem causado ao meio ambiente é de suma importância.

As atividades e ocupação do solo mudam drasticamente a paisagem, modificando a integridade dos ecossistemas hídricos, o habitat local e a diversidade biológica que neles habitam (DOLEDEC et al., 2011), sendo assim, os padrões de uso do solo influenciam os processos fundamentais das bacias hidrográficas em escalas temporais e espaciais (ALLAN, 2004).

Cada vez mais investigadores reconhecem a necessidade de estabelecer relações entre o uso do solo e indicadores de saúde nos sistemas hídricos (ALLAN, 2004; TOWNSEND et al. 2003). Portanto, torna-se necessário avaliar as tendências desses fluxos por estabelecer como os impactos do uso de solo gerados se relacionam com a composição das comunidades dos córregos e os fatores físicos medidos em escala de paisagem (ALLAN, 2004; DOLEDEC, et al., 2011), servindo como ferramenta importante na orientação de tomada de decisões (IBGE, 2013).

## 10. JUSTIFICATIVA

Muitos poluentes estão sendo lançados nos sistemas hídricos por ações antropogênicas provocando impactos negativos. Estas ações causam alterações significativas e muitas vezes irreversíveis nos ecossistemas aquáticos, entre as quais podemos destacar: efeitos físicos, mudanças bióticas e mudanças ecológicas (BRENDOLAN, 2003).

Direta ou indiretamente, as propriedades dos ecossistemas hídricos são alteradas pelo uso do solo, como agricultura, agropecuária, urbanização entre outros, aumentando concentrações de nutrientes que podem ser intoleráveis para muitas espécies aquáticas e principalmente pondo em risco a saúde humana.

A tecnologia atual para o monitoramento da qualidade da água é baseada em métodos de amostragem e de frequentes culturas em laboratórios que são demoradas e não permitem um processo de tomada de decisão rápida, de modo que devemos buscar uma metodologia eficaz e eficiente, capaz de nos dar informações a respeito de como as comunidades microbianas podem responder a essas alterações nas propriedades de fluxo do ecossistema. A aplicação do biomonitoramento como a utilização de métodos baseados em PCR e sequenciamento de DNA são estratégias que contribuem para a redução de custos, o aumento da eficiência de análise e a simplificação dos resultados.

Usando como referência os recentes avanços em tecnologias de *Next-Generation Sequencing* (NGS) e iniciativas moleculares de identificação de biodiversidade em larga escala, tais como a *Tree of Life*, a *Encyclopedia of Life* e o *Barcode of Life*, este projeto visa coletar dados que servirão para avaliar as consequências de ações antropogênicas e como biocontrole usando estratégias mitigadoras de futuros impactos na região estudada. Essa tecnologia também possibilita desenvolver uma metodologia de análise de qualidade de água por identificar a biodiversidade de bactérias bentônicas de água saudável e adulterada, com e sem APPs, baseados nos resultados do NGS.

Até o momento existem poucos estudos sobre como as comunidades bacterianas, em especial as bactérias oxidantes de amônia que fazem parte do processo de nitrificação, exercem um papel de extrema importância para o equilíbrio do ecossistema, pois elevadas concentrações de N podem causar eutrofização nos corpos hídricos (GOUVEIA, 2013). Portanto, as bactérias podem nos dar um diagnóstico da



saúde da água doce, o que justifica usarmos esses microrganismos como descritores sensíveis da condição ecológica desse ecossistema hídrico por identificar como o uso de solo e o grau das ações antrópicas estão afetando essas comunidades.

## **11. OBJETIVOS**

### **11.1. Objetivo Geral**

Comparar a comunidade bacteriana entre bacias hidrográficas com diferentes composições e configurações de paisagem, e avaliar o uso desses microrganismos como bioindicadores da qualidade da água nas bacias em torno da Represa de Caconde.

### **11.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a diversidade das comunidades bacterianas;
- Testar o impacto de diferentes coberturas de solo (e.g. agricultura, floresta, pasto, eucalipto, urbana, rios e lagos) na composição do biofilme bentônico usando “armadilhas” de baixo custo.
- Desenvolver uma metodologia de avaliação da qualidade de água utilizando *Next-Generation Sequencing* (NGS).

## CAPÍTULO II

### BIOFILMES BACTERIANOS COMO INDICADORES DOS EFEITOS DO USO DO SOLO SOBRE OS ECOSISTEMAS AQUÁTICOS NA REGIÃO DE CACONDE

#### 12. INTRODUÇÃO

A necessidade de produzir alimentos em grande escala tem impulsionado a substituição de mata nativa por terras cultiváveis, pastagens e plantações acompanhadas pelo aumento de consumo de água e uso de fertilizantes (ANDRIETTI et al., 2016; FOLEY et al., 2005; JOHANNSEN et al., 2010). Como consequências, além da degradação da qualidade da água pela descarga de muitos poluentes nos sistemas hídricos, a conversão da terra gera outras consequências, tais como a degradação da qualidade dos solos, cujas mudanças físicas alteram o fluxo dos corpos hídricos, a perda da biodiversidade, provocando assim impactos negativos e alterações significativas muitas vezes irrecuperáveis (FOLEY et al., 2005; EIDT et al., 2016; BRENDOLAN, 2003; HOLLAND et al., 2004).

A qualidade da água é degradada pelo uso intensivo do solo, e dentre as classes de uso do solo, a agricultura é a maior responsável pelo aumento da carga de sedimentos e do processo de erosão, lixiviando nutrientes e químicos agrícolas, principalmente nitrogênio e fósforo para os corpos hídricos (FOLEY et al., 2005; CARPENTER et al., 1998). Segundo o Relatório da WWF de 2011 com o tema “Florestas Vivas – as florestas e o clima”, até 2020 cerca de 55,5 milhões de hectares de ecossistemas naturais serão convertidos para a agricultura aumentando a eutrofização, com consequente degradação da qualidade da água juntamente com a extinção de espécies, ressaltando a importância de monitorar a degradação dos ecossistemas aquáticos devido às atividades humanas nas bacias hidrográficas.

A eutrofização provoca o esgotamento de oxigênio por aumentar a proliferação de cianobactérias, inclusive as tóxicas, contribuindo para a extinção de espécies e a produção de doenças (FOLEY et al., 2005). Conforme a cobertura da mata ciliar é eliminada, há um aumento na radiação e conseqüentemente na temperatura da água, alterando seus processos físico-químicos que juntos podem eliminar a produção

primária e alterar a estrutura das comunidades aquáticas (MENEZES et al., 2016). A junção desses fatores pode eliminar as espécies sensíveis enquanto as mais resistentes podem persistir causando uma mudança na composição das comunidades (BURGOS-CARABALLO et al., 2014).

Visto que mudanças na paisagem modificam a integridade dos ecossistemas hídricos, o habitat local e a diversidade biológica que neles habitam (DOLEDEC et al., 2011), podemos afirmar que os padrões de uso de solo influenciam nos processos fundamentais das bacias hidrográficas em escalas temporais e espaciais (ALLAN, 2004). Cada vez mais investigadores reconhecem a necessidade de estabelecer relações entre o uso do solo e indicadores de saúde nos sistemas hídricos (ALLAN, 2004; TOWNSEND et al., 2003). Portanto, torna-se necessário avaliar as tendências desses fluxos por estabelecer como os impactos do uso de solo gerados se relacionam com a composição das comunidades dos córregos e os fatores físicos medidos em escala de paisagem (ALLAN, 2004; DOLEDEC, et al., 2011).

Determinar a saúde geral dos rios envolve uma avaliação integrada das condições da qualidade da água, tais como índices químicos, físicos e biológicos. Os indicadores biológicos oferecem importantes vantagens por representarem condições ambientais ao longo de períodos de tempo, ao passo que os atributos físicos e químicos refletem apenas condições pontuais (CALLISTO et al., 2005; MORENO, et al., 2005).

Muitos estudos centram-se na identificação e quantificação de macroinvertebrados para biomonitorar os efeitos antropogênicos nas bacias hidrográficas (MENDES, 2016). No entanto, como a identificação é em nível de espécie, o processo acaba se tornando muito caro e demorado, pois exige pessoal especializado. Além disso, em áreas assoreadas por causa da erosão a utilização desses macroinvertebrados como fonte de informação sobre a qualidade de água se torna difícil, pois os sedimentos resultantes do processo de erosão impedem a formação de nichos ecológicos adequados para o desenvolvimento da diversidade dos mesmos (CALLISTO, et. al., 2005). Sendo assim, é fundamental usarmos uma técnica capaz de determinar tais lapsos de tempo o suficiente para caracterizar com precisão a saúde do corpo hídrico com menor custo.

Portanto, propomos a aplicação de um biomonitoramento utilizando biofilmes bacterianos que contribuem substancialmente para os processos biogeoquímicos

(BESEMER, 2015), pois são componentes de suma importância para a captação, armazenamento e ciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo bem como são transdutores de energia e de matéria orgânica a maiores níveis tróficos (PROIA, 2012).

Os biofilmes devem ser vistos como paisagens microbianas que são partes interconectadas da paisagem maior que elas colonizam. Segundo Battin et al. (2007), “um biofilme em um fluxo é um sistema, mas este sistema também interage com a paisagem circundante que é formada pelo leito e pela bacia”, de maneira que esses microorganismos associados com biofilmes de corpos hídricos podem responder rapidamente às condições ambientais ao redor (LEAR, et al., 2012).

Pesquisas indicam os biofilmes bacterianos como bioindicadores confiáveis da qualidade de água e biomarcadores de alerta precoce de estresse (PROIA, 2012), pois esses microorganismos são ubíquos em seus ambientes naturais e desenvolveram estratégias eficazes por colonizar e crescer em superfícies disponíveis, tais como rochas e sedimentos (LI, et al., 2010; SIMÕES, et al., 2007; SZEWZYK. et al., 2000).

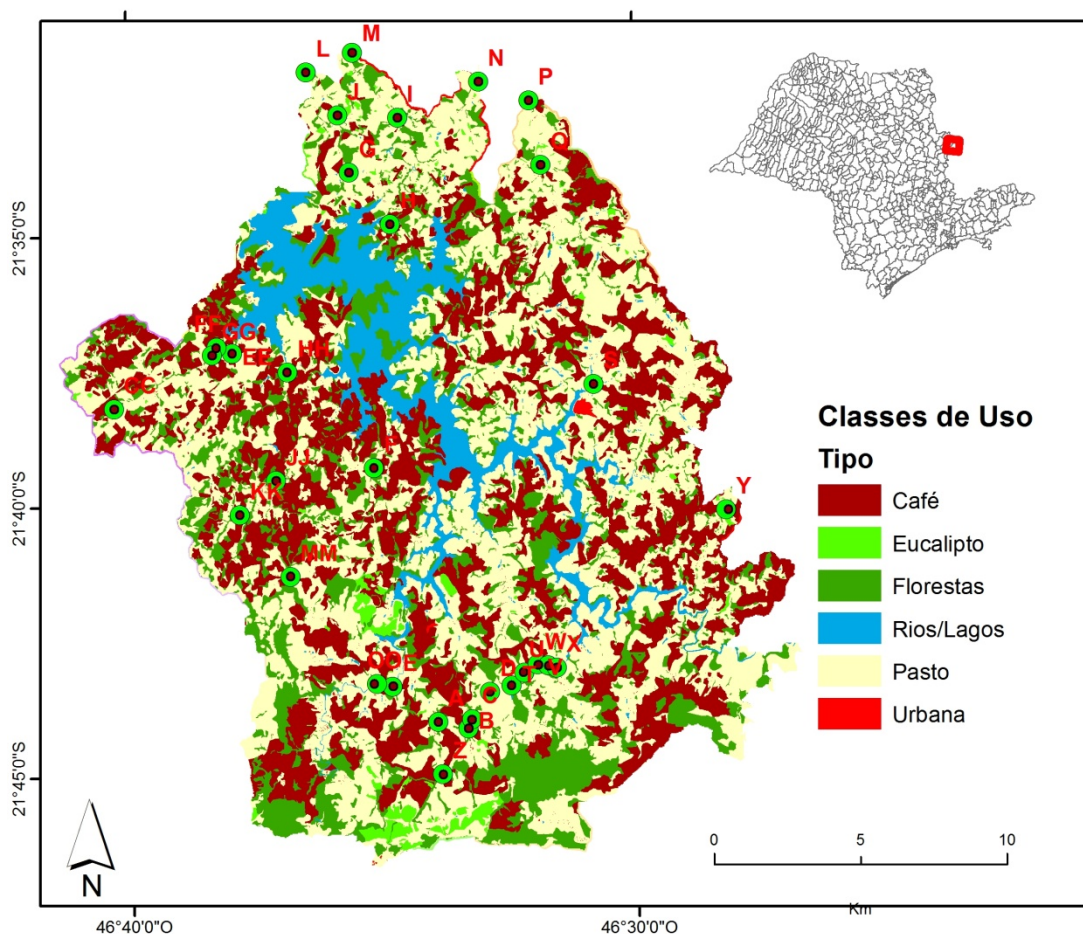
O objetivo deste estudo foi analisar a composição e diversidade da comunidade bacteriana em riachos tropicais e estabelecer sua relação com as diferentes composições e configurações das bacias e respectivas APPs que drenam esses corpos hídricos para avaliar a qualidade de água.

Pesquisas recentes demonstraram a eficiência das técnicas moleculares na melhoria das resoluções taxonômicas e na detecção da diversidade genética na biomonitorização dos rios (LI, et al., 2010; BURGOS-CARABALLO et al., 2014). Portanto, fizemos uso de sequenciamento metagenômico como estratégia que contribui para a redução de custos, o aumento da eficiência de análise e a simplificação dos resultados.

## 13. METODOLOGIA

### 13.1. Área de Estudo

A região de estudo está inserida na Bacia Hidrográfica do rio Pardo a nordeste do estado de São Paulo abrangendo parcialmente os municípios de Caconde, Botelhos, Divinolândia e Poços de Caldas em torno da Represa Caconde (Figura 1).



**Figura 1:** Mapa de uso de solo da região de Caconde com os 31 pontos amostrais.

#### 13.1.1. Caconde

O município de Caconde está situado na divisa com o Estado de Minas Gerais a nordeste do Estado de São Paulo. A cidade está situada numa latitude média de 860 metros com as coordenadas geográficas [21° 31' 44" S 46° 38' 38" O](#), localizado no

bioma da Mata Atlântica, com áreas de cerrado, reflorestamento e vegetação secundária, tendo uma temperatura média anual de 20°C.

Sua população estimada em 2015 era de 18.976 e sua área de unidade territorial é de 468.215 Km<sup>2</sup>, tendo como limites sete municípios: Botelhos, Cabo Verde, Divinolândia, Muzambinho, Poços de Caldas, Tapiratiba e São José do Rio Pardo. Está banhado pelos rios Bom Jesus, Pardo, São João e São Miguel.

A atividade econômica da região é predominantemente agropecuária, além do cultivo de café por pequenas e médias propriedades. Sua atividade industrial é pequena, centrada na área de confecção e atividades ligadas ao agronegócio.

Caconde é uma Estância Climática situada entre montanhas, margeada pelo Rio Pardo com alto potencial turístico por ser privilegiada pelo seu clima, pela rara beleza de suas paisagens e pelos seus atrativos naturais, como o lago de sua represa, rios e riachos com desníveis geográficos que proporcionam esportes de aventura, turismo ecológico e contemplativo.

### **13.1.2. Geomorfologia**

Geologicamente a cidade de Caconde está inserida no Planalto Atlântico na faixa orogênica com litologias de rochas cristalinas pré-cambrianas, cortadas por rochas intrusivas básicas e alcalinas mesozóico-terciárias (DIAS, 2010).

Por ser uma região de solos predominantemente argilosos e ligeiramente latossolos, há a formação de ambientes pedogênicos com a tendência a ocorrer ambientes redutores com a formação de cristais de goethita ( $\alpha$ -FeOOH) pertencente ao grupo de óxido de ferro (MORAES, 2008).

A goethita é encontrada na superfície dos horizontes do solo próximo ao material de origem, sendo assim, é o primeiro mineral a se formar no começo do processo pedogênico preferencialmente em ambientes onde as condições climáticas são úmidas, em solos com baixo pH e presença de matéria orgânica (SILVA, 2016).

O município de Poços de Caldas está situado no planalto elíptico com solos de características geológicas diversas, na sua maioria argilosos com poucas ocorrências de

arenitos, presença de jazidas de bauxita, argila refratária, minérios ferrosos, não ferrosos e radioativos, motivo pelo qual Poços de Caldas abriga várias empresas mineradoras de grande, médio e pequeno porte.

Segundo Setzer, a rocha predominante na região de estudo é a gnaisse com granulometria média e grossa de cores claras, alto teor de feldspato cinzento claro levemente róseo, baixo teor de quartzo e teor normal de biotita gerando um solo de baixa acidez e rico em cálcio, magnésio e potássio (SETZER, 1956).

### **13.1.3. Usina Graminha – Represa Caconde**

A construção da Usina Graminha no rio Pardo, sob a administração da AES Tietê, cujo nome atual é Represa Caconde, gerou um reservatório de cerca de 30 km<sup>2</sup> cercado pelas montanhas remanescentes do complexo da Mantiqueira (DE AMORIM, 2003).

### **13.1.4. AES Tietê**

Atuando desde 1999, a AES Tietê está entre as maiores companhias privadas de geração de energia elétrica do Brasil composta de nove usinas hidrelétricas (Água Vermelha, Bariri, Barra Bonita, Caconde, Euclides da Cunha, Ibitinga, Limoeiro, Nova Avanhandava, Promissão) e três pequenas centrais hidrelétricas (Mogi-Guaçu, São José, São Joaquim).

AES Tietê é responsável pela manutenção e preservação das áreas marginais ao redor dos reservatórios, as bordas, que incluem as áreas de preservação permanente (APPs) estabelecidas na nova lei florestal.

A empresa vem realizando vários projetos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) no que tange a gestão dos reservatórios, incluindo a restauração florestal que além dos benefícios ao ecossistema local e à regulação do clima, ajuda a conter os assoreamentos e aumentar a vida útil dos reservatórios.

## 13.2. Amostragem dos Biofilmes

Neste estudo, usamos biofilmes para avaliar a diversidade bacteriana de 31 riachos localizados da jusante à montante da represa de Caconde através do uso do solo no mês de agosto de 2014.

Como nossa área de pesquisa foi realizada no mês de menor precipitação do ano, portanto, com pouca água e numa área sem pedras, optamos por confeccionar *moore swabs* que ficaram submersos durante 30 dias nos rios e riachos com a finalidade de formarem um biofilme bacteriano para posterior análise. Usamos como material de aderência para os microorganismos *moore swabs* confeccionados com 20 cm de atadura de crepom, enrolada com isopor em uma das extremidades, atada a um tijolo na outra e colocadas nos 31 pontos em estudo.

Como parâmetros para a colocação dos *moore swabs* foram avaliados o nível não muito raso dos riachos, áreas com média irradiação solar e a acessibilidade dos riachos, principalmente sua proximidade das estradas.

Depois de incubados durante 30 dias, efetuamos a coleta retirando o isopor, de maneira que somente a parte do meio do *moore swab* fosse colocada em etanol absoluto em um tubo falcon estéril com capacidade máxima de 50 ml e enviado para laboratório.

## 13.3. Extração de DNA e PCR

Os tubos falcon de 50 ml contendo os esfregaços de *moore swab* e o etanol foram encaminhados ao laboratório e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante não mais de uma semana até a extração de DNA. Inicialmente, os componentes do biofilme foram deslocados fisicamente dos *moore swabs*, o tubo então foi agitado no agitador modelo Genie II durante 20 minutos. A mistura resultante (etanol e detritos) foi filtrada utilizando um crivo de 1 mm. O papel e o conteúdo filtrado foram macerados utilizando um agitador de lise modelo Savant FastPrep na velocidade máxima durante 20 segundos. O produto macerado foi então submetido à extração de DNA com o kit para solo Macherey-Nagel NucleoSpin seguindo as instruções do fabricante.

As reações de PCR foram realizadas utilizando iniciadores específicos de bactérias. As sequências iniciadoras para as reações de amplificação foram as seguintes:



- 27F\_454A 5'-CGT ATC GCCTCC CTC GCGCCA TCA GNNNNNNNNNAGA  
GTTTGATCMTGG CTC AG-3 'e
- 338R\_454B5'-CTA TGCGCCTTGCCAGCCCCGC TCA  
GGCTGCCTCCCGTAGGAG T-3'.

Os 454 iniciadores de fusão A e B estão sublinhados nos iniciadores direto e reverso. Os nucleotídeos codificadores de MID, cujo mecanismo permite ligar as informações do sistema de marcação às informações da sequência de interesse, foram indicados por Ns. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicatas e reunidas para minimizar a variabilidade do PCR.

Um controle negativo foi incluído sem adicionar qualquer modelo. Para cada um, uma reação de PCR de 25 µL foi realizada usando o sistema de PCR Promega's GoTaq (<https://www.promega.com.br/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-dna-polymerase-m300-protocol>).

As reações incluíram 1 µL de molde de DNA, 0,2 mM de iniciadores diretos e reversos, 1x tampão de PCR, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mistura de dNTP 0,1 mM e 1 unidade de polimerase Taq. As configurações do termociclador para a PCR inicial incluíram um passo de desnaturação de 10 minutos a 95 ° C seguido de 30 ciclos de 94 ° C durante 20 segundos, 50 ° C durante 30 segundos e 72 ° C durante 40 segundos. Foi então realizado um passo de alongamento a 72 ° C durante 7 minutos. A eficiência das reações e a ausência de contaminação nos controles negativos foram verificadas por electroforese dos produtos de PCR num gel de agarose a 1%, coloração com brometo de etídio.

As concentrações de Amplicon foram medidas usando um fluorímetro Qubit (Thermo Fisher Scientific) e as concentrações equimolares de cada amostra foram reunidas, purificadas utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemanha). Os produtos limpos foram sequenciados na direção 5'-3' numa placa 1/8 de uma máquina modelo 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX, marca Roche, utilizando as instalações Macrogen na Coreia do Sul.

## 13.4. Análise de Dados

### 13.4.1. Filtragem de qualidade

As sequências menores que 250 bases nitrogenadas (incluindo MID e *primers* iniciadores) foram removidas para posteriores análises. Em seguida, todos os MIDs perfeitos e os *primers* reversos foram demultiplexados correspondentes do conjunto de dados. Posteriormente, alinhamos todas as sequências usando o servidor Mafft (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). No alinhamento resultante, as colunas que contêm os iniciadores diretos e reversos foram removidas, e as sequências restantes passaram para o agrupamento OTU.

### 13.4.2. Out-clustering e atribuição

O programa USEARCH v. 8.1.1861 foi utilizado para identificar quimeras e leituras filtradas de qualidade dos *clusters* como no *pipeline* genérico sugerido pelo autor ([http://drive5.com/usearch/manual/upp\\_454.html](http://drive5.com/usearch/manual/upp_454.html)). Foi adotado um corte de similaridade de OTU de 97% para agrupar as leituras iniciais e as OTUs resultantes foram atribuídas a acetos bacterianos utilizando o banco de dados SILVA (<https://www.arb-silva.de>).

## 13.5. Parâmetros físico-químicos

Para as análises físico-químicas coletamos 500 ml de água em frascos plásticos para cada um dos 31 pontos de amostragem e efetuamos as medições utilizando um estojo portátil denominado Alfakit. Esse estojo é acompanhado por um manual de instruções, frascos, reagentes e outros materiais que determinam diversas variáveis físico-químicas com precisão tornando a metodologia uma ferramenta auxiliar na avaliação da qualidade da água (HERMES, 2004).

Os métodos usados através do Alfakit foram colorimetria, que é baseado na leitura da intensidade da cor com a finalidade de determinar a concentração do componente de interesse da amostra e volumetria, que faz a leitura através de titulação. Mensuramos os parâmetros conforme os valores de referência do Alfakit na Tabela 1.

**Tabela 1:** Valores de referência do Alfakit

PARÂMETROS	VALORES DE REFERÊNCIA	UNIDADES
Potencial hidrogeniônico	Entre 6,9 a 9,0	
Alcalinidade Total	Resolução de 4	mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>
Ferro	Entre 0,25-0,50-1,0-1,5-2,0-3,0-4,0-5,0	mg L <sup>-1</sup> Fe
Fosfato	Entre 0,0-0,75-1,0-1,5-1,75-2,0-2,5-3,0	mg L <sup>-1</sup> PO <sub>4</sub>
Nitrogênio Amoniacal	Entre 0,0-0,10-0,25-0,50-1,0-2,0-3,0	mg L <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub>
Nitrogênio Nitrato	Entre 0,10-0,30-0,50-0,70-1,0-2,5	mg L <sup>-1</sup> N-NO <sub>3</sub>
Nitrogênio Nitrito	Entre 0,01-0,03-0,05-0,10-0,20-0,30-0,50	mg L <sup>-1</sup> N-NO <sub>2</sub>
Sulfeto	Entre 0,01-0,03-0,05-0,10-0,20-0,30-0,50	mg L <sup>-1</sup> S <sup>2-</sup>

Fonte: Adaptada <http://www.alfakit.ind.br/kit-colorimetrico-agua-doce-e-solo-cod-2298/1/> acesso 16/12/16

### 13.6. Uso de Solo

Para determinar a relação entre o uso do solo e a qualidade da água, definimos 31 pontos de coletas, a partir dos quais o uso do solo foi mapeado e quantificado nas áreas a montante. Essas áreas foram divididas em duas categorias: a que englobava toda a área de contribuição à montante aos pontos de coleta e as que só consideravam as APPs. Para definir a escala de influência, essas duas categorias ainda foram divididas de acordo com a distância do ponto de coleta, de 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000 e 10.000 metros. Todo o processo seguiu as seguintes etapas:

#### Determinação dos Pontos de Coleta

Com o uso do sistema de posicionamento global (GPS), marcamos em campo as coordenadas de cada um dos 31 pontos de coleta que foram sobrepostos ao mapa da região em estudo para serem classificados, delineados e digitalizados usando as ferramentas do SIG.

#### Delimitação das Bacias Hidrográficas e das APPs

Um modelo digital de elevação, com 30 metros de resolução foi usado para extrair os atributos físicos de cada local de captação. Utilizamos os pontos de coleta

como referência juntamente com a direção de fluxo para delinear as bacias e sub-bacias de cada fluxo, extraíndo assim somente as áreas das bacias.

Com base na interpretação das imagens de alta resolução, a rede hidrográfica foi mapeada por digitalização, cobrindo as bacias estudadas. Para definir as áreas de Preservação Permanentes foram gerados *buffers* de 50 metros de raio em torno das nascentes, e ao longo das margens dos rios *buffers* de 30 metros conforme medidas estipuladas pela atual Legislação (Lei Florestal Nº 12.651 de 25 de maio de 2012, Capítulo II - Art. 4º).

### **Classificação do Uso do Solo e Criação das Faixas de Distâncias**

Imagens de satélite *WorldView-2* da região estudada, disponíveis na base de dados do ArcGIS, com 0,5 m de resolução de 2012 foram usadas para classificar os sete tipos principais de uso de solo: café, eucalipto, florestas, lagos, pasto e urbano através de interpretação visual dessas imagens.

Para verificar o efeito da escala espacial para cada ponto amostral foram criados os *buffers* com distâncias de 50, 100, 200, 500, 1000, 2.000, 5.000 e 10.000 metros para cada bacia individualmente.

## **14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

O conjunto de comandos em MOTHUR v.1.36.1 (Schloss, et al., 2009) foi utilizado para derivar estimativas de membros da comunidade e estrutura da comunidade. Este último foi expresso utilizando três índices: distância de Bray-Curtis, distância euclidiana e para uma comparação baseada em filogenia usando UNIFRAC.

A adesão à comunidade foi calculada usando comandos que geraram os índices Jaccard (*jclasscommand*) e Euclidean (*memeuclidean*), que resultam no índice de Jaccard e distâncias euclidianas entre duas comunidades, respectivamente.

As funções de escalonamento multidimensionais não métricas (NMDS) foram utilizadas para explorar as interações significativas entre as várias matrizes de distância

de diversidade beta e OTU individuais, bem como os parâmetros químicos medidos em cada ponto de coleta.

Em todas as estimativas MOTHUR da diversidade alfa e beta, a reamostragem foi utilizada para minimizar o impacto de tamanhos de amostras diferentes. A média dessas reamostragens foi utilizada em cálculos posteriores. Em todos os casos em que uma estatística foi derivada de comparações múltiplas, uma correção de Bonferroni foi aplicada aos valores de significância.

## **14.1. Índices da Diversidade Alfa**

Com o objetivo de entender melhor a relação das bactérias com o uso de solo, estimamos os seguintes índices de biodiversidade alfa: o índice de Shannon (H) e o índice de Simpson para medir a diversidade, o índice de Pielou (J) para medir a equabilidade (diversidade/riqueza), para medir a riqueza o índice de Riqueza (S) e o índice Chao, e o índice diversidade de filogenética.

No índice de riqueza, que fornece o número de espécies numa dada área, as espécies raras tem o mesmo peso de espécies comuns. No índice de Shannon cujo peso é intermediário entre espécies raras e comuns, quanto maior o valor de H, maior é a diversidade. No caso do índice de Simpson que expressa a dominância de espécies, o peso de espécies raras é pequeno e seu valor estimado varia de 0 a 1, e quanto maior o valor, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior dominância e menor a diversidade (MELO, A. S., 2008).

Quando não é possível inventariar a comunidade inteira, o índice de Shannon é utilizado para amostrar aleatoriamente as espécies de uma comunidade ou subcomunidade. O índice de Simpson além de considerar o número de espécies e o número total de indivíduos, fornece a proporção do total de ocorrência de cada espécie. De modo que o índice de Shannon enfatiza o componente de riqueza da diversidade, enquanto que o índice de Simpson enfatiza o componente de uniformidade (MARTINS et al., 1999).

Já o índice de equabilidade de Pielou, que refere-se ao padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies, calcula a dominância ecológica da comunidade de

espécies cujo valor varia de 0 a 1, onde o valor máximo indica ausência de dominância (PIELOU, 1966). O índice de Chao estima a riqueza total utilizando os dados de utilização presença-ausência, ou seja, o número de espécies representadas por apenas um indivíduo nas amostras, e o número de espécies com apenas dois indivíduos nas amostras (CHAO, A., 1984). A diversidade filogenética é uma medida da diversidade de uma comunidade que incorpora as relações filogenéticas das espécies (CIANCIARUSO et al., 2009).

## 14.2. Índices da Diversidade Beta

Com o objetivo de obtermos as estimativas de diversidade beta, isto é, a variação na composição da comunidade bacteriana entre comunidades em locais diferentes, utilizamos o programa MOTHUR v.1.36.1 tanto para a *Community Membership* que leva em conta a abundância de espécies, como para *Community Structure* que considera a presença ou ausência de espécies (SCHLOSS et al., 2009).

Fizemos testes de Mantel comparando a distância de dois tipos de diversidade beta *Membership* e dois tipos de diversidade beta *Structure* entre os pontos amostrados, ambos utilizando medidas de distância espacial (ar) e geográfica (rios).

Para a *Community Structure* calculamos o índice de abundância de Bray-Curtis (BRAY & CURTIS, 1957) que expressa uma proporção de similaridade ou dissimilaridade (distância) na “abundância das espécies”, e o UNIFRAC *weighted* incorpora cada comprimento de ramo da árvore filogenética e os pondera de acordo com a “abundância proporcional das duas amostras”, cujos táxons de baixa abundância têm um peso muito menor e por isso terão um menor impacto sobre a distância total relatada pela métrica.

A *Community Membership* foi estimada usando o índice de similaridade de Jaccard e o índice UNIFRAC *unweighted*. O índice de Jaccard permite a avaliação da similaridade na diversidade de espécies entre as áreas amostradas e o índice UNIFRAC *unweighted* é calculado com base na presença ou ausência de contagens para cada ramo na árvore filogenética, quando comparadas duas amostras.

Para verificarmos se existe influência da distância geográfica e espacial entre as áreas amostradas, realizamos testes de correlação entre matrizes de distância e de diversidade beta mais significativo utilizando software estatístico R na versão 3.2.3 com a ajuda do pacote Vegan.

Na análise de agrupamento, utilizada para verificar a formação de grupos de espécies entre comunidades, os cladogramas de similaridade das matrizes dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando os métodos de diversidade beta foram gerados através do programa FigTree V1.4.3, onde as árvores filogenéticas (cladogramas) foram visualizadas e editadas.

### **14.3. Modelos Lineares Generalizados (GLM)**

Para verificar o efeito do uso do solo nas APPs e nas bacias hidrográficas sobre a diversidade de bactérias, sobre a abundância das 10 bactérias mais comumente encontradas e sobre as propriedades químicas da água, usamos Modelos Lineares Generalizados (GLM).

Como variáveis explicativas utilizamos a estrutura da paisagem, ou seja, as porcentagens de florestas e pasto dentro de cada faixa de distância das bacias de drenagem e das APPs e como variáveis respostas as medidas de diversidades da comunidade bacteriana, as abundâncias das bactérias (OTUs) e os parâmetros físico-químicos.

Utilizamos para o cálculo dos índices de diversidade de Simpson, de Pielou e da riqueza de espécies o pacote Vegan no aplicativo R (versão 3.2.3, 2015). Para os Modelos Lineares Generalizados (GML), que envolvem variáveis discretas, como a medida de riqueza e abundância de OTUs foram usadas funções de ligação log, assumindo distribuições de Poisson. Para os dados de diversidade e concentração de nitrato, usamos a distribuição Gaussiana no GML.

Para verificar o efeito da escala sobre as variáveis dependentes, o GLM foi aplicado usando as diferentes distâncias do ponto de coleta (50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000 e 10.000 metros) tanto nas APPs quanto nas bacias hidrográficas. Como

os percentuais entre os sete usos de solo foram mais dominantes em florestas e pasto, usamos os valores desses para fazer as correlações com os OTUs.

Para cada distância foi determinado o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para o GLM com distribuição Gaussiana e do pseudo-  $R^2$  para o GLM com distribuição de Poisson. A partir desses valores foi definida qual escala explica melhor a variação dos dados nos pontos de coleta, ou conforme sugerido na metodologia de Jackson et al. (2014) qual “a escala de efeito”, onde a medida da estrutura da paisagem é o preditor e uma medida ecológica é a resposta.

## 15. RESULTADOS

### Comunidades Bacterianas dos Locais de Coleta

As sequências obtidas neste estudo foram submetidas a análises comparativas com as sequências depositadas no banco genético do NCBI usando a ferramenta Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) conforme Anexo E. Foram detectadas sequências na sua maioria pertencentes ao filo Proteobacteria (Tabela 2).

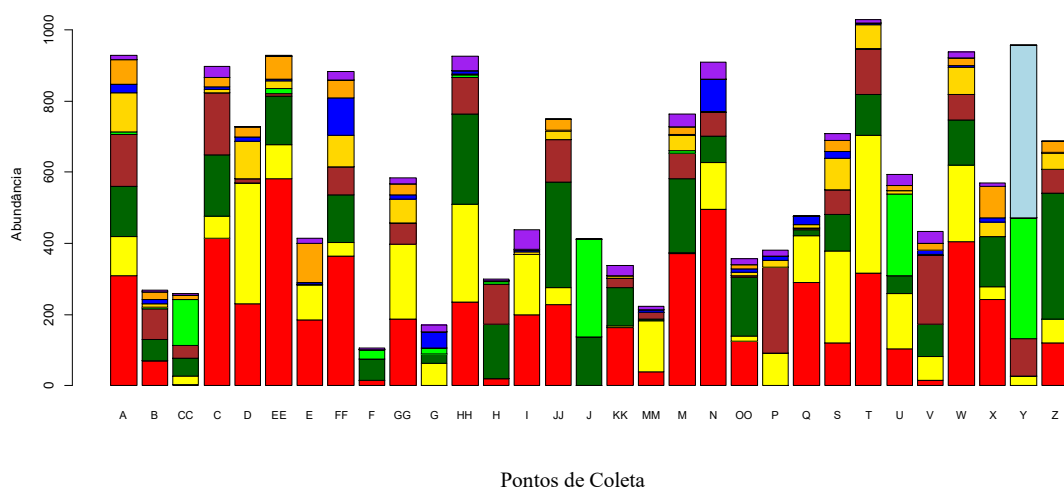
O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) detectadas a 97% de similaridade foi de 1.924 OTUs dos biofilmes bacterianos amostrados nos pontos do local de estudo. Dessas sequências as dez mais abundantes podem ser observadas na Tabela 2 e sua relação com os biofilmes estão na Figura 2 e no Anexo A.

**Tabela 2:** As dez Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) mais abundantes nos 31 pontos amostrais em Caconde.

OTU	Organismos	Afiliação Filogenética	Nível Taxonômico	Número de Indivíduos	Distribuição nos Pontos
1	Cellvibrionaceae	Proteobacteria	Família	6480	27
5	Pelomonas	Proteobacteria	Gênero	5484	28
2	Rhodoferrax	Proteobacteria	Gênero	4110	26
7	Ideonella	Proteobacteria	Gênero	3115	25
3	Bacteria	Firmicutes	Indefinida	1439	12
14	Elstera	Proteobacteria	Gênero	1224	24
17	Caulobacter	Proteobacteria	Gênero	1042	25
9	Rhizobiales	Proteobacteria	Ordem	709	25
6	Rhodospirillaceae	Proteobacteria	Família	708	20
4	Chlorobiaceae	Chlorobi	Família	486	1



Dentre as bactérias com maior número de representantes entre as dez mais abundantes se destacam de maneira expressiva as OTUs de números 1, 5, 2 e 7 totalizando 19.189 indivíduos do total de 24.797. A *Cellvibrionaceae* (OTU 1) com 6.480 indivíduos está distribuída em 27 pontos, dos quais sua maior abundância está no ponto EE (Figura 3) com 582 indivíduos. Por outro lado, a bactéria encontrada com mais frequência e classificada em segundo lugar em questão de abundância entre os pontos é a bactéria *Pelomonas* (OTU 5) com o total de 5.484 indivíduos em 28 pontos, cuja maior abundância está nos pontos D com 339 indivíduos e T com 388 indivíduos. Do total de bactérias no ponto Z, 51% é dominada pela bactéria *Rhodoferax* (OTU 2) com 353 microorganismos, cuja OTU está classificada em terceiro lugar em questão de abundância totalizando 4.110 indivíduos, tendo o ponto JJ com 297 organismos (Anexos A e D). Em quarto lugar de classificação em abundância (3.115 indivíduos) está a bactéria *Ideonella* (OTU 7) localizada em maior número no ponto P com 248 indivíduos. Entre as dez bactérias mais abundantes, a menos encontrada entre os pontos é a *Chlorobiaceae* (OTU 4) localizada no ponto Y no total de 486 organismos com 51% (Figura 2).



**Figura 2:** Abundância das dez OTUs mais frequentes em cada ponto de coleta na região de Caconde, SP. As cores estão relacionadas com os seguintes OTUs: vermelho OTU 1, amarelo OTU 5, verde escuro OTU 2, marrom OTU 7, verde OTU 3, ouro OTU 14, azul OTU 17, laranja OTU 9, azul claro OTU 6, e roxo OTU 4.

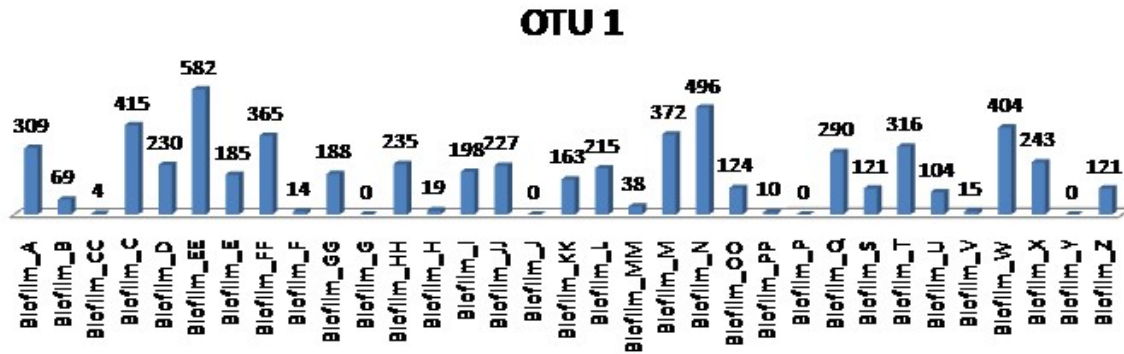
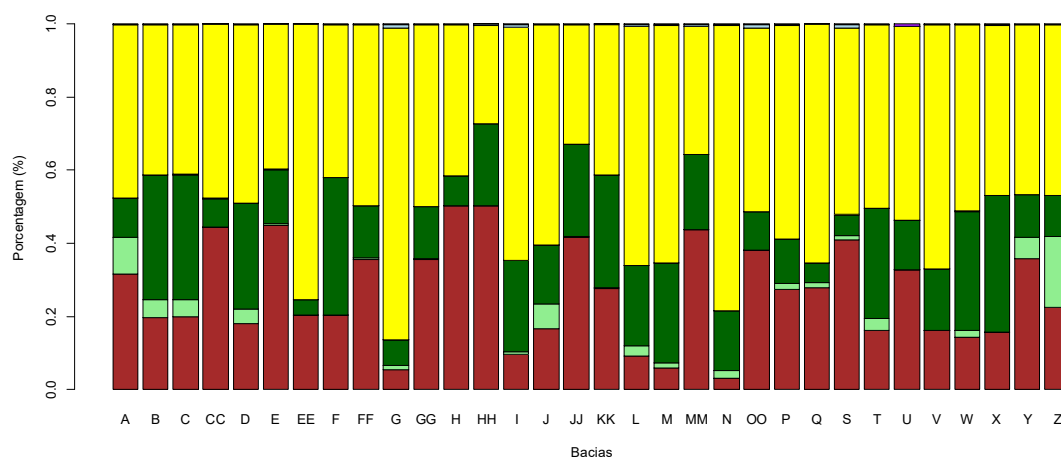


Figura 3: Frequência da OTU 1 (*Cellvibrionaceae*) entre as amostras.

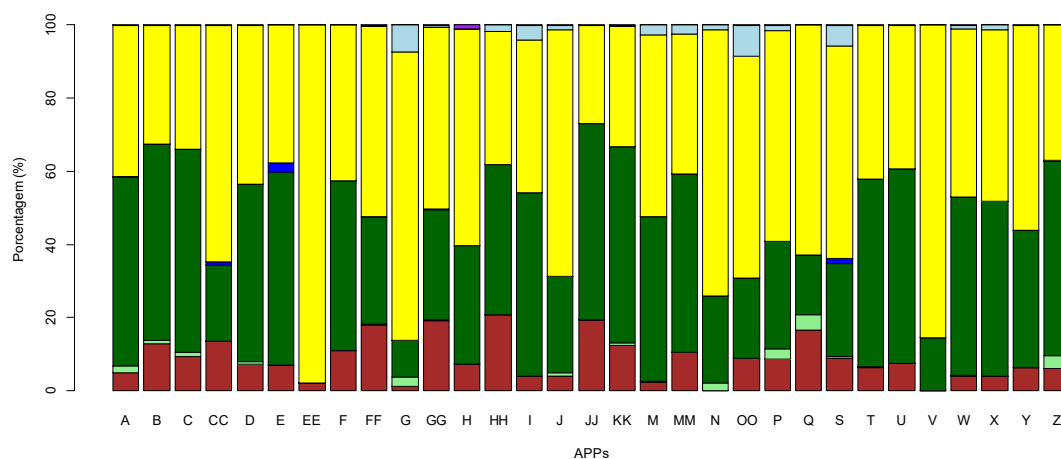
## Usos do Solo nas Bacias Estudadas

Com o mapa de uso do solo produzido a partir de imagens disponíveis do ArcGIS, foram classificados sete tipos principais de uso de solo: café, eucalipto, florestas, lagos, pasto e urbano que podem ser visualizados no Anexo B.

As Figuras 4 e 5 demonstram um certo padrão de distribuição em relação aos percentuais do uso do solo. Embora na bacia como um todo predominem os usos do solo de pasto, florestas e café (Figura 4), observa-se na Figura 5 que a porcentagem de pasto e florestas no uso do solo que abrange as APPs são bem mais evidentes. Nota-se também que a cobertura por eucalipto em ambos gráficos é maior nas bacias do que nas APPs. As porcentagens correspondentes a lagos e urbana nas bacias são quase imperceptíveis.



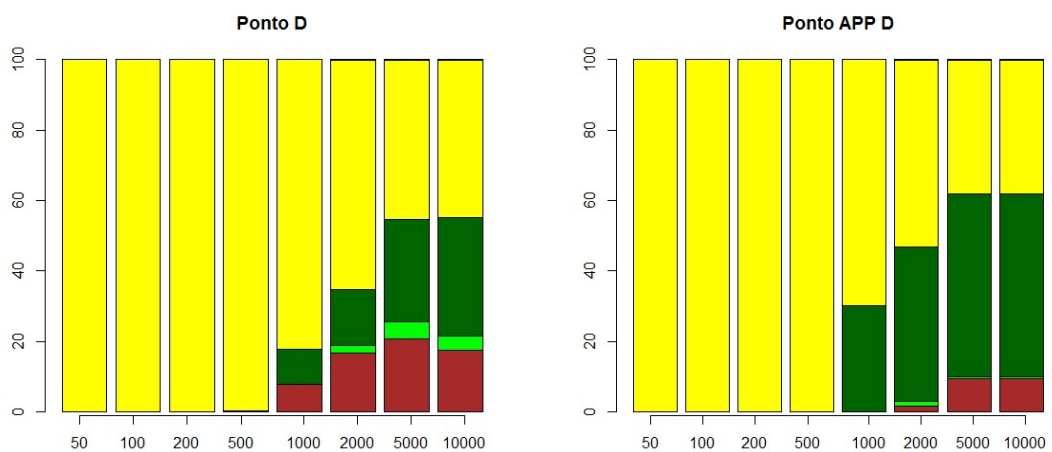
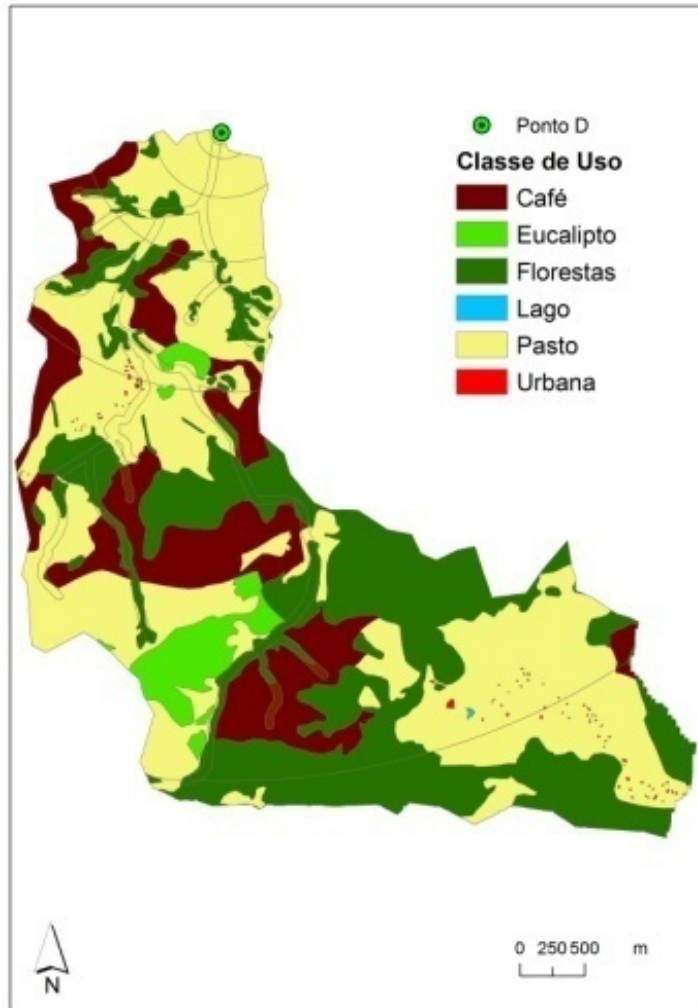
**Figura 4:** Porcentagens do uso de solo nas Bacias: Café (marrom), Eucalipto (verde claro), Florestas (verde escuro), Lagos (azul), Pasto (amarelo) e Urbana (roxo) nas diferentes distâncias do ponto de coleta (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 e 10.000 metros).



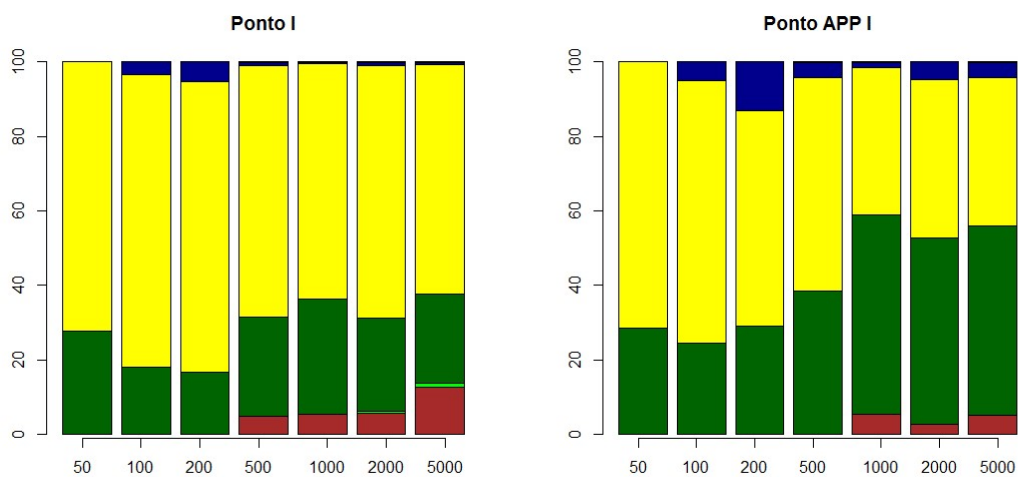
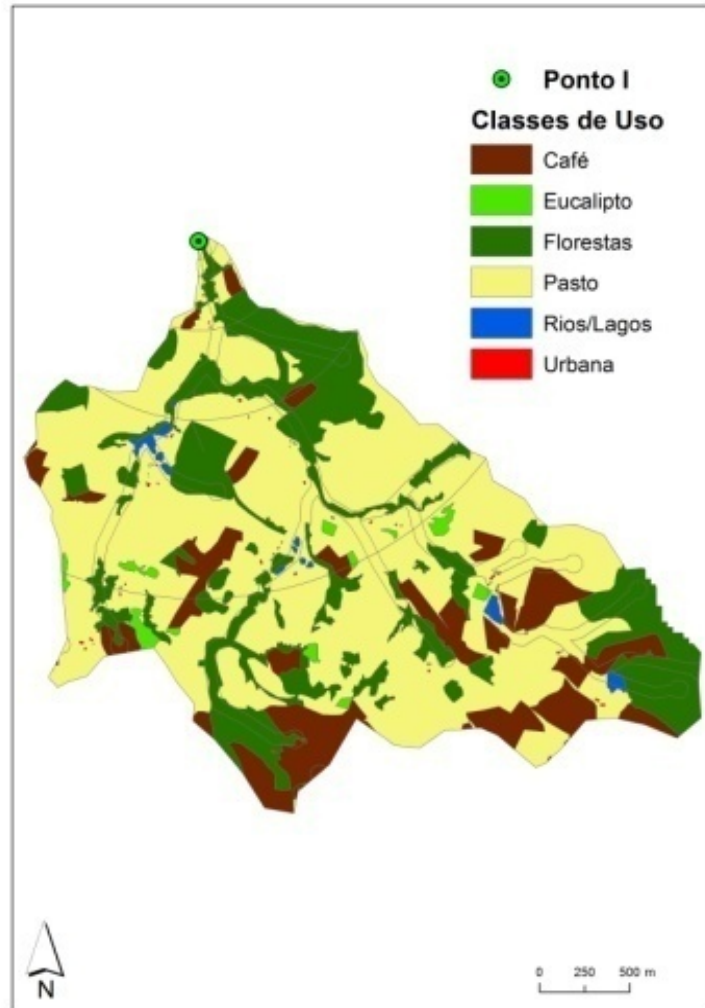
**Figura 5:** Porcentagens do uso de solo nas APPs: Café (marrom), Eucalipto (verde claro), Florestas (verde escuro), Lagos (azul), Pasto (amarelo) e Urbana (roxo) nas diferentes distâncias do ponto de coleta (50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 e 10.000 metros).

Embora as áreas de café sejam bem representativas, em geral, estão localizadas distantes dos pontos de coleta, conforme exemplificados nas Figuras 6, 7, 8 e 9, motivo pelo qual não foram incluídas nas análises. Como os percentuais entre os sete usos do solo foram mais dominantes em florestas e pasto, usamos os valores desses para fazer as correlações com as OTUs.

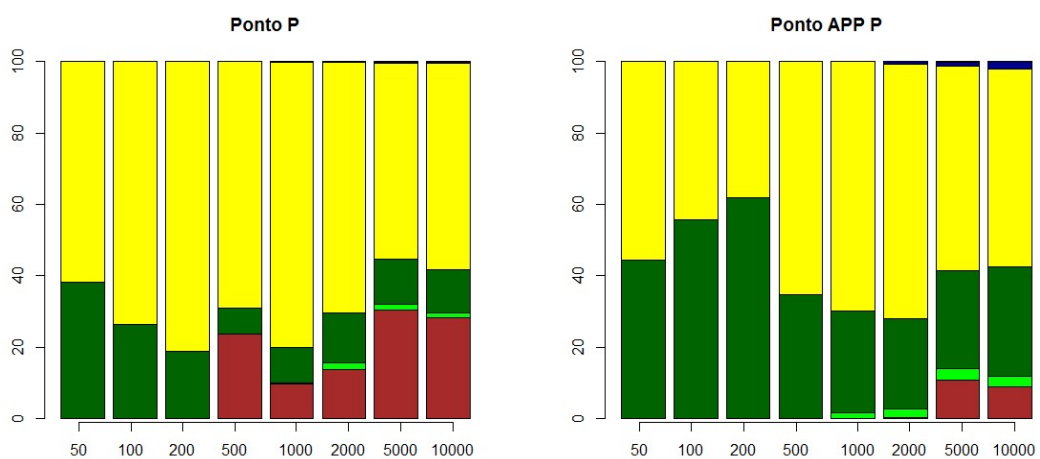
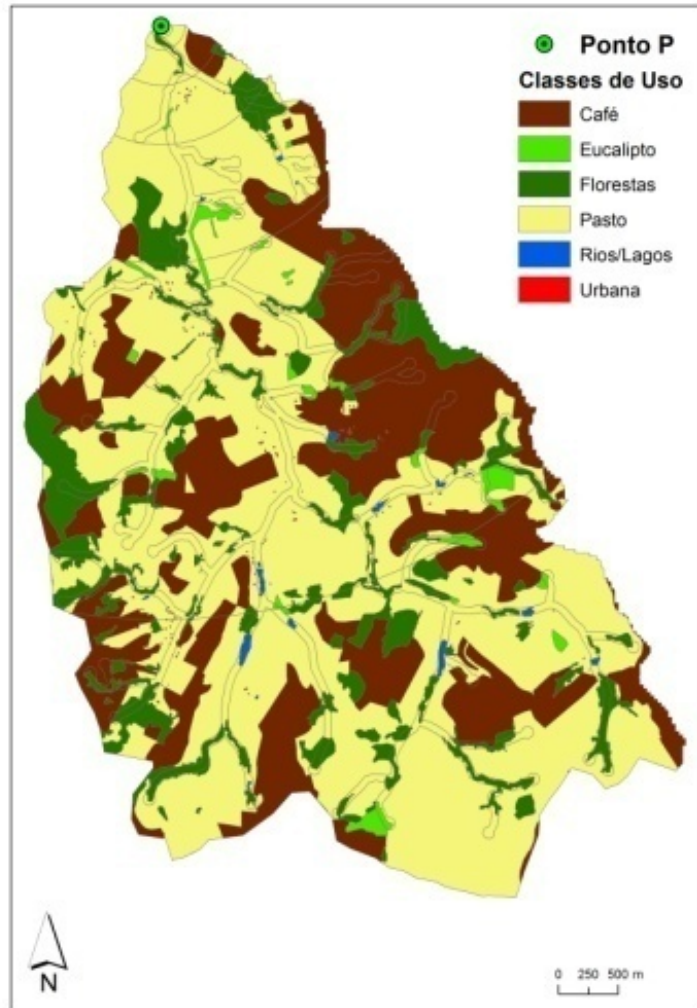
É possível verificar pelos mapas e pelos gráficos de barras que a área destinada a atividades agropecuária é bastante expressiva.



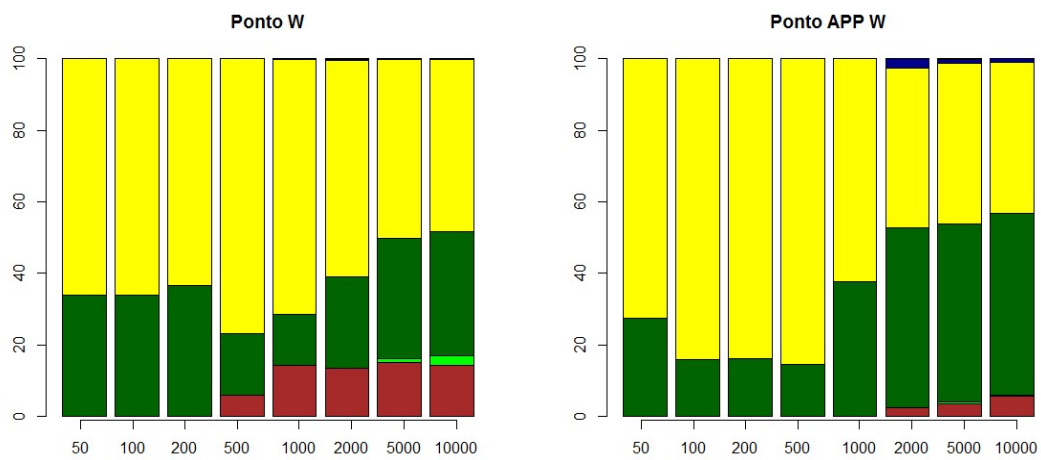
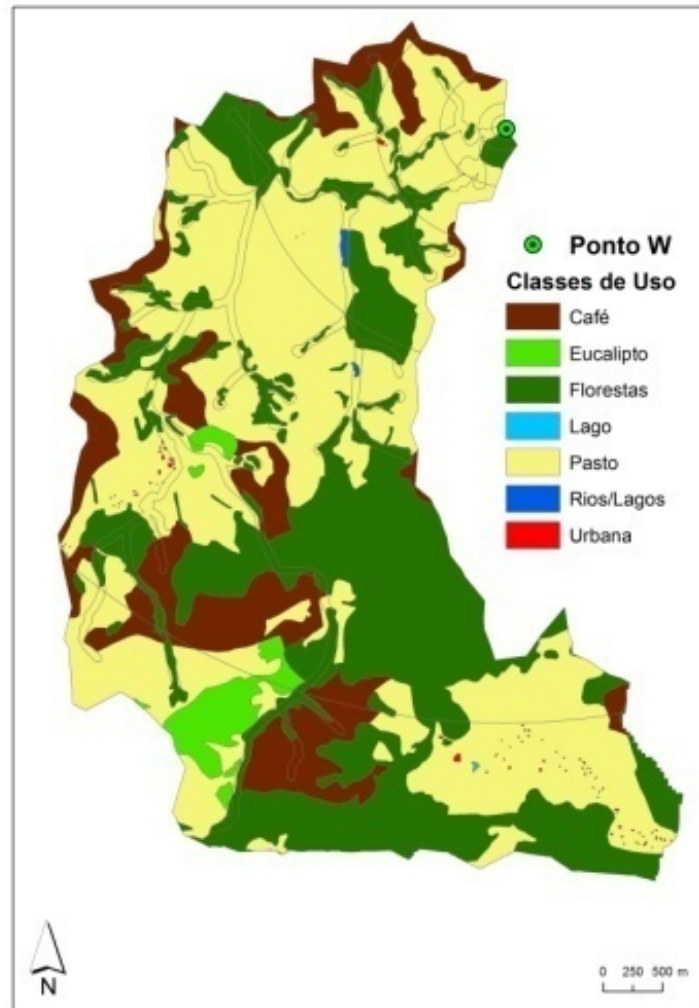
**Figura 6:** Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta D e gráficos de porcentagens (bacia e APP).



**Figura 7:** Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta I e gráficos de porcentagens (bacia e APP).



**Figura 8:** Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta P e gráficos de porcentagens (bacia e APP).



**Figura 9:** Mapa de Uso do Solo da Bacia e APP no ponto de coleta W e gráficos de porcentagens (bacia e APP).

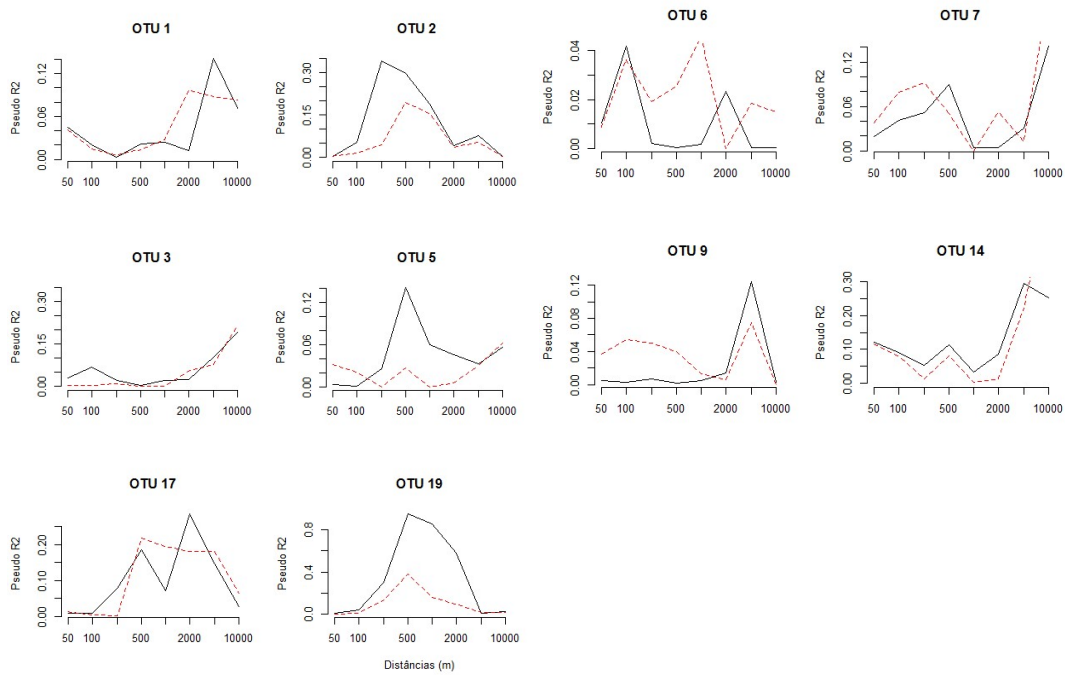
## Paisagem e Índices da Biodiversidade

Utilizamos as variáveis porcentagem de floresta e porcentagem de pasto como variáveis explicativas para relacionar com a abundância das dez OTUs com maior frequência nas amostras dos biofilmes bacterianos.

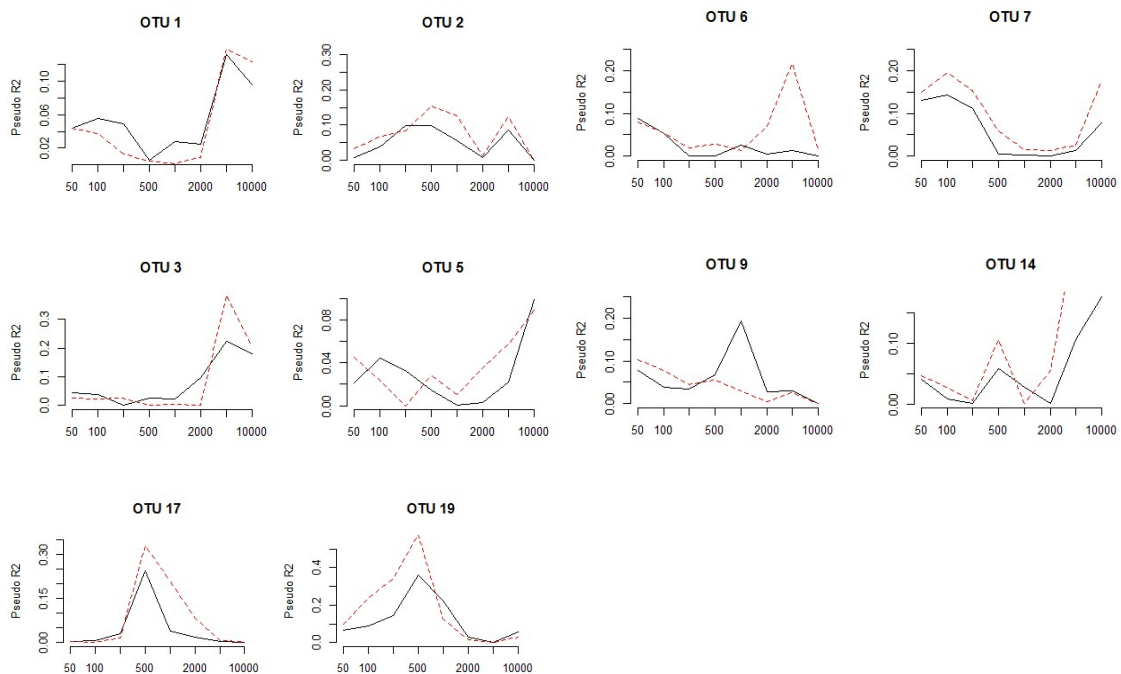
De maneira geral, os resultados dos modelos lineares generalizados indicam que as variáveis de uso do solo pouco explicam os parâmetros de biodiversidade das espécies (abundância das OTUs). No entanto, apesar dos baixos valores do pseudo  $R^2$ , há alguns pontos importantes a serem ressaltados. A variação dos valores de Pseudo  $R^2$  são semelhantes entre os modelos que consideram a bacia de drenagem e aqueles que consideram apenas as APPs, indicando que o padrão do uso do solo se mantém dentro e fora das APPs. Apesar dessa congruência das respostas dos parâmetros das bactérias em função das métricas de paisagem, para a variável “porcentagem de pasto”, a explicação dessa variável é na maioria das vezes mais elevada considerando a bacia como um todo, em comparação à mesma análise apenas para as APPs (Figura 10). Já para a porcentagem de floresta, esse padrão se inverte, em que a quantidade de florestas nas APPs explicam mais a variação dos parâmetros das bactérias do que a quantidade de floresta na bacia (Figura 11).

Adicionalmente, observa-se que a abundância das 10 OTUs mais frequentes respondem melhor a duas escalas distintas, uma considerando uma distância entre 200 e 500 metros do ponto de coleta e outro uma distância entre 5.000 a 10.000 metros tanto considerando a quantidade de pasto quanto de florestas (Figuras 10 e 11).





**Figura 10:** Variação do grau de explicação (pseudo  $R^2$ ) da abundância das 10 OTUs mais frequentes “pela porcentagem das áreas de pasto” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.

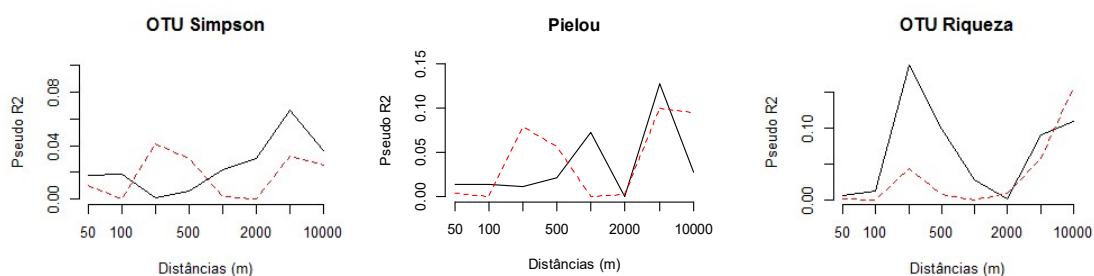


**Figura 11:** Variação do grau de explicação (pseudo  $R^2$ ) da abundância das 10 OTUs mais frequentes “pela porcentagem das áreas de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas

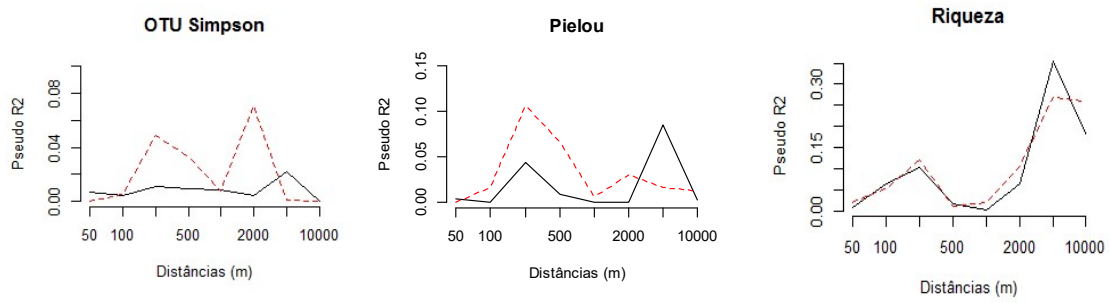
contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.

Com o objetivo de entender melhor a relação das bactérias com o uso de solo, fizemos a correlação dos índices de biodiversidade com as variáveis explicativas. Utilizamos como variáveis explicativas para correlacionar com os índices de diversidade, as variáveis de porcentagem de floresta e porcentagem de pasto. Foram analisados os seguintes índices: Simpson, Pielou e Riqueza total de OTUs (S) nos pontos amostrais dos biofilmes bacterianos.

Para os índices de diversidade, o padrão encontrado foi semelhante ao das abundâncias de OTUs. Os valores de  $R^2$  e Pseudo  $R^2$  foram mais altos para os modelos com porcentagem de pasto quando considerada a bacia de drenagem, como variável explicativa, e para os modelos com porcentagem de floresta para as análises restritas às APPs. Quanto ao efeito da escala, os parâmetros de diversidade de bactérias são mais bem explicados pelas distâncias de 200 m e entre 2.000 e 5000 m do ponto de coleta.



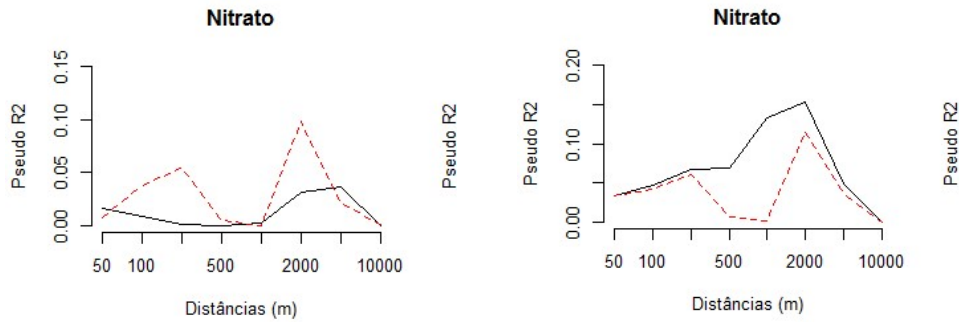
**Figura 12:** Variação do grau de explicação (pseudo  $R^2$ ) da concentração dos índices de diversidade de Simpson, de Pielou e da Riqueza total de OTUs (S) “pela porcentagem das áreas de pasto” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.



**Figura 13:** Variação do grau de explicação (pseudo  $R^2$ ) dos índices de diversidade de Simpson, de Pielou e da Riqueza total de OTUs (S) “pela porcentagem das áreas de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.

Entre as diversas variáveis físico-químicas mensuradas, somente o elemento nitrato obteve variação suficiente para ser analisado, pois os outros parâmetros ou tiveram valores muito próximos entre si ou apresentaram valores nulos (Anexo C).

Do mesmo modo que os resultados dos modelos lineares generalizados indicaram que as variáveis de uso do solo pouco explicaram os parâmetros de abundância das OTUs ou os índices de Simpson, Pielou e Riqueza de espécies, isso é corroborado com as variáveis de nitrato cujos valores de pseudo  $R^2$  também foram baixos. A explicação para a variável “porcentagem pasto” em função das métricas de paisagem e a concentração de nitrato é mais elevada nas APPs (Figura 14), enquanto que na variável “porcentagem de florestas” esse padrão se inverte, a quantidade de florestas nas bacias explica mais a variação dos parâmetros das bactérias do que a quantidade de florestas nas APPs.

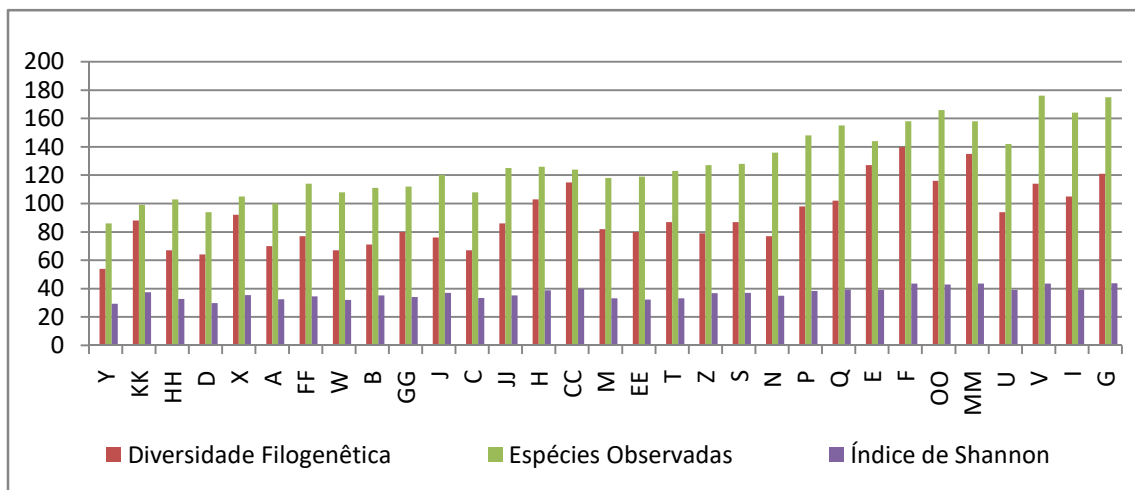


**Figura 14:** Variação do grau de explicação (pseudo  $R^2$ ) da concentração de nitrato pela ordem “porcentagem das áreas de pasto” e “porcentagem de florestas” considerando diferentes distâncias do ponto de coleta. As linhas contínuas pretas representam as análises por bacia e as linhas tracejadas vermelhas representam os resultados apenas considerando as áreas de APPs.

Além disso, observa-se que na concentração de nitrato, os índices respondem melhor a uma distância de 200 e 2000 metros do ponto de coleta levando em consideração tanto a quantidade de pasto como de florestas nas APPs, e uma distância mais significativa de 2.000 metros na correlação das bacias de drenagem e a variável floresta (Figuras 14).

## Estimativa da Diversidade Alfa

Os resultados das estimativas de diversidade alfa, ou seja, os índices de diversidade filogenética, de Chao e Shannon, apresentaram um aumento de valores proporcionais que estão ilustrados na Figura 15.



**Figura 15:** Estimativa de três medidas para diversidade alfa nos pontos de coleta.

Os valores menores para todos os índices apontam para o ponto Y, no entanto, o ponto mais alto para o índice de diversidade filogenética foi o F, e para os resultados do índice de espécies observadas (Chao) o ponto maior foi o V e a medida Shannon apresentou como resultado mais alto no ponto G.

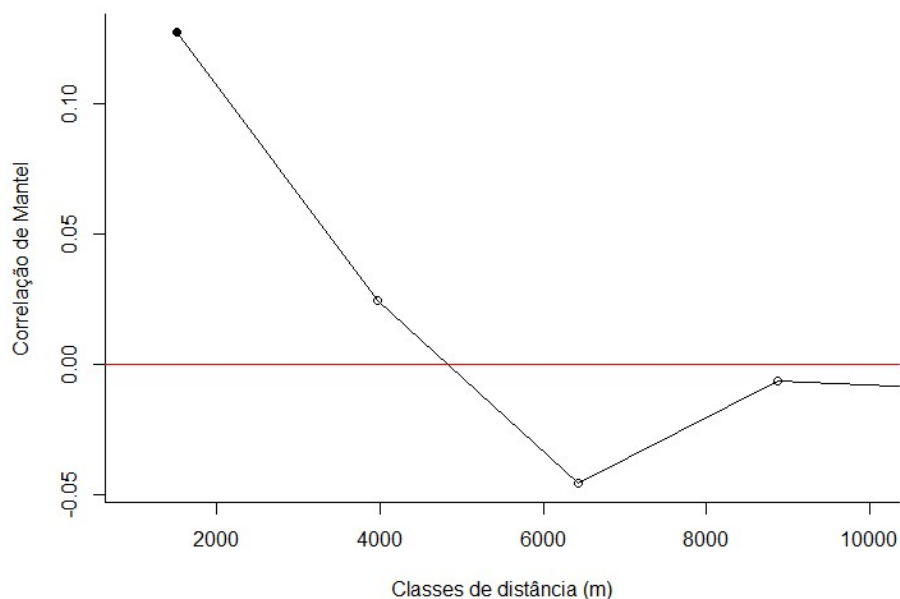
### Índice de Similaridade Beta para Distância

Para os testes de correlação entre matrizes de distância e de diversidade beta, os resultados demonstram que a maioria obteve um valor significativo, ou seja,  $p < 0.05$  (Tabela 3), evidenciando assim que existe influência tanto da distância geográfica como da espacial entre as áreas amostradas.

**Tabela 3:** Resultados dos testes de Mantel sobre a correlação entre matrizes de distância (espacial e geográfica) e de diversidade beta entre os 31 pontos amostrados na pesquisa.

Métodos	Correlação espacial (ar)	<i>p-Value</i>	Correlação geográfica (rios)	<i>p-Value</i>
<b><i>Community Structure</i></b>				
UNIFRAC <i>weighted</i>	0.0876	0.0634	0.0745	0.0542
Bray Curtis	0.0626	0.1513	0.0671	0.0653
<b><i>Community Membership</i></b>				
Jaccard	0.1125	<b>0.0067</b>	0.1420	<b>0.0040</b>
UNIFRAC <i>Unweighted</i>	0.0866	0.0294	0.0952	0.0354

O gráfico de Mantel que correlacionou nossa matriz de diversidade beta Jaccard, cujo *p-Value* foi mais significativo (Tabela 3) com a matriz de distância geográfica e espacial entre os pontos de coleta apresentou que as distâncias mais responsáveis para este teste significativo mostram que os pontos mais semelhantes tendem a estar numa distância menor do que dois quilômetros (Figura 16).



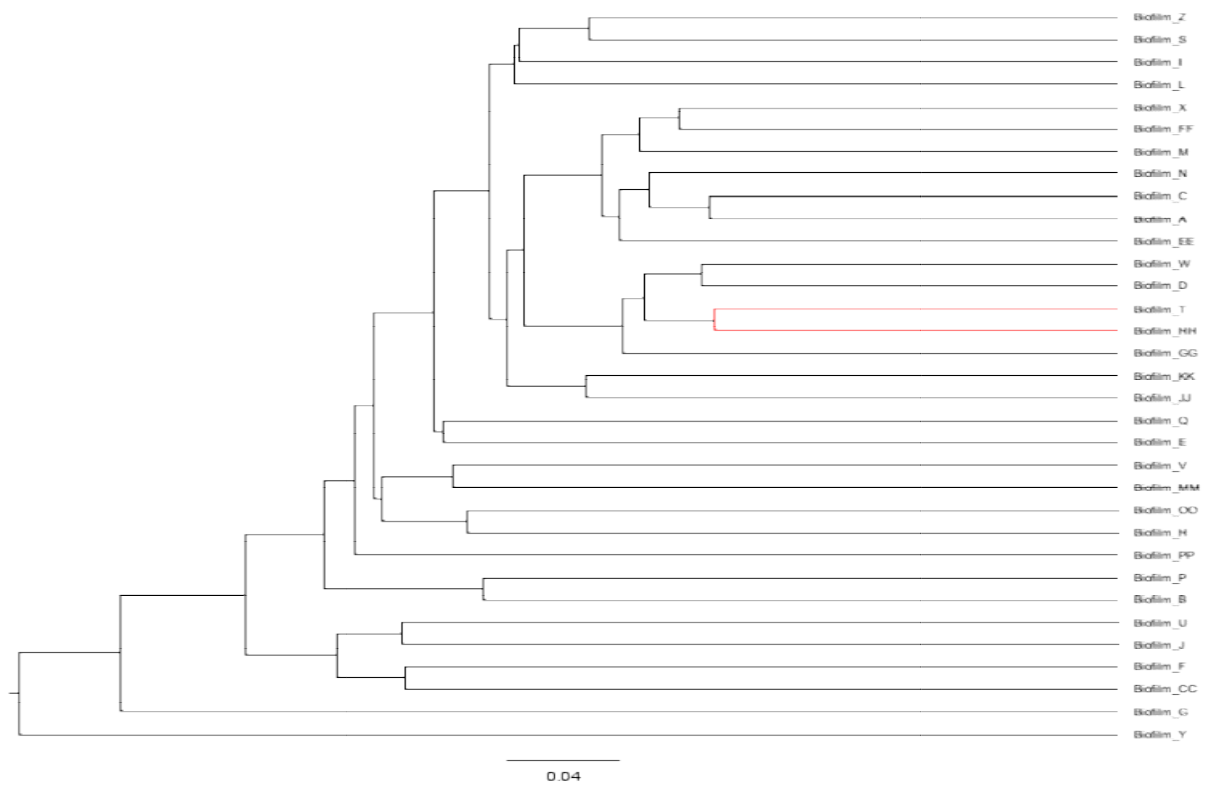
**Figura 16:** Correlação da matriz de diversidade beta com a matriz de distância.

## **Análise de Agrupamento da Diversidade Beta**

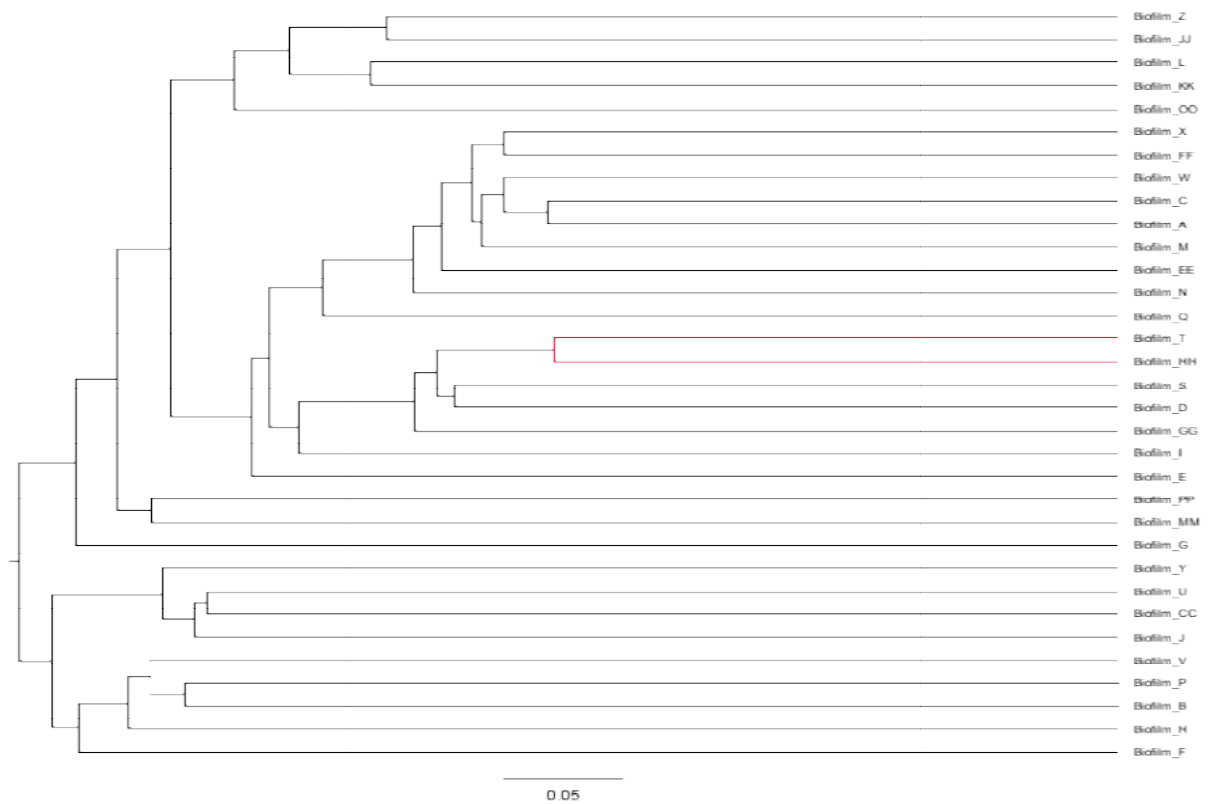
Na análise de agrupamento, utilizada para verificar a formação de grupos de espécies entre comunidades, os cladogramas de similaridade das matrizes das OTUs sequenciadas das amostras que geramos usando os métodos de diversidade beta podem ser visualizados nas Figuras 17, 18, 19 e 20.

Observa-se que para a *Community Structure* tanto o método UNIFRAC *weighted* como o método Bray Curtis apontam uma similaridade maior entre os pontos T e HH. Para a *Community Membership* o método Jaccard mostra uma similaridade maior entre os pontos KK e C, e para o método UNIFRAC *Unweighted* entre os pontos C e B.

## Community Structure



**Figura 17:** Cladograma dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método UNIFRAC *weighted*.



**Figura 18:** Cladograma dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método Bray Curtis.

## Community Membership



**Figura 19:** Cladograma gerado dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método Jaccard.



**Figura 20:** Cladograma dos OTUs sequenciados dos pontos amostrais usando o método UNIFRAC unweighted.



## 16. DISCUSSÃO

### Comunidades Bacterianas dos locais de coleta

Dentre as 10 OTUs com maior número sequenciadas, oito pertencem ao filo das Proteobacterias (Tabela 2), das quais os três gêneros que mais se destacaram em questão de abundância são: *Pelomonas* (OTU 5), *Rhodoferrax* (OTU 2) e *Ideonella* (OTU 7) citados em artigos como biorremediadores presentes em corpos hídricos com maior concentração de nutrientes (FINNERAN et al., 2003; HOUGARDY & KLEMME, 1995; LI, et al., 2011; LIOU et al., 2008; THORELL et al., 2003; YUAN et al., 2012; XIE & YOKOTA, 2005). A presença destacada desses gêneros entre as amostras pode indicar que houve um aumento de nutrientes nos corpos hídricos das amostras coletadas relacionados ao uso do solo advindos de atividades humanas. Como a região em estudo tem uma grande porcentagem de pastagem, essa atividade antrópica poderia ser potencialmente responsável pelo aumento de nutrientes acarretados pela descarga de poluentes, tais como fertilizantes e compostos orgânicos oriundos da pecuária em torno das bacias que drenam para esses pontos de amostragem (COUTINHO et al., 2013).

O sequenciamento em amostras de biofilmes bacterianos fornece poderosa ferramenta para o estudo da comunidade de bactérias sem a necessidade de prévio cultivo (CLAPCOTT et al., 2010; MORI, et al., 2015). Sua relação com os padrões do uso de solo na região estudada fornece mais informações de como a estrutura bacteriana pode influenciar a qualidade da água.

Através do sequenciamento observamos que a bactéria *Chlorobiaceae* (OTU 4) estava presente apenas no ponto de amostragem Y no total de 486 indivíduos perfazendo um total de 51% das bactérias predominantes neste ponto. Isto talvez tenha ocorrido porque este ponto de coleta estava isolado e muito distante dos demais, cerca de 6.000 a 7.000 metros dos pontos S e X e segundo estudos as comunidades microbianas tendem a ser semelhantes na sua composição quando estão a distâncias bem mais próximas pelo fato de que o uso do solo próximo tem forte influência sobre a condição de córregos. (ALLAN J. D., 2004; KING et al., 2010; MARTINY et al., 2011).

Artigos sobre a bactéria *Chlorobiaceae* indicam sua participação no processo de oxidação de sulfeto (Beatty et al., 2005; IMHOFF, 2014), e o enxofre é um dos componentes usados como fertilizantes de capim para pastagem (BONFIM-DA-SILVA & MONTEIRO, 2006; DE MATTOS & MONTEIRO, 2003; NOVO & CAMARGO, 2002; STIPP & CASARIN, 2010). Entorno do ponto de amostragem Y parece existir uma plantação de capim para gado cujo tipo de manejo desconhecemos. Talvez a presença desta bactéria esteja relacionada a uma suposta participação do processo de oxidação de sulfeto de algum tipo de fertilizante que pode ter sido usado pelo proprietário contendo em sua fórmula elementos a base de enxofre (LUZ et al., 2002).

Como em nosso estudo o pasto foi a cultura predominante nas bacias, isso poderia potencialmente explicar a presença dos três gêneros mais abundantes sequenciados nas amostras, cujas características estão relacionadas a ambientes com níveis aumentados de nutrientes. Ao substituir florestas naturais por terras agrícolas, os processos hidrológicos dentro e entre as bacias de drenagem são afetados e, conseqüentemente, as características físicas e químicas da água nos rios e riachos (QUINN & STROUD, 2002), pois a aplicação de fertilizantes em pastagens e a contaminação de dejetos de animais são lixiviados para as águas aumentando grandemente a concentração de nutrientes nesses ecossistemas hídricos. Esse fato é corroborado por Mori (2015) cujo estudo demonstrou que a mudança na cobertura do solo, especialmente a retirada de mata nativa por atividades agropecuária resulta em mudanças da composição física e química da água drenada para os corpos hídricos através da lixiviação influenciando diretamente na composição bacteriana nesses ecossistemas.

## **Uso de Solo e Biodiversidade**

Como houve um padrão da correlação das OTUs com as bacias de drenagem e as APPs, isto sugere que a relação entre as variáveis (porcentagem de pasto e porcentagem de florestas) é maior a algumas distâncias do ponto de coleta e que a importância dos parâmetros da paisagem na APP e na bacia pode variar dependendo da espécie, sendo que para algumas o parâmetro da APP explica melhor a abundância da espécie e para outras o parâmetro da bacia explica melhor em duas medidas distintas,

entre 200 a 500 metros e outra entre 5.000 a 10.000 metros. E há casos em que o grau de explicação é muito semelhante.

Por exemplo, a bactéria mais abundante, a *Cellvibrionaceae* (OTU 1), teve uma correlação a uma distância de 5.000 metros no uso bacia com o parâmetro de paisagem relacionada a pasto. No entanto no uso de solo nas APPs teve uma correlação maior por volta de 2.000 metros de distância com os mesmos parâmetros de paisagem, e na correlação do uso de solo para florestas o grau de explicação é o mesmo tanto na bacia como na APP, ou seja, a 5.000 metros.

De maneira geral as correlações se mostraram um pouco mais elevadas com o uso de solo “florestas” nas APPs indicando que a presença das bactérias está diretamente associada ao uso de solo ou cobertura vegetal quando está próxima dos rios, nas áreas de APPs. Por outro lado, a quantidade de “pasto” é mais importante para a bacia como um todo, possivelmente por ser um elemento dominante na paisagem e, por isso, ter grande influências em escalas maiores.

O mesmo padrão de concentração das APPs nas distâncias de 200 e 2000 metros do ponto de coleta é muito similar nos índices Simpson e Pielou no uso de solo “Pasto”, e no índice Riqueza a uma distância de 200 metros, o que pode sugerir que a biodiversidade bacteriana nas APPs é impactada pelo uso de solo em distâncias mais próximas.

## **Parâmetros Físico-Químicos**

A correlação nitrato com a paisagem, tanto no uso de solo “pasto” como no uso de solo “florestas” apresentou uma correlação das APPs muito similar indicando a relação deste ecossistema com o componente nitrato. O fato de sua maior concentração se encontrar nas distâncias de 200 e 2000 metros do ponto de coleta em ambos os usos pode sugerir que a presença de comunidades bacterianas desnitrificantes poderia ser maior nos rios próximos a pastagem onde a quantidade de nitrato é abundante.

Como as matas ciliares nas APPs atuam como um filtro para sedimentos, nutrientes e pesticidas das áreas agrícolas circundantes (BICALHO et al., 2010; WENGER S., 1999) isso pode explicar a correlação com as florestas. De maneira

inversa, quando não existe a mata ciliar o nitrato é lixiviado diretamente para os rios e córregos, quer por escoamento superficial ou por fluxo subterrâneo, o que poderia explicar a correlação deste componente com a cobertura de pastagem (MORI et al., 2015).

As comunidades bacterianas desnitrificantes tem um papel chave para manter a qualidade da água por realizar a remoção de nitrogênio dos corpos hídricos. O processo de desnitrificação é gradual, fazendo a redução de nitrogênio nas seguintes etapas: amônia (NH<sub>3</sub>) → nitrito (NO<sub>2</sub>) → nitrato (NO<sub>3</sub>) → N<sub>2</sub>, cujo gás é devolvido para a atmosfera.

Pesquisas relatam que em sistemas intensivos de produção agrícola a adubação de pastagens nitrogenadas tem sido usada de maneira intensiva em gramíneas forrageiras tropicais (PRIMAVESI et al., 2006) e em pastagens destinadas a gado de leite. O uso em altas doses desses insumos tem contaminado fontes de água e é um dos grandes problemas ambientais em muitos países de clima temperado (DI & CAMERON, 2002).

É fato que a cobertura de solo das bacias hidrográficas tem influência na composição da comunidade bacteriana, pois o nível de nitrogênio se intensifica nos corpos hídricos próximos ao uso de solo agrícola ou outras atividades antrópicas, tais como a remoção da vegetação natural para uso pastoril e adubação de pastagens (ALLAN, 2004; DOLEDEC et al., 2011; KIM et al., 2014; PRIMAVESI et al., 2006; WANG et al., 2011). Portanto, as bactérias que participam do processo de retirada de nitrogênio em ecossistemas hídricos são de suma importância para a qualidade da água.

Dentre os gêneros sequenciados que potencialmente poderiam estar participando no processo de remoção do nitrogênio estão *Pelomonas* (OTU 5), *Rhodoferrax* (OTU 2), *Ideonella* (OTU 7) e *Dechloromonas* (OTU 8 e OTU 11), todos pertencentes ao grupo das Proteobacterias. Segundo estudos a *Dechloromonas* tem papel fundamental no processo de remoção deste componente (YU et al., 2014; ZOU et al., 2014), indicando assim seu potencial em biomonitorar a qualidade da água em corpos hídricos (TOWNSEND et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

## **Estimativa da Diversidade Alfa**

Para todos os resultados das estimativas dos índices de diversidade filogenética, de Chao e de Shannon (Figura 15), os menores valores apontam para o ponto Y, talvez porque a bactéria *Chlorobiaceae* (OTU 4), encontrada apenas nesse ponto de amostragem, representa cerca de 1/3 (28%) dos 1.764 organismos sequenciados neste local.

O que potencialmente pode explicar o ponto F como o mais alto no índice de diversidade filogenética é a porcentagem de cerca de 50% de floresta na escala das APPs (Figura 5). Isso sugere que as florestas nas APPs estejam funcionando como um filtro de nutrientes que pode estar proporcionando um ambiente menos estressante e propício para uma maior diversidade de bactérias “sensíveis” que sobrevivem em corpos hídricos “saudáveis” (BICALHO et al., 2010; WENGER S., 1999).

Por outro lado o que poderia explicar os resultados maiores para o índice de espécies observadas (Chao) no ponto V e do índice de Shannon no ponto G é a porcentagem de pasto nas APPs que está em torno de 80% a 90% respectivamente (Figura 5), isso muito provavelmente porque quando não existem florestas, os nutrientes são lixiviados diretamente para os rios e córregos, o que provoca a eutrofização nos corpos hídricos, a diminuição do oxigênio e conseqüentemente qualidade de habitat se torna pobre, o que potencialmente pode aumentar a quantidade de espécies “resistentes” (ALLAN, 2004; MORI et al., 2015).

## **Índice de Similaridade Beta para distâncias**

Visto que nossa análise de correlação através do teste de Mantel entre a matriz de similaridade e a matriz de distância foi significativa numa distância menor do que dois quilômetros, isso talvez signifique que a partir de dois quilômetros os pontos tendem a ser diferentes, ou seja, mesmo que estejam no mesmo rio, a partir de dois quilômetros a comunidade das bactérias são influenciadas por variáveis distintas. Wang et al. (2013) aborda a importância dessa relação, relatando que das seis amostras em seu estudo, cinco foram fortemente relacionados com distância ambiental.

Segundo a revisão de Allan (2004), distâncias menores podem ser mais significativas pelo fato de que o uso do solo próximo tem forte influência sobre a condição de córregos. Segundo sua pesquisa, nutrientes lixiviados procedentes de áreas de pastagens mostram mudanças físicas e biológicas marcantes em distâncias inferiores a um quilômetro, devido à forte influência da impermeabilidade conectada a esses córregos, sendo que esses riachos com APPs desmatadas apresentam menor diversidade de habitat, um aumento de espécies invasoras e resistentes a sedimentos.

Outros trabalhos também relatam que a distância para bactérias dependentes da escala são significativas localmente ou relativamente em distâncias curtas. Por exemplo, Martiny (2011), em seu estudo teve como objetivo destacar a importância de se considerar escalas espaciais para a compreensão biogeográfica das comunidades bacterianas. Testes que variavam de centímetros para escalas maiores na composição das comunidades de bactérias em sedimento de pântano foram feitos para verificar os fatores que impulsionam a diversidade beta. Dentro de cada pântano, foram amostrados sete pontos ao longo de um transecto, com os pontos que variaram de 1 cm a 1 km entre eles. Testes de Mantel revelaram que tanto as escalas espaciais, quanto as ambientais parecem influenciar a diversidade beta, pois a similaridade na composição da comunidade bacteriana entre as amostras foi altamente correlacionada com a distância ambiental e distância geográfica.

Estudar a relação espécie-área para as bactérias, ou seja, a relação entre o número de espécies em uma área e o tamanho dessa área foi o objetivo de uma pesquisa realizada em um pântano salgado de Nova Inglaterra. Descrevendo a distribuição espacial de bactérias através de uma escala de centímetros a centenas de metros do local de estudo, a pesquisa concluiu que as comunidades bacterianas localizadas próximas umas das outras foram mais similares do que as localizadas mais distantes, cujo fator determinante foi à heterogeneidade ambiental (HORNER-DEVINE et al., 2004).

## **Análise de Agrupamento da Diversidade Beta**

Tanto o índice de Bray Curtis como o índice de UNIFRAC *weighted*, apontaram como resultado de similaridade de abundância de espécies os pontos T e HH. Essa abundância de espécies entre os pontos potencialmente pode estar relacionada à

similaridade da composição do uso de solo, principalmente em relação à quantidade de florestas nas APPs (Anexo B), o que comprova a importância da vegetação nativa para manter e melhorar a biodiversidade nos corpos hídricos e conseqüentemente para manter a qualidade da água nesses ecossistemas (IÑIGUEZ–ARMIJOS, et al., 2014).

O índice de Jaccard que permite a avaliação da similaridade na diversidade de espécies entre as áreas amostradas apresentou os pontos KK e C como mais significativos. Ao considerarmos o uso de solo nas APPs (Figura 5) nesses dois pontos, verificamos que a composição do uso de solo é mais abundantes em florestas, o que potencialmente poderia explicar os parâmetros das bactérias nesses pontos.

No caso do índice UNIFRAC *unweighted* que é calculado com base na presença ou ausência de contagens para cada ramo na árvore filogenética, quando comparadas duas amostras, apontou para os pontos B e C distantes a 300 metros um do outro. Esta distância está dentro de uma das medidas significativa de nosso estudo na variável paisagem, entre 200 a 500 metros, demonstrando assim que pode existir uma forte correlação entre esses pontos devido à proximidade. Logo, a distância entre os pontos de 300 metros potencialmente explique os parâmetros das bactérias, pois este argumento é apoiado por estudos que confirmam que os pontos mais próximos tendem a ter uma similaridade de espécies (ALLAN J. D., 2004; KING et al., 2010; MARTINY et al., 2011). E se visualizarmos os gráficos de porcentagens nas Figuras 6 e 7, tanto na escala das bacias como nas APPs, verificamos que existe uma similaridade na composição do uso de solo, o que poderia explicar o resultado do índice UNIFRAC *unweighted* em relação à similaridade das bactérias nesses dois pontos.

## 17. CONCLUSÃO

Ao analisarmos o sequenciamento das comunidades bacterianas verificamos a predominância de algumas bactérias pertencentes à classe das Proteobacterias, cujos gêneros são *Pelomonas*, *Indeonella* e *Rhodofera* descritas na literatura como bactérias envolvidas na degradação da matéria orgânica. Uma bactéria sequenciada e considerada altamente desnitrificantes em muitos estudos é a *Dechloromonas* também pertencente à classe dominante das Proteobacterias que poderia ser potencialmente usada como bioindicadora da qualidade da água. Essas categorias funcionais geralmente podem estar

associadas aos mecanismos de adaptação da comunidade microbiana a estresse hídrico, tal como aumento nas concentrações de nitrato. Assim, a composição da comunidade bacteriana pode estar correlacionada com taxas de remoção de nitrogênio devido à mudança do uso do solo conjugadas com mudanças ambientais.

Os resultados obtidos nas duas escalas espaciais (bacias de drenagem e APPs) indicam que o pasto é a cultura predominante nas bacias e que a presença de florestas tanto na bacia como nas APPs não são suficientes para conter os impactos desta atividade talvez devido à fragmentação dessas florestas. Talvez se a configuração fosse diferente, por exemplo, se as APPs fossem todas florestadas o resultado poderia ser diferente, reforçando a necessidade da conservação e restauração de florestas em ambas as escalas para exercer um papel de proteger e conservar o ambiente aquático e a qualidade da água.

Embora em nosso estudo a correlação entre uso de solo e a abundância de espécies bacterianas possa ser mais bem explicada pelas variáveis porcentagem de pasto e porcentagem de florestas em duas medidas distintas entre 200 a 500 metros e outra entre 2.000 a 5.000 metros, sejam na escala das bacias de drenagem sejam na escala das APPs, ficou evidente pela correlação com os índices de riqueza, de biodiversidade e nitrato que essas correlações de maneira geral foram maiores nas APPs nas distâncias de 200 e 2.000 metros variando entre uso pasto e uso florestas ou em ambas as variáveis. Isso somado ao índice de similaridade de Mantel cujos pontos amostrais são mais semelhantes numa distância menor de dois quilômetros indica que a presença das bactérias está diretamente associada ao uso do solo próxima aos rios e confirmam o que outros autores já relataram em seus estudos que a diversidade de espécies é maior em distâncias mais próximas. Para além desses dados, tanto a estimativa da diversidade beta como as análises de agrupamento também da diversidade beta, juntas mostraram resultados que apóiam essas afirmações.

Esse estudo conclui que as mudanças antropogênicas na paisagem podem alterar as comunidades de bactérias nos ecossistemas hídricos e nossos resultados poderão servir de parâmetros de avaliação e de maior compreensão sobre como a composição das comunidades bacterianas nos corpos hídricos associadas ao uso do solo podem ser um indicativo da saúde hídrica.



## 18. RECOMENDAÇÕES

Conforme observados nos resultados da distribuição do uso de solo, a maior parte das bacias de drenagem e respectivas APPs estão ocupadas por pasto e florestas, sendo que as áreas destinadas a atividades agropecuária são bastante expressivas. Recomendamos o reflorestamento em especial nas áreas de APPs, pois estas funcionam como protetoras naturais de nascentes e cursos d'água, evitando mudanças na comunidade bacteriana dos corpos hídricos causados pelo assoreamento e erosão, além de fornecerem outros de serviços ambientais, tais como proteção biológica da fauna e flora, atuação em corredores ecológicos, refúgios de animais e a saúde desses fluxos.

Na atualidade a maioria dos estudos que avaliam as comunidades bacterianas tem focado principalmente na abundância e diversidade de espécies, mas não nas possíveis interações entre as espécies. No entanto, interações entre espécies podem ser tão importantes para o funcionamento do ecossistema quanto o conhecimento sobre a riqueza e abundância de espécies, especialmente em ecossistemas complexos. Sendo assim, sugerimos que novas pesquisas relacionadas à interação das espécies sejam feitas na região de Caconde para uma maior compreensão de como o papel das comunidades bacterianas está exercendo influência na qualidade da água na área estudada.

Sugerimos também que o foco para futuros estudos deve ser a amostragem tanto na estação de estiagem quanto na estação chuvosa conjugada aos métodos utilizados nessa pesquisa, que juntos podem revelar associação com parâmetros de outras bactérias que potencialmente tenham um papel chave como bioindicadores da saúde desses corpos hídricos em épocas diferentes do ano, visto que tanto as condições ambientais como a identidade das espécies se moldam cooperativamente com a estrutura e a função das comunidades bacterianas.

## CAPÍTULO III

### AS BACTERIAS MAIS ABUNDANTES EM NOSSO ESTUDO E SEUS PAPÉIS DENTRO DOS ECOSISTEMAS HÍDRICOS

#### 19. INTRODUÇÃO

O homem é dependente dos ambientes aquáticos, visto que esses ecossistemas são de relevância ecológica e econômica, entretanto essa interação com os sistemas aquáticos gera elevados níveis de impactos sobre a biota. Entre as atividades humanas responsáveis por esses impactos estão atividades urbanas, industriais e agrícolas responsáveis pela descarga de poluentes, tais como fertilizantes, compostos orgânicos, metais pesados e fontes de águas residuais muitas vezes sem tratamentos adequados, particularmente em países em desenvolvimento (COUTINHO et al., 2013).

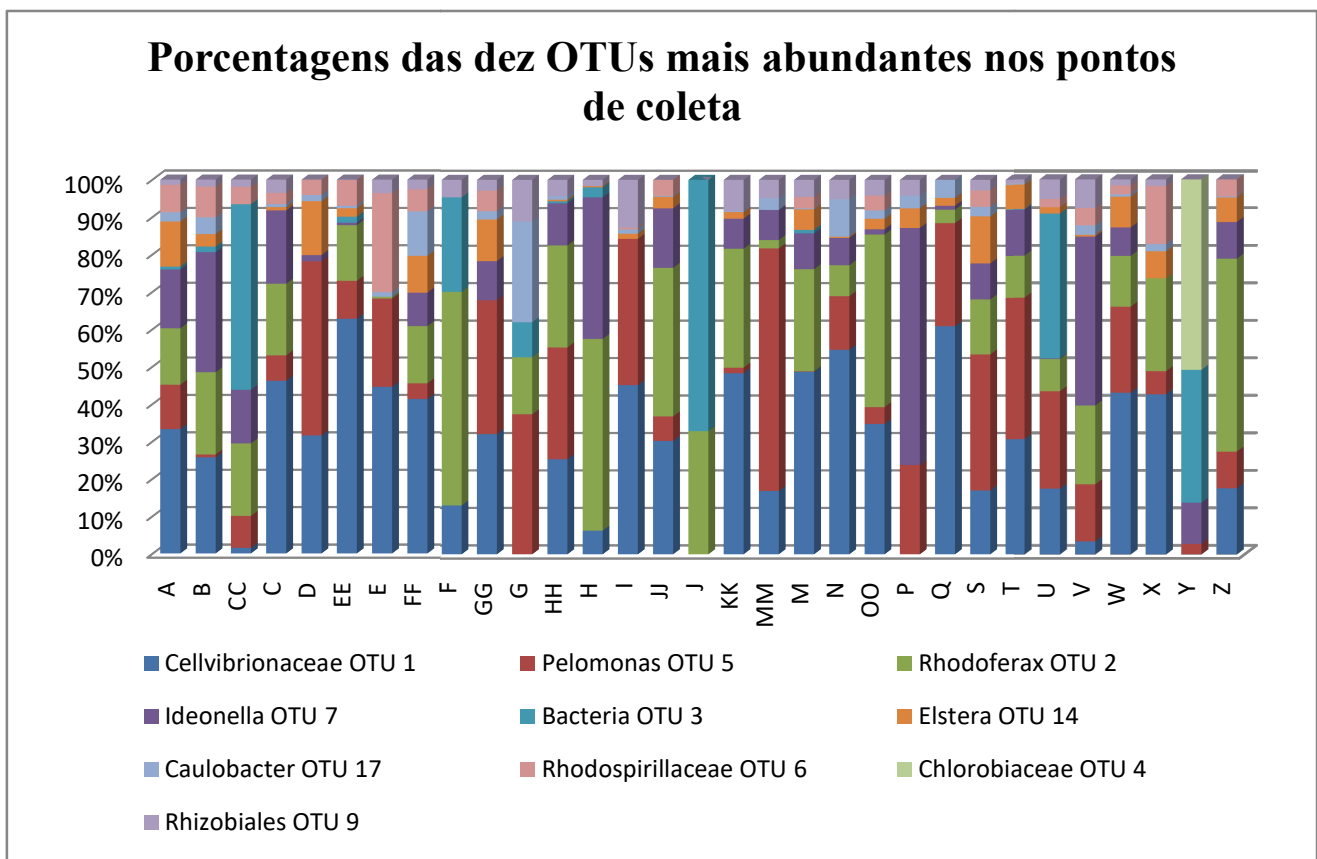
Podemos citar entre os resultados dessas contaminações a eutrofização, a toxicidade, a bioacumulação e a disseminação de doenças, que podem se espalhar por longas distâncias afetando até mesmo áreas pouco habitadas (MARTINS et al., 2004; MENEZES, C. T., 2007; SILVA et al., 2005; TOMITA & BEYRUTH, 2003)

A poluição aquática afeta drasticamente as comunidades bacterianas, tanto pela fonte como pela quantidade desses poluentes, comprometendo o funcionamento dos ecossistemas, composição de espécies e abundância. Visto que as comunidades bacterianas desempenham papéis relevantes na estrutura e dinâmica das redes tróficas e na remineralização da matéria orgânica, o conhecimento da composição dessas comunidades é crucial para compreendermos seus processos biogeoquímicos e definir estratégias para mitigar os impactos antropogênicos (VIERA et al., 2008).

O advento da tecnologia metagenômica, que proporcionam acesso a todo o conjunto de genes e genomas de uma amostra (COUTINHO et al., 2013), tornou possível o conhecimento dessas comunidades, contribuindo significativamente para uma melhor compreensão da composição, dinâmica e funções da microbiologia em uma variedade de sistemas aquáticos incluindo os modificados de maneira antropogênicas (MARTINS & VALENTE, 2004). Esta tecnologia é baseada na extração total de DNA das amostras, amplificação por PCR de genes específicos e construção de biblioteca de

todo material genético (GILBERT & DUPONT, 2011). O uso de bibliotecas de clones completos do gene 16S rRNA fornecem uma ampla visão da diversidade bacteriana que permite comparar as comunidades em diferentes habitats (POMMIER et al., 2007).

De modo que para uma melhor compreensão das comunidades bacterianas das 31 amostras de nosso estudo, utilizamos a tecnologia metagenômica que sequenciou 1.925 OTUs dos quais os dez mais abundantes foram: OTU 1, OTU 5, OTU 2, OTU 7, OTU 3, OTU 14, OTU 17, OTU 9, OTU 6 e OTU 4 (Figura 21).



**Figura 21:** Porcentagens das 10 OTUs mais abundantes em cada ponto de amostragem.

Através de levantamento bibliográfico identificamos em literatura artigos publicados relacionados às bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria mais abundantes da nossa investigação que servem como auxílio nas análises de como essas comunidades bacterianas desempenham seus papéis dentro dos ecossistemas hídricos estudados.

O filo Proteobacteria, grupo de bactérias gram-negativas, é o mais estudado dos filos bacterianos, pois abrange a maioria das bactérias presentes na agricultura, indústria e são organismos clinicamente relevantes. Dentre as 10 bactérias mais abundantes, foram sequenciadas três das seis classes reconhecidas atualmente: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, predominantemente classificados como aeróbios e facultativamente anaeróbios (DEGLI ESPOSTI et al., 2015).

Os membros pertencentes à classe Alphaproteobacteria são encontrados em todos os habitats imagináveis, inclusive são onipresentes em lagos de água doce, embora menos numerosos, mas são numericamente dominantes em muitos ecossistemas marinhos (Morris et al., 2002). Seu aumento na abundância relativa tem sido muitas vezes acompanhado por uma tendência de seus membros para formar filamentos agregados (exemplo a bactéria *Caulobacter*) e de responder de forma diferente a disponibilidade do substrato através de sua capacidade de degradar compostos orgânicos persistentes (HUTALLE-SCHMELZER et al., 2010; SALCHER et al., 2005). Entre suas funções estão: são parasitas intracelulares (BATUT et al., 2004) e participam do ciclo do nitrogênio através de seus membros simbióticos (exemplo a bactéria *Rhizobiales*) que facilita a fixação do nitrogênio atmosférico pelas plantas (NEWTON et al., 2011).

A classe Betaproteobactéria é o grupo numericamente dominante em muitos diferentes ambientes de lagos de água doce (GLÖCKNER et al., 2000), constituindo até de 60 a 70 % do total (SALCHER et al., 2008). Esta abundância, sua facilidade de cultivo, seu crescimento rápido e seu estilo de vida oportunista, contribuíram muito para ser o grupo mais bem estudado e identificado através de técnicas de sequenciamento. O que diferencia os organismos estreitamente relacionados dentro dessas linhagens são profundidade, pH, preferências por substratos e fatores sazonais (NEWTON et al., 2011).

Os organismos da classe Gammaproteobacteria geralmente são mais abundantes em ambientes de água salgada do que em ambientes de água doce (WU et al., 2006). No entanto, podem ser considerados membros transitórios em lagos de água doce, trazidos do ambiente circundante, a partir de fontes antropogênicas e ou zoonóticas, cujo crescimento é rápido quando a quantidade de nutrientes é grande, tais como nitrato e fósforo. Até o momento poucos estudos com base em sequências de ambientes de água

doce contém dados sobre membros desta classe, pois poucas sequências de genes foram isoladas e cultivadas desses ecossistemas (NEWTON et al., 2011).

## **20. REVISÃO DA LITERATURA**

### **20.1. *Cellvibrionaceae***

*Cellvibrionaceae* (OTU 1) não foi possível colocar em classificação de gênero por causa de baixos valores de confiabilidade. Embora a sequência do gene 16S rRNA seja um dos principais marcadores filogenéticos de espécies, ela não fornece discriminação na família *Cellvibrionaceae* devido à sua baixa resolução interespecies (MACHADO, & GRAM, 2015). Quando clonado e sequenciado individualmente pode identificar uma estirpe como pertencendo a várias espécies diferentes (JENSEN & TORSVIK, 2009).

A família *Cellvibrionaceae* pertence à ordem *Cellvibrionales*, classe Gammaproteobacteria, e abrange principalmente bactérias de solo e de ambientes aquáticos. Além disso, possui a capacidade de utilizar polissacarídeos complexos como substratos, uma característica generalizada entre estirpes pertencentes a essa família. (SPRING et al., 2015).

### **20.2. *Pelomonas***

A classe Betaproteobacteria (OTU 5) foi identificada com o gênero *Pelomonas*, pertencente ao grupo Proteobacteria.

Resultados de estudos fornecem evidências que o microrganismo *Pelomonas* é uma bactéria anaeróbica biodegradadora de benzeno, um hidrocarboneto mal biodegradado na ausência de oxigênio, solúvel, tóxico, estável e móvel em águas superficiais e subterrâneas. Em testes de incubação em laboratório essa bactéria estava

ativa na concentração de 10 ppm de benzeno indicando sua eficiência como agente desnitrificador (LIOU et al., 2008)

A eficiência das bactérias deste gênero pode ser maior quando o processo de desnitrificação é feito em associação com outras bactérias, onde mais microrganismos participam na remoção completa de poluentes em sistemas hídricos conforme pode ser observado no tópico “Associação de Bactérias Desnitrificantes”.

### **20.3. *Rhodoferax***

*Rhodoferax* (OTU 2) foi identificado através de sequenciamento genético como gênero pertencente à classe das Betaproteobacteria.

Na análise filogenética de um dos microrganismos que foram enriquecidos e isolados de sedimentos subsuperficiais de Oyster Bay, VA, EUA, foi identificado o gênero *Rhodoferax* capaz de reduzir ferro e de crescer em temperaturas tão baixas quanto 4°C (FINNERAN et al., 2003).

Quanto mais microrganismos participam na remoção completa de poluentes em ecossistemas hídricos, o processo de desnitrificação se torna mais eficaz, o mesmo pode ser observado em estudos desse gênero *Rhodoferax* conforme no tópico “Associação de Bactérias Desnitrificantes”.

### **20.4. *Ideonella***

*Ideonella* (OTU 7) foi identificado através de sequenciamento genético, sendo um gênero da classe Betaproteobacteria, e é citado em estudos relacionados às suas espécies em corpos hídricos.

Uma investigação para verificar o desempenho e a estrutura da comunidade microbiana durante o tratamento de um rio poluído no campus da Universidade de Nanjing, na China, usou um reator de laboratório que foi projetado para simular os processos reais de filtração e reação do bio-cordão de água bruta coletada. A

diversidade microbiana do biofilme ligado ao suporte de bio-cordão foi investigada utilizando as sequências de 16S rRNA de bactérias que detectou bactérias nitrificantes e desnitrificantes, cuja afiliação filogenética observada na sua maioria foi Proteobacteria e Bacteroidetes, incluindo *Ideonella sp.* entre outras, sugerindo que os processos de nitrificação e desnitrificação simultâneas estavam ocorrendo (YUAN et al., 2012). O estudo sugere que uma investigação adicional seja feita para identificar e medir a atividade destas bactérias de maneira eficiente usando métodos quantitativos confiáveis.

A eficiência das bactérias deste gênero pode ser maior quando o processo de desnitrificação é feito em associação com outras bactérias, onde mais microrganismos participam na remoção completa de poluentes em águas, conforme pode ser observado no tópico “Associação de Bactérias Desnitrificantes”.

### **20.5. *Elstera***

O gênero *Elstera* (OTU 14), foi identificado e pertence à classe Alphaproteobacteria, cujos dados são escassos em relação à água. Poucas espécies foram encontradas, tais como a *Elstera litoralis* que foi isolada de um biofilme de pedras a partir de uma zona litoral do Lago Constança, na Alemanha, cujo estilo de vida é heterotrófico por utilizar diatomáceas como fonte de carbono (RAHALKAR, et al., 2015). Outro estudo pode ser observado em associação com a bactéria *Dechloromonas* (vide tópico: Associação de Bactérias Desnitrificantes).

### **20.6. *Rhodospirillaceae***

As bactérias da família *Rhodospirillaceae* (OTU 6) são chamadas de bactérias púrpuras não sulfurosas, pertencentes à ordem *Rhodospirillales*, subclasse *Alphaproteobacteria* (BALDANI, et al., 2014).

A maioria dos membros da família *Rhodospirillaceae* habita biofilmes de pedra que utilizam as diatomáceas e algas como fonte de carbono. Em análises do genoma de um membro isolado a partir de um biofilme de uma zona litoral do Lago Constança

foram utilizados vários substratos de C explicando assim seu estilo de vida heterotrófica (RAHALKAR, et al., 2015).

Outras novas estirpes da família *Rhodospirillaceae* foram isoladas a partir de lagos do sudeste da Sibéria em águas moderadamente alcalinas e com pH acima de 9,0 (BRYANTSEVA, et al., 2015).

### **20.7. *Rhizobiales***

*Rhizobiales* (OTU 9), da classe das Alphaproteobacteria, foi uma das principais ordens de bactérias presentes em um estudo que teve como objetivo determinar a estrutura e estabilidade sazonal das populações microbianas desnitrificantes em amostras de sedimentos de quatro lagos boreais que foram coletadas, quantificadas e sequenciadas (SAARENHEIMO, et al., 2015).

Para examinar a composição das comunidades bacterianas em amostras de sedimentos coletados em pontos diferentes (esgoto rural, fábricas de curtume, de vestuário e de botões) a partir do rio Nanxijiang, na China, que é um efluente de descarga, foi aplicado sequenciamento genético. O sequenciamento indicou que a maioria das amostras do efluente pertencia à classe Betaproteobactéria. A ordem *Rhizobiales* foi classificada nas amostras de efluentes de esgoto rural, com predominância de 4,1%. O estudo indicou que na caracterização das comunidades bacterianas em sedimentos de vários ramos a jusante, os efluentes de águas residuais distintos têm um potencial semelhante na variabilidade natural dos ecossistemas hídricos e contribuem para a homogeneização biótica do rio (LU, & LU, 2014).

### **20.8. *Caulobacter***

O gênero *Caulobacter* (OTU 17), pertencente à classe Alphaproteobacteria, filo Proteobacteria, normalmente cresce em níveis baixos de nutrientes e são chamados de *prosthecate* por terem uma morfologia incomum, incluindo gemas ou talos que são usados para aderir a uma superfície (POINDEXTER, 2005).



Dos nove locais de amostragem de água coletadas ao longo do curso do rio Red Cedar em Michigan, da montante a jusante, incluindo locais que recebem efluentes de vários municípios do centro de Michigan, o gênero predominante de bactérias foi *Caulobacter*, que correspondeu de 64 a 93% das formas totais *prothecate*.

Outro estudo mostrou que bactérias do gênero *Caulobacter* variam muito em abundância no decorrer do ano, apresentando um grande aumento especialmente no verão em comparação com os períodos mais frios. Não houve correlação entre a frequência destas bactérias com coliformes totais, pois comparativamente o número dessas últimas foi menor (STALEY, 1971).

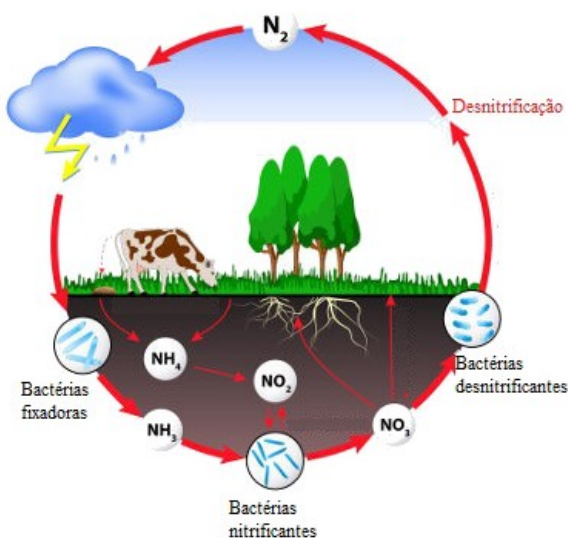
## **21. A IMPORTÂNCIA DO PROCESSO DE DESNITRIFICAÇÃO EM CORPOS HÍDRICOS**

As influências antropogênicas resultaram em grandes mudanças no ciclo de nitrogênio da terra. Dentre o conjunto de consequências em cascata decorrentes de aumentos maciços de adições de N, principalmente pelo uso intensivo de fertilizantes nitrogenados e aumentos nas emissões de combustíveis fósseis, está a eutrofização dos ecossistemas de água doce e costeiros (CONLEY et al., 2009; GALLOWAYET et al., 2008).

Ações antrópicas, além de aumentar a disponibilidade do N, provocam outro agravante, a mobilidade de N, ou seja, embora a maioria das aplicações deliberadas ocorra localmente, sua influência é a âmbito regional ou até mesmo mundial (VITOUSEK et al., 1997).

Após o oxigênio, carbono e hidrogênio, o nitrogênio (N) é o quarto elemento mais abundante na atmosfera (CONLEY et al., 2009) facilmente oxidado ou reduzido, por outro lado o gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) é praticamente inerte, de modo que os organismos conseguem fixá-lo somente quando o N se encontra na forma orgânica (VIDALI et al., 2001). As três principais etapas do ciclo do nitrogênio são fixação, nitrificação e desnitrificação (Figura 22). A desnitrificação é um processo gradual de redução de

nitrogênio em quatro etapas: redução de nitrato, de nitrato a nitrito, de nitrito a ácido nitroso e de ácido nitroso a óxido nítrico.



**Figura 22:** As três principais etapas do ciclo do nitrogênio: fixação, nitrificação e **desnitrificação**

Fonte: <http://escolakids.uol.com.br/ciclo-nitrogenio.htm> acesso 06/03/2017

Um importante processo microbiano em termos de qualidade de água é a desnitrificação, no qual microrganismos são capazes de reduzir o N, contribuindo assim na redução da eutrofização e protegendo os corpos hídricos. A desnitrificação é um processo que transforma o nitrogênio em gás que é devolvido para a atmosfera, sendo assim a desnitrificação tem um papel chave para manter a qualidade da água por realizar a remoção de nitrogênio dos corpos hídricos (YU & LIU, 2014).

A desnitrificação heterotrófica é um importante processo microbiano em termos de qualidade de água, pois de acordo com Alexander et al. (2000), do total de N antropogênico que entra em bacias hidrográficas, 75% se perdem no fluxo da paisagem ao longo do caminho, influenciados pelas características físicas e químicas dos corpos hídricos, antes de atingir os oceanos por desnitrificação heterotrófica.

Os requisitos para a realização da desnitrificação biológica em geral são: possuir capacidade metabólica, aceitar o elétron como componente de carbono orgânico, condições anaeróbicas ou restrições de oxigênio, e presença de óxidos de nitrogênio (PHILIPPOT et al., 2007).

Segundo Zumft (1997), embora as bactérias com capacidade de desnitrificação pertençam a uma ampla variedade de grupos, são um pouco mais frequentes entre as classes alfa e beta das Proteobactérias e conforme Yu et al. (2014), a compreensão da função das comunidades desnitrificantes pode ser útil na tomadas de decisões e no gerenciamento de reservatórios estratificados.

A bactéria do gênero *Dechloromonas*, pertencente à classe Betaproteobacteria, embora não esteja entre as dez mais abundantes em nosso estudo, é considerada na literatura como um microrganismo que tem um papel importante no processo de desnitrificação no meio ambiente aquático, de modo que fizemos um levantamento de artigos que abordam seu papel neste processo.

### **21.1. *Dechloromonas***

Embora a bactéria *Dechloromonas* não esteja incluída entre as dez mais UTOs sequenciadas da nossa pesquisa, motivo pelo qual não fizemos nenhuma análise com ela, notamos que há vários artigos que a descrevem como participante no processo de redução de nitrato nos corpos hídricos. Em nossa investigação o gênero *Dechloromonas* (OTU 8 e OTU 11) foi identificado e pertence à classe Betaproteobacteria, ordem Rhodocyclales e família Rhodocyclaceae.

A investigação de Yu (2014) abordou os diferentes papéis de comunidades de bactérias desnitrificadoras, as suas distribuições, as principais etapas de seus processos de desnitrificação e sua identificação em um reservatório profundo de água doce subtropical com forte estratificação em uma zona mínima de oxigênio.

Com o objetivo de compreender melhor o processo das ligações entre as comunidades desnitrificadoras, suas funções e como juntas conseguem concluir o processo de desnitrificação, as bibliotecas de clones 16 s rRNA, *Narg* (nitrato redutase), *NIRS/NIRK* (nitrito redutase), *Norb* (redutase do óxido nítrico) e *nosZ* (redutase do óxido nitroso) dos genes que codificam enzimas nas etapas de desnitrificação foram construídas com sucesso. Foram sequenciadas as comunidades em nível de gênero/espécie, sendo que a classe dominante foi a pertencente a  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -Proteobacteria, cujo *NIRS* gene foi dominada por *Dechloromonas* (YU et al., 2014).

Espécies pertencentes ao gênero *Dechloromonas* foram identificadas entre os microrganismos funcionais responsáveis pela desnitrificação numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR) capaz de eliminar N (CHEN et al., 2016). Também foram bactérias dominantes no processo de desnitrificação do N em nitrato e nitrito em dois reatores de leito fluidizado contaminados por compostos nitrogenados e metais pesados (ZOU et al., 2014).

Uma investigação sobre como os efeitos biológicos concomitantes com fatores geoquímicos contribuem com o sequestro de arsênico em sedimentos de um lago contaminado expostos a nitrato, indicou uma abundância de populações bacterianas associadas à respiração de produtos clorados e orgânicos, inclusive bactérias pertencentes ao gênero *Dechloromonas* conforme dados gerados pelo sequenciamento 16S rRNA (GIBNEY et al., 2007).

O vale de San Joaquin, Califórnia, gera água de drenagem agrícola com elevados níveis de Se e N que necessitam serem descarregados em zonas úmidas e em lagos próximos. Como alternativa de baixo custo e eficiência, a combinação das bactérias *Bacillus sp.* com *Dechloromonas sp.* foram utilizadas e se mostraram capazes de remediar essas águas contaminadas por reduzir significativamente os níveis de Se e N (ZHANG et al., 2007).

Mudanças sazonais exercem influencia sobre este gênero conforme descreve o estudo de comunidades bacterianas nas amostras retiradas dos biofilmes no rio Garonne (sudoeste da França), estudadas utilizando 16S rRNA em cadeia de gradiente polimerase seguido por análise de sequenciamento, destacou a sucessão bacteriana como um processo natural impulsionado pelos próprios organismos. Os biofilmes foram amostrados no período de sete meses e durante a segunda fase de acumulação de biomassa epilíticas, entre as estações do verão e do outono, houve o aparecimento de cinco OTUs na riqueza bacteriana, entre os quais a *Dechloromonas sp.*, sugerindo a influência de fatores sazonais sobre estas comunidades (LYAUTEY et al., 2005).

Estudos também abordam *Dechloromonas* com potencial de degradação de metais pesados, conforme exemplos a seguir.

*Dechloromonas* foi detectado numa pesquisa que descreveu a diversidade microbiana e seu potencial biogeoquímico num biofilme nos rejeitos de minas de urânio

em colunas de águas com pH elevado. A presença de 11 filos foi sequenciada, a maioria afiliados com quatro linhagens principais (Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes). *Dechloromonas* estava entre o grupo de bactérias capazes de utilizar hidrocarbonetos reduzindo o ferro dentro de todas as amostras de biofilme examinados (BONDICI et al., 2014).

Solventes orgânicos, tais como hidrocarbonetos (compostos aromáticos e alifáticos clorados) possuem poder acumulativo nos ecossistemas constituindo assim uma ameaça para o meio ambiente. Usando a tecnologia metagenômica, foram analisados microrganismos capazes de metabolizar estes compostos a partir de amostras de águas subterrâneas na província de KwaZulu-Natal na África do Sul.

Os dados taxonômicos revelaram como dominantes o filo Proteobacteria, especialmente a classe Betaproteobacteria, tendo como o microrganismo *Dechloromonas*, entre os envolvidos na degradação dos compostos aromáticos e outros hidrocarbonetos presentes nas amostras. As análises obtidas com os dados metagenômicos mostraram o potencial de degradação de metais pesados por essas comunidades microbianas (ABBAL, et al., 2013).

Embora haja artigos que comprovem sua biomineralização baseados em sedimentos e enriquecimentos microbianos, Coates et al. (2001) utilizou organismos em cultura pura para degradar o benzeno (contaminante largamente utilizado em muitos processos, inclusive é o componente principal de combustíveis à base de petróleo) de maneira anaeróbia e relata duas estirpes *Dechloromonas* que realizam a mineralização completa na ausência de oxigênio, demonstrando assim o potencial de aplicabilidade destas bactérias para tratamento de ambientes contaminados.

Além de ser redutor de nitrato e metais pesados o estudo de Achenbach classifica *Dechloromonas* como redutora do sal clorato. Dentre as 20 novas linhagens de bactérias, todas pertencentes aos membros das proteobactérias capazes de reduzir clorato, foram isoladas de uma ampla diversidade de ambientes, incluindo de sedimentos e identificadas através da análise filogenética como dois gêneros *Dechloromonas* que predominaram entre as bactérias redutoras de clorato (ACHENBACH et al., 2001).

## 22. ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS DESNITRIFICANTES

A eficiência das bactérias no processo de desnitrificação acontece quando existe uma associação com outras bactérias, onde mais microrganismos participam na atenuação ou remoção completa dos poluentes em corpos hídricos. A seguir estão alguns estudos de associação entre as bactérias *Dechloromonas* e três das dez mais abundantes de nossa investigação, todas pertencentes à classe Betaproteobacteria.

Estes estudos podem contribuir para a melhor compreensão das relações entre as comunidades bacterianas, suas funções e como elas funcionam juntas para concluir o processo de desnitrificação que poderá ser útil na avaliação de como o uso de solo nas bacias e respectivas APPs estão afetando a biodiversidade bacteriana nesses ecossistemas.

### 22.1. *Dechloromonas* e *Elstera*

Foram estudadas a diversidade bacteriana e archaeal em duas fontes termais alcalinas no nordeste da Índia, Jakrem (Meghalaya) e Yumthang (Sikkim) com o objetivo de entender a influência das propriedades físico-químicas da primavera quente sobre a diversidade microbiana. Dos treze principais filos de bactérias sequenciados foi identificado o filo Proteobacteria cuja classe estava correlacionada especificamente com sulfeto total. Dentro da classe de Proteobacteria, *Elstera litoralis*, uma espécie da família Rhodospirillaceae foi observada pela primeira vez em associação com fontes de água quente juntamente com o gênero *Dechloromonas*, entre outras (PANDA et al., 2016).

### 22.2. *Dechloromonas*, *Ideonella* e *Pelomonas*

Para avaliar e comparar comunidades bacterianas em águas de dois viveiros de piscicultura com alto grau de eutrofização, tanto no período da seca e no período das chuvas, o sequenciamento 16S rRNA classificou de maneira significativamente as Proteobacterias. Entre as bactérias classificadas na classe Betaproteobacteria e na ordem

Burkholderiales foram encontradas *Ideonella*, *Pelomonas* e *Dechloromonas* e da classe Alphaproteobacteria, a ordem *Rhizobiales* entre outros, no período da seca. Duas diferenças foram importantes na participação dos ciclos biogeoquímicos das bactérias, o período hidrológico e a concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo e salinidade do sistema aquático (MENECHINE A. K., 2013).

### **22.3. *Dechloromonas*, *Ideonella* e *Rhodoferrax***

No estudo de McIlroy et al. (2014), entre a diversidade de bactérias desnitrificantes ativas representadas na biblioteca de genes de DNA através do 16S rRNA estão os membros *Rhodoferrax* e *Dechloromonas*, que tiveram um papel essencial para a remoção do nitrogênio de águas residuais (ETAR) em escala completa.

O clorato produzido industrialmente tem sido usado na agricultura como agente herbicida, e também é um subproduto de desinfecção de água e de branqueamento de celulose com cloro. Um estudo que investigou redução de clorato por bactérias em amostras de sedimentos do efluente de uma fábrica de celulose detectou espécies dos gêneros *Dechloromonas* e *Ideonella* que em associação com outras bactérias apresentou um elevado potencial de atenuação do clorato (SCHWARZ et al., 2012).

### **22.4. *Pelomonas*, *Rhodoferrax* e *Ideonella***

Entre as bactérias endofíticas encontradas em folhas de taboa (*Typha angustifolia* L.) na China através da técnica da biblioteca 16S rRNA estão as Proteobacterias, a maioria dos subgrupos beta e gama, sendo que entre os gêneros dominantes incluídos estão *Rhodoferrax*, *Pelomonas*, *Rhizobium* e *Ideonella*, entre outros.

Embora as bactérias *Rhizobium* sejam fixadoras de nitrogênio para o melhor desenvolvimento das plantas, as *Pelomonas*, *Ideonella* e *Rhodoferrax* desempenham um papel biológico muito importante com potencial para metabolizar compostos orgânicos

através da fitorremediação de águas eutróficas removendo nitrogênio, fósforo e/ou matéria orgânica (LI, et al., 2011).

O estudo de Li et. al. (2011) confirmou que a estrutura e função das bactérias endofíticas são moldadas pelas condições do meio ambiente e pela identidade das espécies de plantas. Portanto, a utilização destas comunidades no processo de fitorremediação poderia ser uma abordagem poderosa para a restauração de sistemas eutróficos.

Outra pesquisa sobre os efeitos que uma espécie invasora de taboa (*Typha x glauca*) na comunidade microbiana numa zona úmida de água doce no Lago Huron, Cheboygan Marsh demonstrou que a taboa pode afetar a capacidade da zona úmida para remover nutrientes aumentando significativamente amônio solúvel, nitrato e fósforo.

Análises baseadas em genes 16 rRNA e comunidades desnitrificantes em *NIRSgenes* revelaram diferenças significativas entre as comunidades bacterianas totais que, juntamente com as mudanças físicas, químicas e biológicas, sugere que a taboa afeta os processos de ciclagem de nutrientes como a desnitrificação, desempenhando assim um papel ecologicamente significativo na remoção de nitrogênio (ANGELONI et al., 2006).

Em reservatórios de água doce o fósforo é o nutriente mais limitante, já em estuários e oceanos a limitação é o nitrogênio, de modo que o processo de desnitrificação é de extrema importância, pois promove a proteção da qualidade da água por remover nitratos e nitritos das águas interiores antes de essas entrarem nos ambientes costeiros e conduzir a eutrofização nesses ecossistemas (YU, et al., 2014).

## **23. DISCUSSÃO**

Através do resultado do sequenciamento do gene 16S rRNA, das 31 amostras na região de Caconde, oito dentre as dez OTUs mais abundantes foram identificadas como pertencentes ao filo Proteobacteria. A abundância desses microrganismos sugere que esses participaram do processo de desnitrificação, pois segundo Newton et al. (2011), as Proteobacteria são um grupo de bactérias residentes e abundantes em água doces,



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

Desse filo, podemos destacar os gêneros *Pelomonas*, *Rhodoferrax* e *Ideonella* da classe Betaproteobacterias cujos estudos mostraram serem eficientes nesse processo de desnitrificação por participarem na atenuação ou remoção completa dos poluentes em corpos hídricos. Outros estudos as associam com a bactéria desnitrificante *Dechloromonas* pertencente à mesma classe e também identificada em nosso estudo. Isto sugere que essa associação poderia ser melhor estudada para maior compreensão do papel que cada uma atua para a remoção do nitrato e potencialmente serem usadas como bioindicadoras da qualidade da água nos rios e córregos na região de Caconde.

## 24. CONCLUSÃO

Nosso estudo correlacionou a comunidade bacteriana entre bacias hidrográficas e respectivas APPs com diferentes composições e configurações da paisagem, e concluiu que de maneira geral o impacto bacteriano é maior a distâncias menores que 2.000 metros do ponto de coleta.

A identificação através do sequenciamento juntamente com os dados do uso de solo, tornou possível utilizarmos índices de similaridade para distância que indicou que a diversidade bacteriana está sendo impactada até 2.000 metros do ponto de amostragem.

A correlação nitrato com as OTUs, tanto no uso de solo “pasto” como no uso de solo “florestas” apresentou uma correlação das APPs muito similar indicando uma relação deste ecossistema com o componente nitrato. Para ressaltar a presença do elemento nitrato em corpos hídricos próximos a áreas agrícolas, um estudo similar realizado em córregos e rios de Porto Rico, cujo objetivo foi analisar a composição da comunidade bentônica dos biofilmes em riachos tropicais ao longo do uso do solo e analisar a relação entre as bacias hidrográficas para determinar como essas variáveis influenciaram a composição e diversidade da comunidade dos biofilmes bentônicos, seus resultados indicaram que o nitrato foi a variável que melhor explicou as variações na diversidade dos biofilmes bacterianos (BURGOS-CARABALLO et al., 2014).

A intenção por trás da avaliação do efeito da paisagem em escalas múltiplas foi encontrar uma escala biologicamente significativa considerada importante para a saúde dos rios e riachos estudados em torno do reservatório de Caconde, administrado pela empresa AES - Tietê. A composição do biofilme bacteriano usando “armadilhas” de baixo custo foi analisada utilizando *Next-Generation Sequencing* (NGS), que identificou entre as dez mais abundantes bactérias o filo Proteobacterias na sua maioria, algumas das quais potencialmente poderiam ser usadas como bioindicadores da qualidade da água nessas bacias.

Uma melhor compreensão da comunidade bacteriana dos sistemas hídricos é necessária para projetar estratégias de biocontrole inovadoras e eficazes que garantam a qualidade da água nesses ecossistemas. A identificação das bactérias “chaves” que formam os biofilmes pode permitir a renovação de informações necessárias para melhorar a qualidade da água.

Como nossa pesquisa identificou algumas bactérias classificadas na literatura como microrganismos capazes de atenuar ou remover poluentes nos sistemas hídricos, seria interessante usarmos para próximos estudos *primers* específicos para identificarmos esses grupos taxonômicos. Em especial *primers* para identificar a bactéria *Dechloromonas* por ser largamente citada em artigos como desnitrificante, para compreendermos mais claramente seu papel chave nesse processo de remoção do nitrogênio.

Potencialmente nosso estudo poderia ser aplicado em outras bacias com características semelhantes para avaliarmos se nosso modelo poderia ser replicado em outras regiões tropicais.

## 25. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbai, N. S., & Pillay, B. (2013). Analysis of hydrocarbon-contaminated groundwater metagenomes as revealed by high-throughput sequencing. *Molecular biotechnology*, 54(3), 900-912.
- Achenbach, L. A., Michaelidou, U., Bruce, R. A., Fryman, J., & Coates, J. D. (2001). *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per) chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 527-533.
- Alexander, R. B., Smith, R. A., & Schwarz, G. E. (2000). Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature*, 403(6771), 758-761.
- Allan, J. D. (2004). Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 257-284
- Andrietti, G., Freire, R., do Amaral, A. G., de Almeida, F. T., Bongiovani, M. C., & Schneider, R. M. Índices de qualidade da água e de estado trófico do rio Caiabi, MT. *Revista Ambiente & Água, Taubaté*, v.11, n.1, p.162-175, 2016.
- Angeloni, N. L., Jankowski, K. J., Tuchman, N. C., & Kelly, J. J. (2006). Effects of an invasive cattail species (*Typha* × *glauca*) on sediment nitrogen and microbial community composition in a freshwater wetland. *FEMS microbiology letters*, 263(1), 86-92.
- Antunes, S., Dias, E., & Péricles, S. P. A. M. (1969). Influência da declividade no solo.
- Baldani, J. I., Videira, S. S., dos Santos Teixeira, K. R., Reis, V. M., de Oliveira, A. L. M., Schwab, S., ... & Hartmann, A. (2014). The family rhodospirillaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 533-618). Springer Berlin Heidelberg.
- Battin, T. J., Sloan, W. T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I. M., Curtis, T. P., & Eberl, L. (2007). Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 76-81.
- Batut, J., Andersson, S. G., & O'Callaghan, D. (2004). The evolution of chronic infection strategies in the  $\alpha$ -proteobacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 933-945.

Beatty, J. T., Overmann, J., Lince, M. T., Manske, A. K., Lang, A. S., Blankenship, R. E., ... & Plumley, F. G. (2005). An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9306-9310.

Besemer, K. (2015). Biodiversity, community structure and function of biofilms in stream ecosystems. *Research in microbiology*, 166(10), 774-781.

Bicalho, S. T. T., Langenbach, T., Rodrigues, R. R., Correia, F. V., Hagler, A. N., Matallo, M. B., & Luchini, L. C. (2010). Herbicide distribution in soils of a riparian forest and neighboring sugar cane field. *Geoderma*, 158(3), 392-397.

Bondici, V. F., Khan, N. H., Swerhone, G. D. W., Dynes, J. J., Lawrence, J. R., Yergeau, E., ... & Korber, D. R. (2014). Biogeochemical activity of microbial biofilms in the water column overlying uranium mine tailings. *Journal of applied microbiology*, 117(4), 1079-1094.

Bonfim-da-Silva, E. M., & Monteiro, F. A. (2006). Nitrogênio e enxofre em características produtivas do capim-braquiária proveniente de área de pastagem em degradação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4), 1289-1297.

Brasil. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012.

Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological monographs*, 27(4), 325-349.

Bryantseva, I. A., Gaisin, V. A., & Gorlenko, V. M. (2015). *Rhodobaculum claviforme* gen. nov., sp. nov., a new alkaliphilic nonsulfur purple bacterium. *Microbiology*, 84(2), 247-255.

Burgos-Caraballo, S., Cantrell, S. A., & Ramírez, A. (2014). Diversity of benthic biofilms along a land use gradient in tropical headwater streams, Puerto Rico. *Microbial ecology*, 68(1), 47-59  
Carpenter, S. R.,

Buss, D. F., Baptista, D. F., & Nessimian, J. L. (2003). Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios  
Conceptual basis for the application of biomonitoring on stream water. *Cad. Saúde Pública*, 19(2), 465-473.

- Callisto, M., Gonçalves Jr, J. F., & Moreno, P. (2005). Invertebrados aquáticos como bioindicadores. *Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais, 1*, 1-12.
- Campos, M. D. (2015). Diagnóstico do conflito de uso do solo em áreas de preservação permanente do Ribeirão das Posses (Igarapu do Tietê-SP) visando a conservação dos recursos hídricos.
- Caraco, N. F., Correll, D. L., Howarth, R. W., Sharpley, A. N., & Smith, V. H. (1998). Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological applications, 8*(3), 559-568
- Chapman, D. V. (Ed.). (1996). Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments, and water in environmental monitoring.
- Chen, Y., Zhao, Z., Peng, Y., Li, J., Xiao, L., & Yang, L. (2016). Performance of a full-scale modified anaerobic/anoxic/oxic process: High-throughput sequence analysis of its microbial structures and their community functions. *Bioresource Technology, 220*, 225-232.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of statistics, 265-270*.
- Cianciaruso, M. V., Silva, I. A., & Batalha, M. A. (2009). Diversidades filogenética e funcional: novas abordagens para a Ecologia de comunidades. *Biota Neotropica, 9*(3), 93-103.
- Clapcott, J. E., Young, R. G., Goodwin, E. O., & Leathwick, J. R. (2010). APPLIED ISSUES: Exploring the response of functional indicators of stream health to land-use gradients. *Freshwater Biology, 55*(10), 2181-2199.
- Coates, J. D., Chakraborty, R., Lack, J. G., O'Connor, S. M., Cole, K. A., Bender, K. S., & Achenbach, L. A. (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of Dechloromonas. *Nature, 411*(6841), 1039-1043.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Karl, E., ... & Gene, E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science, 123*, 1014-1015.

- Costanza, R., & Mageau, M. (1999). What is a healthy ecosystem?. *Aquatic ecology*, 33(1), 105-115.
- Criado, R. C. (2012). Análise do uso da terra nas áreas de preservação permanente dos corpos d'água da bacia do córrego espraiado como subsídio para pagamentos por serviços ambientais..
- de Amorim, H. R. (2003). Estudo dos atributos do meio físico como base para o zoneamento geoambiental da região de influência do reservatório da usina hidroelétrica de Caconde (SP), escala: 1: 50.000, com uso de geoprocessamento (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- de Mattos, W. T., & Monteiro, F. A. (2003). Produção e nutrição do capim-braquiária em função de doses de nitrogênio e enxofre. *Boletim de Indústria Animal*, 60(1), 1-10.
- de Paula Lima, W. (2008). Hidrologia florestal aplicada ao manejo de bacias hidrográficas. Universidade de São Paulo.
- de Sousa, S. M., & Carneiro, A. A. (2009). Decifrando o genoma em grande escala.
- Degli Esposti, M., Rosas-Pérez, T., Servín-Garcidueñas, L. E., Bolaños, L. M., Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2015). Molecular evolution of cytochrome bd oxidases across proteobacterial genomes. *Genome biology and evolution*, 7(3), 801-820.
- Di, H. J., & Cameron, K. C. (2002). Nitrate leaching and pasture production from different nitrogen sources on a shallow stoney soil under flood-irrigated dairy pasture. *Soil Research*, 40(2), 317-334.
- Diagnostics, R. (2009). Amplicon Fusion Primer Design Guidelines for GS FLX Titanium Series Lib-A Chemistry *Technical Bulletin: Genome Sequencer FLX System. TCB*, (013-2009).
- Dias, G. (2010). Florística e fitossociologia das espécies arbóreas de ocorrência e mata ciliar no Alto Rio Pardo, na estância climática de Caconde-SP.
- Doledec, S., Phillips, N., & Townsend, C. (2011). Invertebrate community responses to land use at a broad spatial scale: trait and taxonomic measures compared in New Zealand rivers. *Freshwater Biology*, 56(8), 1670-1688.

Doledec, S., Phillips, N., & Townsend, C. (2011). Invertebrate community responses to land use at a broad spatial scale: trait and taxonomic measures compared in New Zealand rivers. *Freshwater Biology*, 56(8), 1670-1688.

Donadio, N. M., Galbiatti, J. A., & Paula, R. C. D. (2005). Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do córrego rico, São Paulo, Brasil. *Engenharia Agrícola*.

Eidt, J. I., Andrietti, G., de Figueiredo, L. F., Demarqui, E. N., de Andrade, R. L. T., do Amaral, A. G., ... & de Almeida, F. T. (2016). Monitoring metals in surface water of a small watershed in Amazon region. *Nativa*, 4(4), 187-194.

Finneran, K. T., Johnsen, C. V., & Lovley, D. R. (2003). *Rhodoferax ferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe (III). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 669-673.

Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., ... & Helkowski, J. H. (2005). Global consequences of land use. *science*, 309(5734), 570-574.

Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., ... & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889-892.

Gibney, B. P., & Nüsslein, K. (2007). Arsenic sequestration by nitrate respiring microbial communities in urban lake sediments. *Chemosphere*, 70(2), 329-336.

Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, 347-371.

Glöckner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., & Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 5053-5065

Gouveia, C. A. R. (2013). *Nitrification control: how do the natural ecosystem do it?* (Doctoral dissertation).

- Hermes, L. C., Fay, E. F., BUSCHINELLI, C. D. A., SILVA, A. D. S., & SILVA, E. D. F. (2004). Participação comunitária em monitoramento da qualidade da água. *Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica*.
- Holland, J. M. (2004). The environmental consequences of adopting conservation tillage in Europe: reviewing the evidence. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103(1), 1-25.
- Horner-Devine, M. C., Lage, M., Hughes, J. B., & Bohannon, B. J. (2004). A taxa–area relationship for bacteria. *Nature*, 432(7018), 750-753.
- Hougardy, A., & Klemme, J. H. (1995). Nitrate reduction in a new strain of *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of microbiology*, 164(5), 358-362.
- Hutalle-Schmelzer, K. M. L., Zwirnmann, E., Krüger, A., & Grossart, H. P. (2010). Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. *FEMS microbiology ecology*, 72(1), 58-73.
- Imhoff, J. F. (2014). Biology of green sulfur bacteria. *eLS*.
- Iñiguez–Armijos, C., Leiva, A., Frede, H. G., Hampel, H., & Breuer, L. (2014). Deforestation and benthic indicators: how much vegetation cover is needed to sustain healthy Andean streams?. *PloS one*, 9(8), e105869.
- Jensen, S., Frost, P., & Torsvik, V. L. (2009). The nonrandom microheterogeneity of 16S rRNA genes in *Vibrio splendidus* may reflect adaptation to versatile lifestyles. *FEMS microbiology letters*, 294(2), 207-215.
- Johannsen, S. S., & Armitage, P. (2010, May). Agricultural practice and the effects of agricultural land-use on water quality. In *Freshwater Forum* (Vol. 28).
- Kim, H., Kaown, D., Mayer, B., Lee, J. Y., Hyun, Y., & Lee, K. K. (2015). Identifying the sources of nitrate contamination of groundwater in an agricultural area (Haeon basin, Korea) using isotope and microbial community analyses. *Science of the Total Environment*, 533, 566-575.
- King, A. J., Freeman, K. R., McCormick, K. F., Lynch, R. C., Lozupone, C., Knight, R., & Schmidt, S. K. (2010). Biogeography and habitat modelling of high-alpine bacteria. *Nature communications*, 1, 53.



- Kuntschik, D. P., Eduarte, M., & Uehara, T. H. K. (2011). *Matas ciliares* (Vol. 7). SMA.
- Lang, S., Tiede, D., Maier, B., & Blaschke, T. (2009). 3D Forest structure analysis from optical and LIDAR data. *Ambiência*, 2(3), 95-110.
- Lear, G., Dopheide, A., Ancion, P. Y., Roberts, K., Washington, V., Smith, J., & Lewis, G. D. (2012). Biofilms in freshwater: their importance for the maintenance and monitoring of freshwater health. *Microbial Biofilms: Current research and applications*, 129-151.
- Lepsch, I. F. (2016). *Formação e conservação dos solos*. oficina de textos.
- Li, L., Zheng, B., & Liu, L. (2010). Biomonitoring and bioindicators used for river ecosystems: definitions, approaches and trends. *Procedia environmental sciences*, 2, 1510-1524.
- Li, Y. H., Liu, Q. F., Liu, Y., Zhu, J. N., & Zhang, Q. (2011). Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *Research in microbiology*, 162(2), 124-131.
- Lima, D. A. S. Influência da mata ciliar na qualidade da água na bacia do Ribeirão Lajeado – TO, 2010.
- Liou, J. C., DeRito, C. M., & Madsen, E. L. (2008). Field-based and laboratory stable isotope probing surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing microorganisms in freshwater sediment. *Environmental microbiology*, 10(8), 1964-1977.
- Lu, X. M., & Lu, P. Z. (2014). Characterization of bacterial communities in sediments receiving various wastewater effluents with high-throughput sequencing analysis. *Microbial ecology*, 67(3), 612-623.
- LUZ, M. D. S., Ferreira, G. B., & Bezerra, J. R. C. (2002). Adubação e correção do solo: procedimentos a serem adotados em função dos resultados da análise do solo. *Circular técnica*.

- Lyautey, E., Jackson, C. R., Cayrou, J., Rols, J. L., & Garabétian, F. (2005). Bacterial community succession in natural river biofilm assemblages. *Microbial Ecology*, 50(4), 589-601.
- Machado, H., & Gram, L. (2015). The fur gene as a new phylogenetic marker for Vibrionaceae species identification. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2745-2752.
- Martins, F. R., & Santos, F. D. (1999). Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. *Revista Holos*, 1(1), 236-267.
- Martins, M. D., Fernandes, C. S., & Valente, J. T. (2004). Water contamination by pesticides. Case study: pesticides research in the Lower Cávado River Basin. In *WORLDWATER CONGRESS* (Vol. 4).
- Martiny, J. B., Eisen, J. A., Penn, K., Allison, S. D., & Horner-Devine, M. C. (2011). Drivers of bacterial  $\beta$ -diversity depend on spatial scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7850-7854.
- Matthews, R. A., Buikema, A. L., Cairns, J., & Rodgers, J. H. (1982). Biological monitoring: Part IIA—receiving system functional methods, relationships and indices. *Water Research*, 16(2), 129-139.
- McGarigal, K., & Marks, B. J. (1995). Spatial pattern analysis program for quantifying landscape structure. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-351. US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.*
- McIlroy, S. J., Starnawska, A., Starnawski, P., Saunders, A. M., Nierychlo, M., Nielsen, P. H., & Nielsen, J. L. (2014). Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental microbiology*.
- Melo, A. S. (2008). O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade. *Biota Neotropica*, 8(3), 21-27.
- Meneghini, A. K. (2013). Diversidade bacteriana em piscicultura neotropical.
- Menezes, C. T. (2007). *Método para priorização de ações de vigilância da presença de agrotóxicos em águas superficiais: um estudo em Minas Gerais* (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado. Universidade federal de Minas Gerais, 2006.117 p).

- Menezes, M. D., Junqueira Júnior, J. A., MELLO, C. D., SILVA, A. D., Curi, N., & Marques, J. J. (2009). Dinâmica hidrológica de duas nascentes, associada ao uso do solo, características pedológicas e atributos físico-hídricos na sub-bacia hidrográfica do Ribeirão Lavrinha-Serra da Mantiqueira (MG). *Scientia Forestalis*, 37(82), 175-184.
- Meyer, J. L. (1997). Stream health: incorporating the human dimension to advance stream ecology. *Journal of the North American Benthological Society*, 439-447.
- Moraes, F. T., & Jiménez-Rueda, J. R. (2008). Fisiografia da região do planalto de Poços de Caldas, MG/SP. *Revista Brasileira de Geociências*, 38(1), 196-208.
- Moreno, P., & Callisto, M. (2005). Bioindicadores de qualidade de água ao longo da v-bacia do Rio das Velhas (MG). *Bioindicadores de qualidade de água*.
- Mori, G. B., de Paula, F. R., de Barros Ferraz, S. F., Camargo, A. F. M., & Martinelli, L. A. (2015). Influence of landscape properties on stream water quality in agricultural catchments in Southeastern Brazil. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 51, No. 1, pp. 11-21). EDP Sciences.
- Morris, R. M., Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., Siebold, W. A., Carlson, C. A., & Giovannoni, S. J. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*, 420(6917), 806-810.
- Muscutt, A. D., Harris, G. L., Bailey, S. W., & Davies, D. B. (1993). Buffer zones to improve water quality: a review of their potential use in UK agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 45(1-2), 59-77.
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141.
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14-49.
- Novo, A. L. M., & Camargo, A. D. (2002). Manejo intensivo de pastagens. *Curso à Distância em Bovinocultura Leiteira. Módulo III. Manejo de pastagens. Instituto Fernando Costa. São Paulo*.

Panda, A. K., Bisht, S. S., Mandal, S., & Kumar, N. S. (2016). Bacterial and archeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India. *AMB Express*, 6(1), 111.

Pereira, V.P. Solo: manejo e controle de erosão hídrica. Jaboticabal: FCAV, 1997.

Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of theoretical biology*, 13, 131-144.

Pinheiro, K. D. C. (2015). Avaliação do viés GC em plataformas de sequenciamento de nova geração.

Poindexter, J. S. (2005). Caulobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

Pommier, T., Canbäck, B., Riemann, L., Boström, K. H., Simu, K., Lundberg, P., ... & Hagström, Å. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular ecology*, 16(4), 867-880.

Primack, R. B. & Rodrigues, E. Biologia da Conservação. Editora Planta, Londrina, PR. 2001

Primavesi, O., Freitas, A. R. D., Primavesi, A. C., & Oliveira, H. T. D. (2002). Water quality of the Canchim s creek watershed in São Carlos, SP, Brazil, occupied by beef and dairy cattle activities. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(2), 209-217.

Primavesi, O., Primavesi, A. C., Correa, L. A., Silva, A. G., & Cantarella, H. (2006). Lixiviação de nitrato em pastagem de coastcross adubada com nitrogênio. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(3), 683-690.

Proia, L. (2012). Biofilm responses to multiple stressors associated to global change in river ecosystems.

Proia, L. (2012). Biofilm responses to multiple stressors associated to global change in river ecosystems.

Quinn, J. M., & Stroud, M. J. (2002). Water quality and sediment and nutrient export from New Zealand hill-land catchments of contrasting land use. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 36(2), 409-429.

- Rahalkar, M. C., Pore, S., Arora, P., Pandit, P., Kapse, N., Bahulikar, R., ... & Dhakephalkar, P. K. (2015). Draft genome of *Elstera litoralis*, a freshwater epilithic biofilm associated bacterium from littoral zone of Lake Constance. *Marine genomics*, 24, 223-224.
- Reinert, D. J., & Reichert, J. M. (2006). Propriedades física do solo. *Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria/Centro de Ciências Rurais*.
- Roley, S. S., Griffiths, J. R., Levi, P. S., Patrick, C. J., Sadro, S., & Zarnetske, J. P. (2014). Taking the pulse of the ecosystem: progress in quantifying aquatic ecosystem health. In *Eco-DAS X Symposium Proceedings. Association for the Sciences of Limnology and Oceanography, Waco, Texas*. (Available from: [http://aslo.org/books/ecodas10/ecodas10\\_088.html](http://aslo.org/books/ecodas10/ecodas10_088.html)) (pp. 88-105).
- Saarenheimo, J., Tirola, M. A., & Rissanen, A. J. (2015). Functional gene pyrosequencing reveals core proteobacterial denitrifiers in boreal lakes. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Sabater, S., Guasch, H., Ricart, M., Romaní, A., Vidal, G., Klunder, C., & Schmitt-Jansen, M. (2007). Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1425-1434.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Psenner, R., & Posch, T. (2005). Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic microbial ecology*, 38(3), 215-229.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Zeder, M., Psenner, R., & Posch, T. (2008). Spatio-temporal niche separation of planktonic Betaproteobacteria in an oligo-mesotrophic lake. *Environmental microbiology*, 10(8), 2074-2086..
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Schwarz, A. O., Urrutia, H., Vidal, J. M., & Pérez, N. (2012). Chlorate reduction capacity and characterisation of chlorate reducing bacteria communities in sediments of the rio Cruces wetland in southern Chile. *Water research*, 46(10), 3283-3292.

Setzer, J. (1956). A natureza e as possibilidades do solo no vale do Rio Pardo entre os municípios de Caconde, SP e Poços de Caldas, MG. *Revista Brasileira de Geografia*, 3, 3-37.

Silva, J. M. D., Novato-Silva, E., Faria, H. P., & Pinheiro, T. M. M. (2005). Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciência & saúde coletiva*, 10(4), 891-903.

Silva, L. S. (2016). Mineralogia da fração argila dos solos do Planalto Ocidental Paulista.

Simões, L. C., Simoes, M., & Vieira, M. J. (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6192-6200.

Sobrinho, T. A., Vitorino, A. C., Souza, L. C. D., Gonçalves, M. C., & Carvalho, D. F. D. (2003). Infiltração de água no solo em sistemas de plantio direto e convencional. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 7(2), 191-196.

Spring, S., Scheuner, C., Göker, M., & Klenk, H. P. (2015). A taxonomic framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. *Frontiers in microbiology*, 6.

Staley, J. T. (1971). Incidence of prosthecate bacteria in a polluted stream. *Applied microbiology*, 22(4), 496-502.

Stipp, S. R., & Casarin, V. (2010). A importância do enxofre na agricultura brasileira. *Piracicaba: IPNI-Brasil*, 14-20.

Suzuki, M. T., Thompson, F., & Gonzalez, J. M. Stefan Spring\*, Carmen Scheuner, Markus Göker and Hans-Peter Klenk<sup>1, 2</sup>.

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., & Schleifer, K. H. (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 81-127.

Thorell, H. D., Stenklo, K., Karlsson, J., & Nilsson, T. (2003). A gene cluster for chlorate metabolism in *Ideonella dechloratans*. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5585-5592.

- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., ... & Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292(5515), 281-284.
- Tomita, R. Y., & Beyruth, Z. (2002). Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *Biológico*, 64(2), 135-142.
- Townsend, C. R., Dolédec, S., Norris, R., Peacock, K., & Arbuckle, C. (2003). The influence of scale and geography on relationships between stream community composition and landscape variables: description and prediction. *Freshwater Biology*, 48(5), 768-785.
- Townsend, C. R., Dolédec, S., Norris, R., Peacock, K., & Arbuckle, C. (2003). The influence of scale and geography on relationships between stream community composition and landscape variables: description and prediction. *Freshwater Biology*, 48(5), 768-785.
- Turner, M. G. (1989). Landscape ecology: the effect of pattern on process. *Annual review of ecology and systematics*, 171-197.
- Valente, R. D. O. A. (2001). *Análise da estrutura da paisagem na bacia do rio Corumbataí, SP* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Varuzza, L. (2013). Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. Versão 2.0. 1.
- Vazhemin, I.G. Chemical composition of natural waters in the VYG river basin in relation to the soil of Central Karelia. *Soviet Soil Science*, Silver Spring, v.4, n.1, p.90-101, 1972.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- Vieira, R. P., Gonzalez, A. M., Cardoso, A. M., Oliveira, D. N., Albano, R. M., Clementino, M. M., ... & Paranhos, R. (2008). Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. *Environmental microbiology*, 10(1), 189-199.

- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., ... & Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.
- Wang, J., Shen, J., Wu, Y., Tu, C., Soininen, J., Stegen, J. C., ... & Zhang, E. (2013). Phylogenetic beta diversity in bacterial assemblages across ecosystems: deterministic versus stochastic processes. *The ISME journal*, 7(7), 1310-1321.
- Wang, S. Y., Sudduth, E. B., Wallenstein, M. D., Wright, J. P., & Bernhardt, E. S. (2011). Watershed urbanization alters the composition and function of stream bacterial communities. *PLoS One*, 6(8), e22972.
- Wenger, S. (1999). A review of the scientific literature on riparian buffer width, extent and vegetation.
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M. P., & Hahn, M. W. (2006). Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5478-5485.
- Xie, C. H., & Yokota, A. (2005). Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2419-2425.
- Xie, Z., Lin, W., & Luo, J. (2015). Genome sequence of *Cellvibrio pealriver* PR1, a xylanolytic and agarolytic bacterium isolated from freshwater. *Journal of Biotechnology*, 214, 57-58.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological nitrogen fixation*, 23, 43-86.
- Yu, Z., Yang, J., & Liu, L. (2014). Denitrifier community in the oxygen minimum zone of a subtropical deep reservoir. *PloS one*, 9(3), e92055.
- Yuan, X., Qian, X., Zhang, R., Ye, R., & Hu, W. (2012). Performance and microbial community analysis of a novel bio-cord carrier during treatment of a polluted river. *Bioresource technology*, 117, 33-39.



Zhang, Y., & Frankenberger, W. T. (2007). Supplementing *Bacillus* sp. RS1 with *Dechloromonas* sp. HZ for enhancing selenate reduction in agricultural drainage water. *Science of the total environment*, 372(2), 397-405.

Zou, G., Papirio, S., Van Hullebusch, E. D., & Puhakka, J. A. (2015). Fluidized-bed denitrification of mining water tolerates high nickel concentrations. *Bioresource technology*, 179, 284-290.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(4), 533-616.

### **Páginas Visitadas na WEB**

ANA, Agência Nacional de Águas. Disponível em:

<http://portalpnqa.ana.gov.br/indicadores-indice-aguas.aspx> acesso em 01/01/15

AUSRIVAS. Disponível em <http://ausrivas.ewater.org.au/index.php/introduction> acesso em 27/01/17

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.001, de 23 de janeiro de 1986. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para o Relatório de Impacto Ambiental – RIMA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 fev. 1986. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res0186.html> acesso em 01/01/15

Dados gerais da empresa AES Tietê. Disponível em:

<http://www.aestiete.com.br/empresa> acesso em 07/06/16

<http://relatorios2015.aesbrasilsustentabilidade.com.br/tiete/eficiencia-e-disciplina/gestao-de-reservatorios/> acesso em 10/02/17

Dados gerais da Usina de Caconde. Disponível em:

<http://caconde.com.br/itens.asp?idmenu=34> acesso em 27/05/16

Dados gerais do município de Caconde. Disponível em:

<http://caconde.com.br/itens.asp?idmenu=3> acesso em 27/05/16

Dados gerais do município de Caconde. Disponível em: <http://www.cidade-brasil.com.br/municipio-caconde.html> acesso em 27/05/16

Dados gerais do município de Caconde. Disponível em: <http://www.ecopardo.com.br/caconde.htm> acesso em 27/05/16

Dados gerais do município de Caconde. <http://caconde.com.br> acesso em 27/05/16

Dados gerais do turismo em Caconde. Disponível em: <http://www.feriasemcaconde.com.br/caconde.html> acesso em 27/05/16

EMBRAPA. Disponível em: [https://www.cnpm.embrapa.br/projetos/bacia\\_rio\\_pardo/landsat\\_mun/l\\_caconde.htm](https://www.cnpm.embrapa.br/projetos/bacia_rio_pardo/landsat_mun/l_caconde.htm) acesso em 27/05/16

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Manual Técnico de Uso da Terra (2013) Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv81615.pdf> acesso em 24/12/16.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=350870> acesso em 27/05/16

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/3UL> acesso em 27/05/16

NIH – National Human Genome Research Institute. Disponível em: <https://www.genome.gov/sequencingcosts/> acesso em 27/05/16

Toda Biologia. Disponível em: [http://www.todabiologia.com/ecologia/ecossistemas\\_aquaticos.htm](http://www.todabiologia.com/ecologia/ecossistemas_aquaticos.htm) acesso em 04/01/16

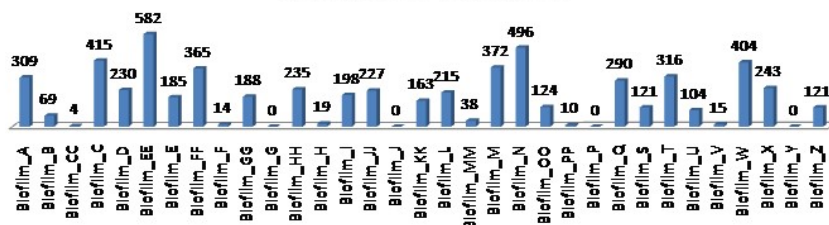
WWF Brasil. Disponível em: [http://www.wwf.pt/o\\_que\\_fazemos/florestas\\_vivas/relatorio\\_florestas\\_vivas\\_cap\\_3/](http://www.wwf.pt/o_que_fazemos/florestas_vivas/relatorio_florestas_vivas_cap_3/) acesso em 18/12/16

WWF Brasil. Disponível em: [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/questoes\\_ambientais/matias\\_ciliares/](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/matias_ciliares/) acesso em 10/02/17

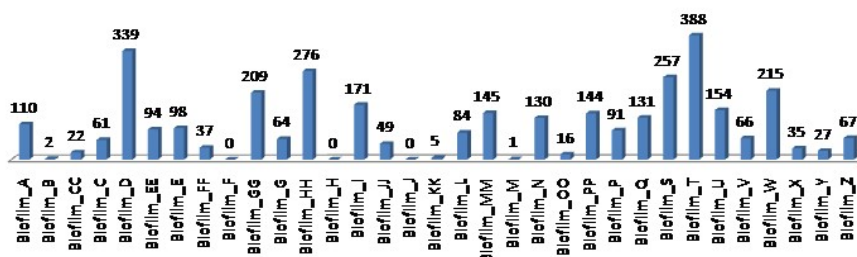
## ANEXO A

### Distribuição das 10 OTUs nos pontos de amostragens

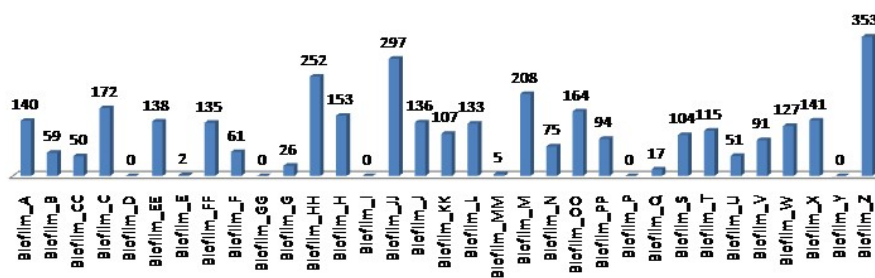
**OTU 1 *Cellvibrionaceae***



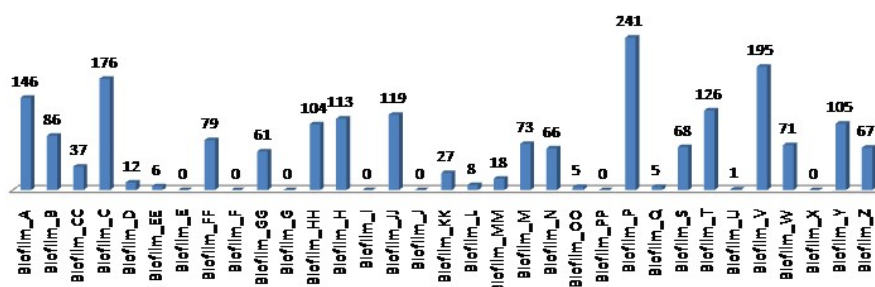
**OTU 5 *Pelomonas***



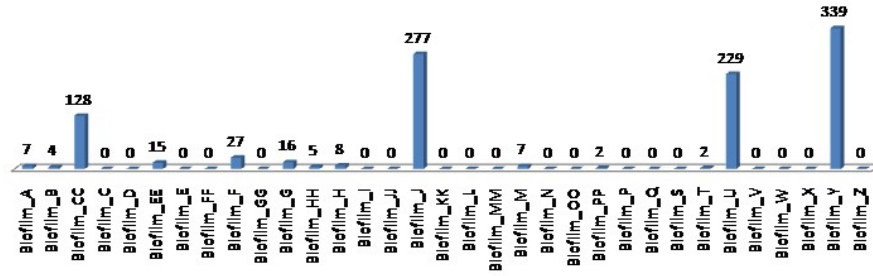
**OTU 2 *Rhodiferax***



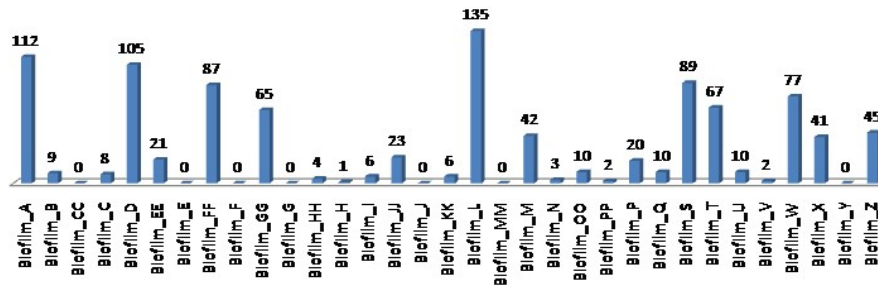
**OTU 7 *Ideonella***



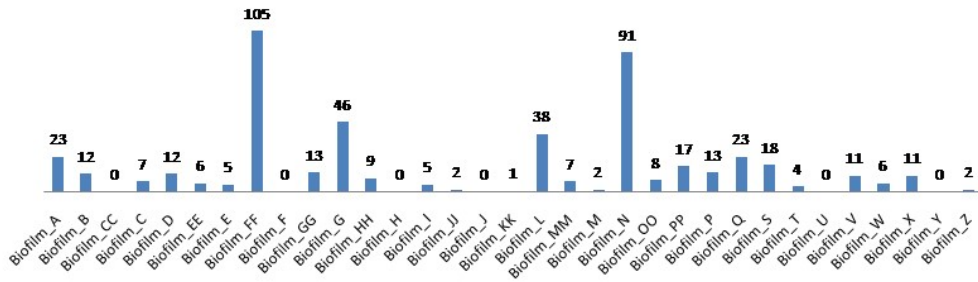
### OTU 3 Bacteria



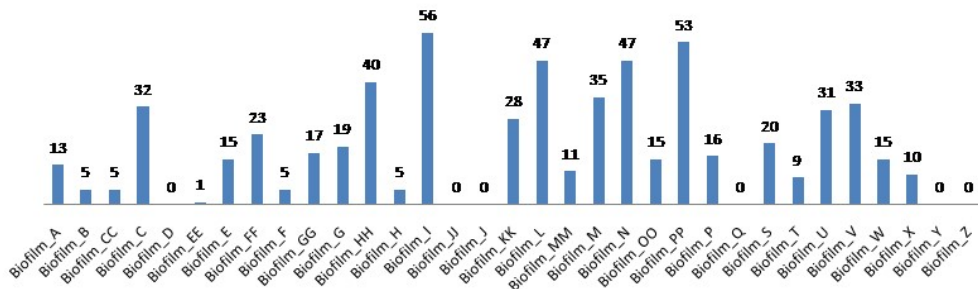
### OTU 14 Elstera



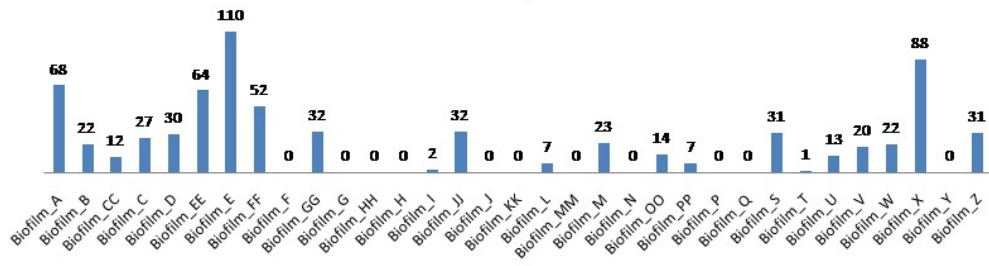
### OTU 17 Caulobacter



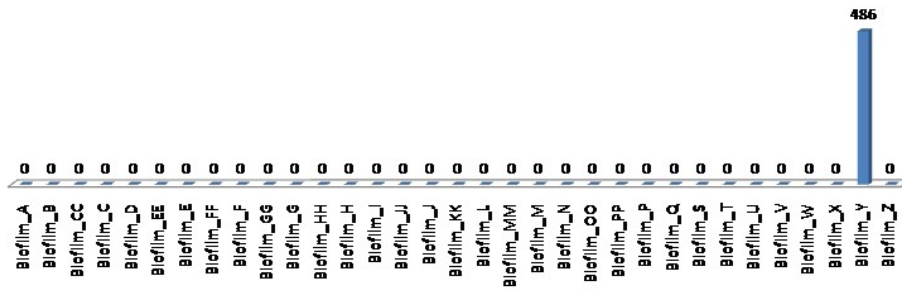
### OTU 9 Rhizobiales



### OTU 6 *Rhodospirillaceae*



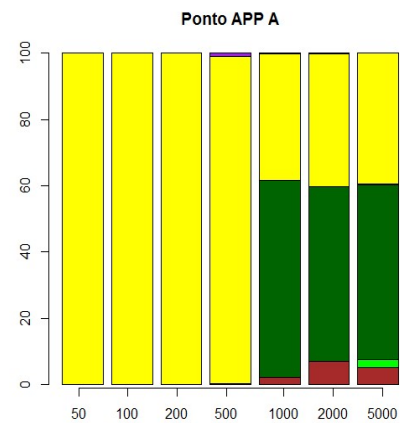
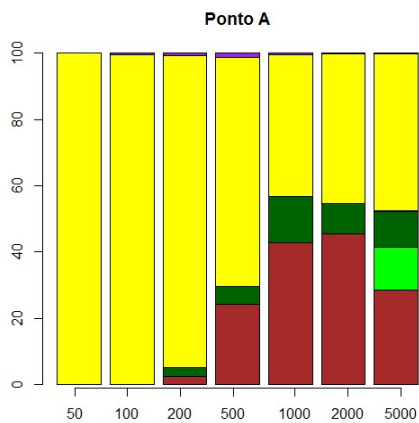
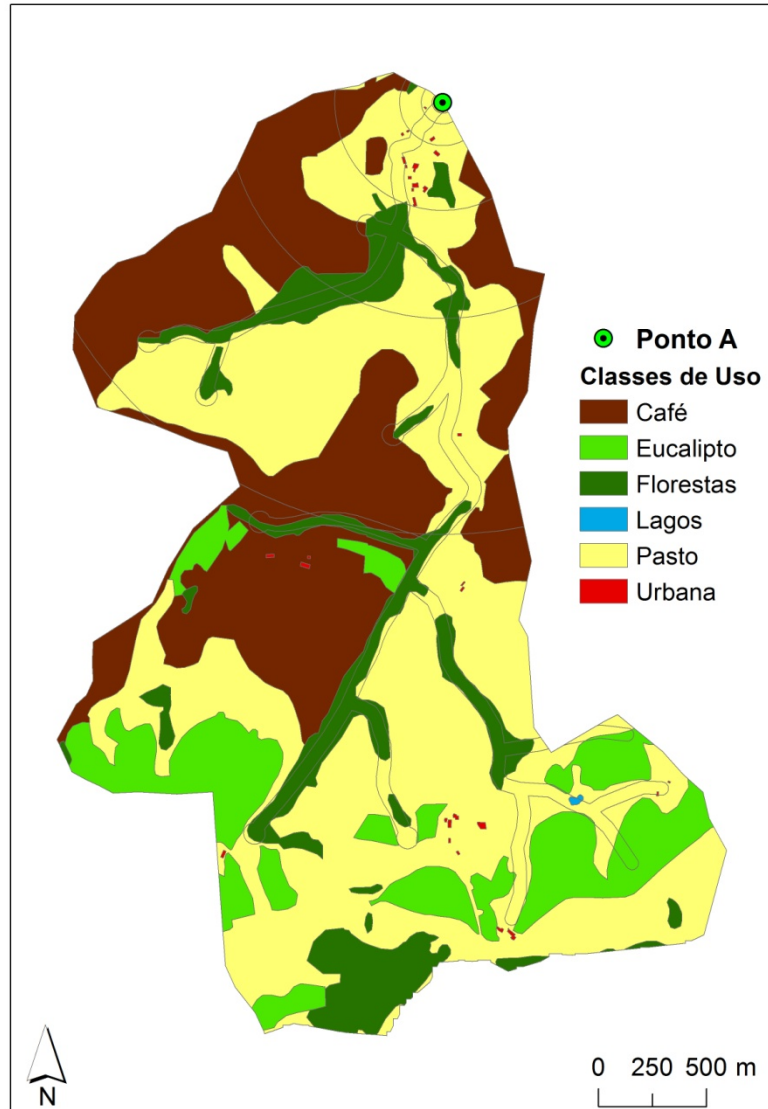
### OTU 4 *Chlorobiaceae*



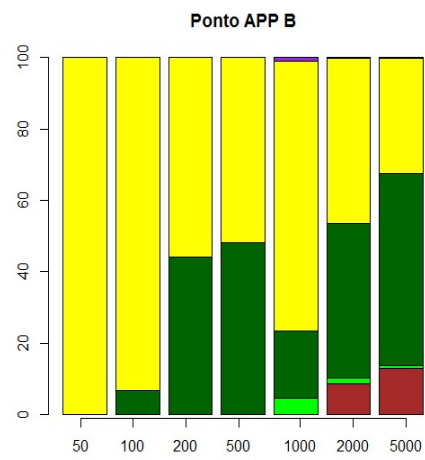
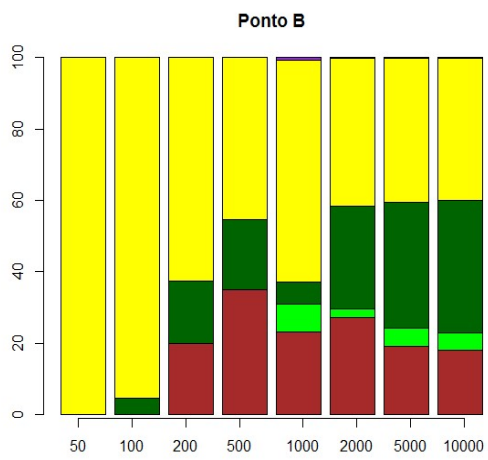
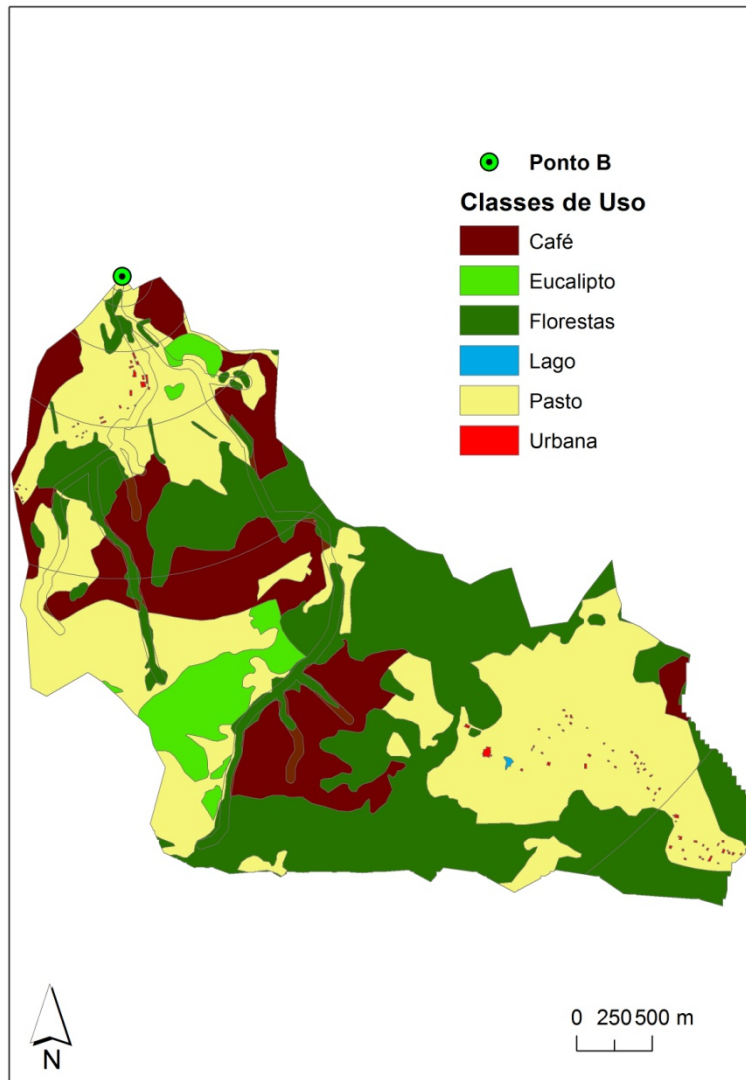
# ANEXO B

## Uso do solo nos pontos de amostragem

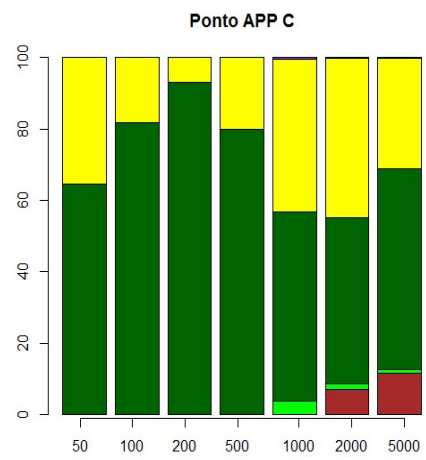
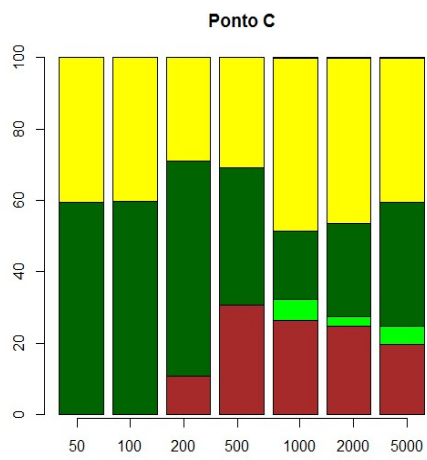
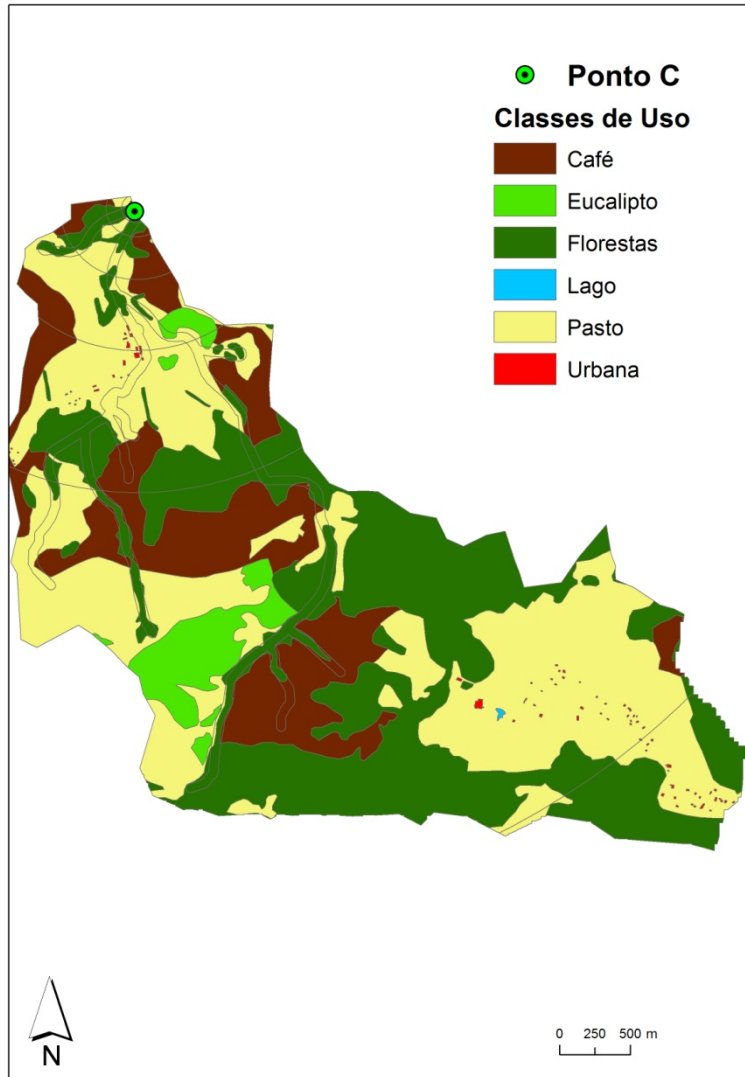
### Ponto A



# Ponto B

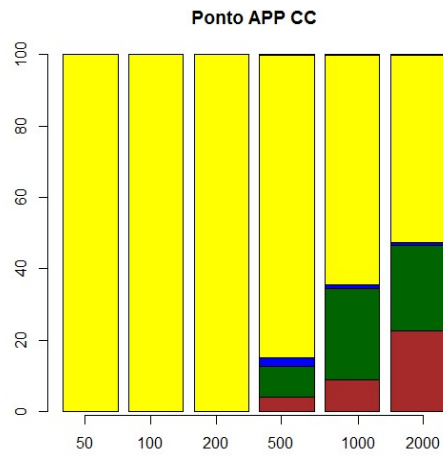
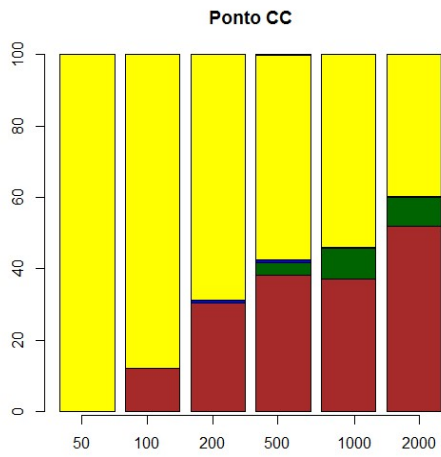
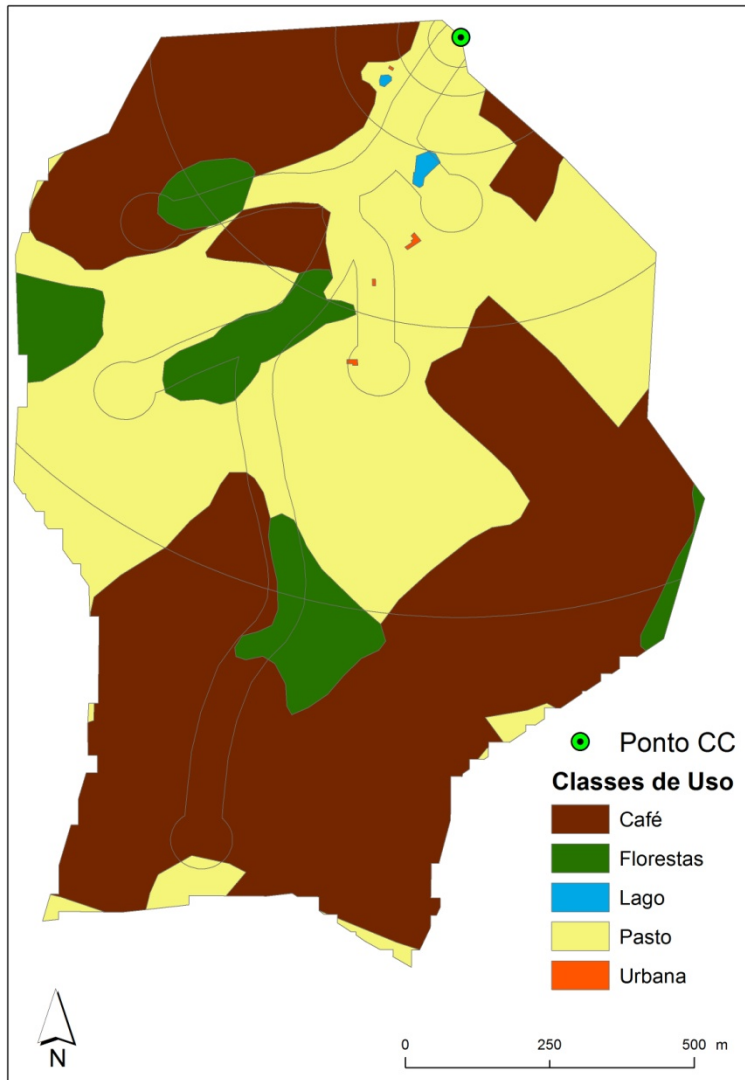


# Ponto C

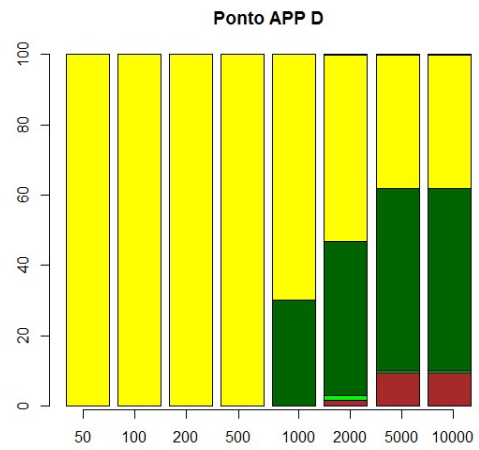
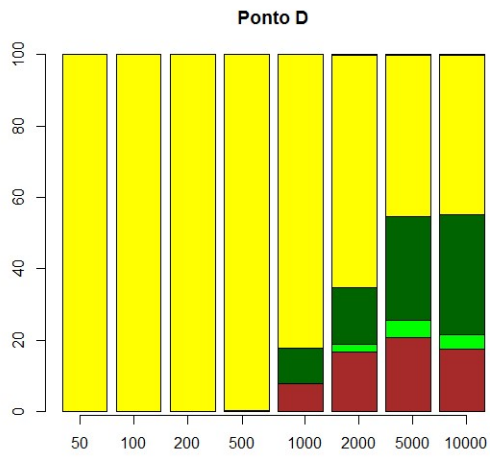
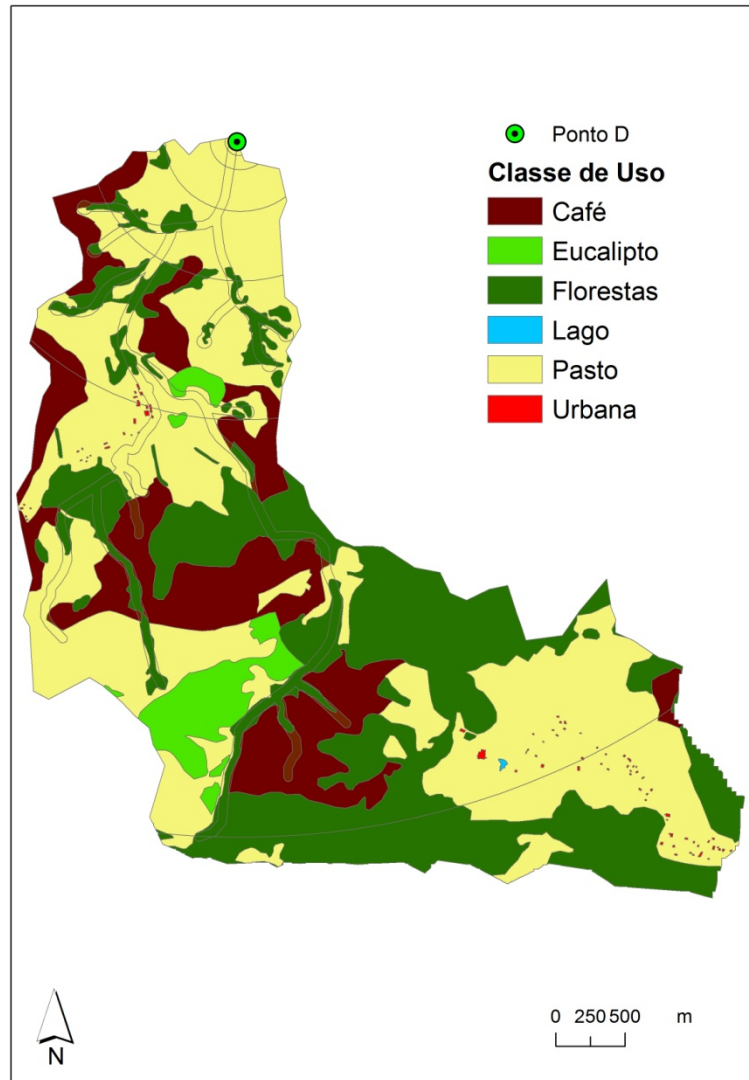




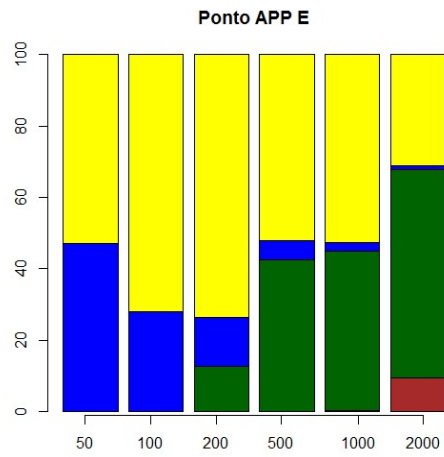
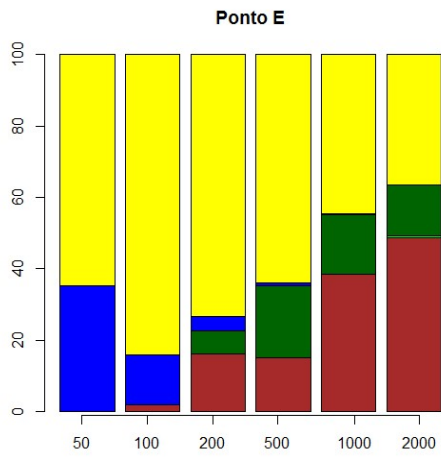
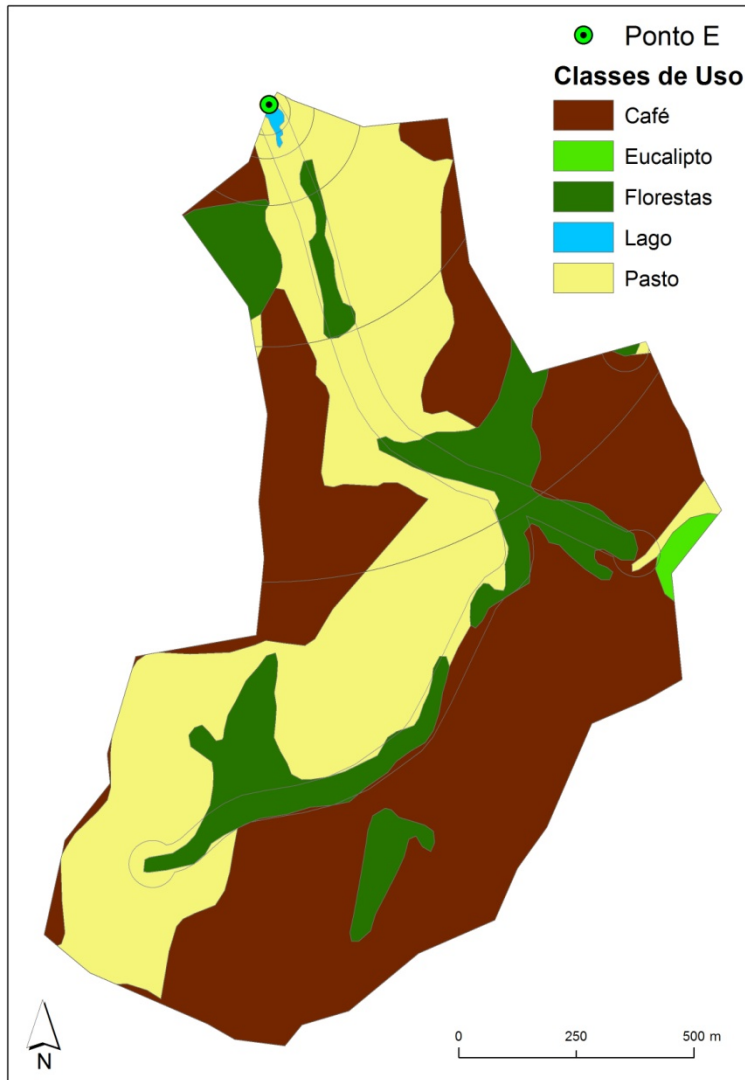
# PONTO CC



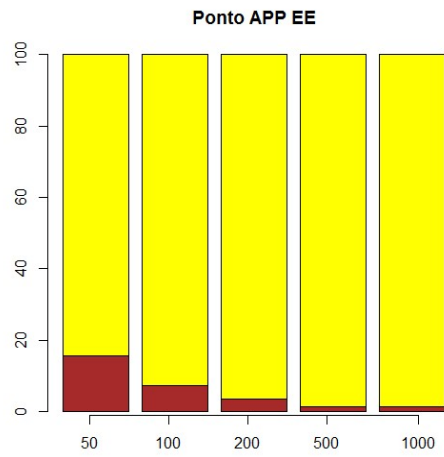
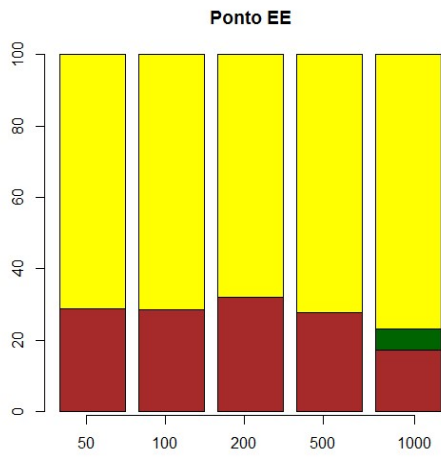
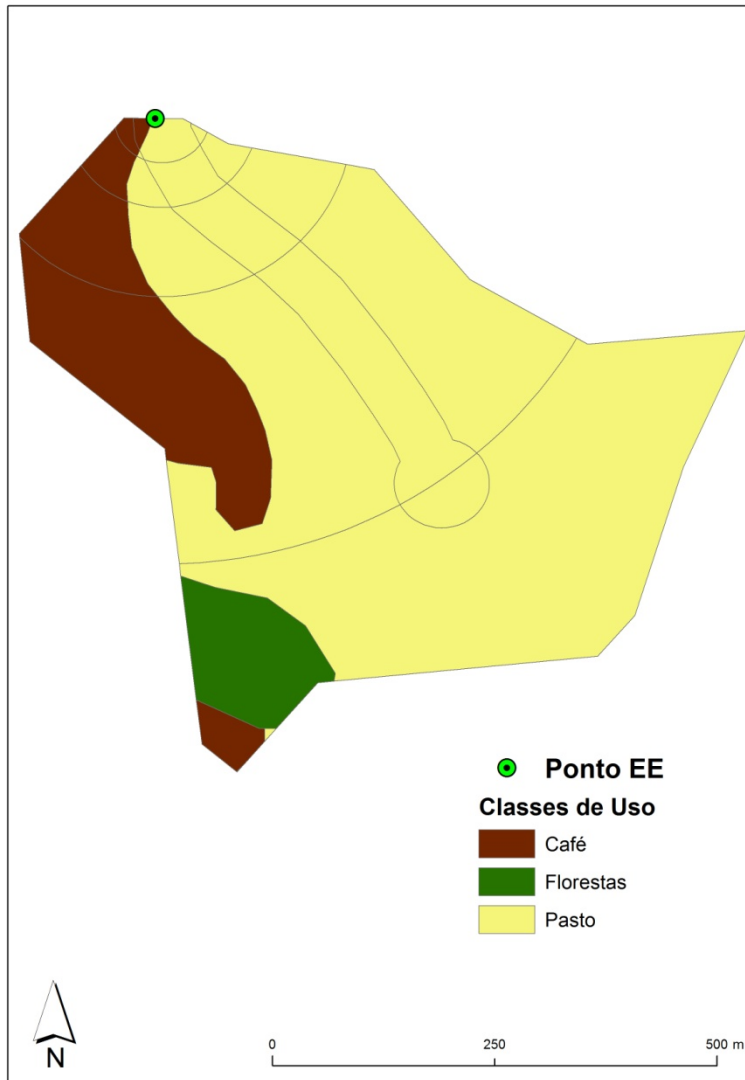
# Ponto D



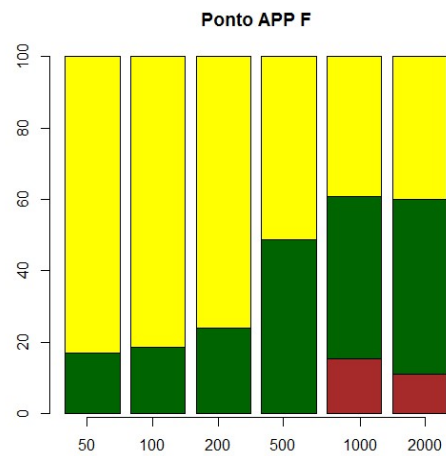
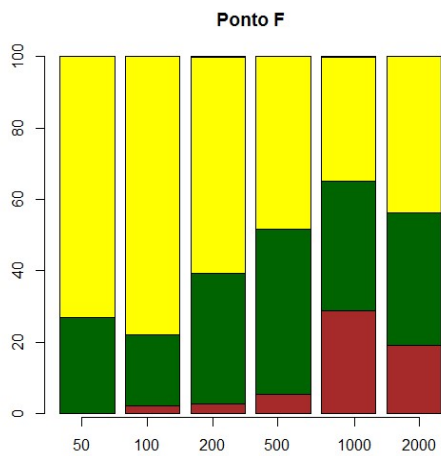
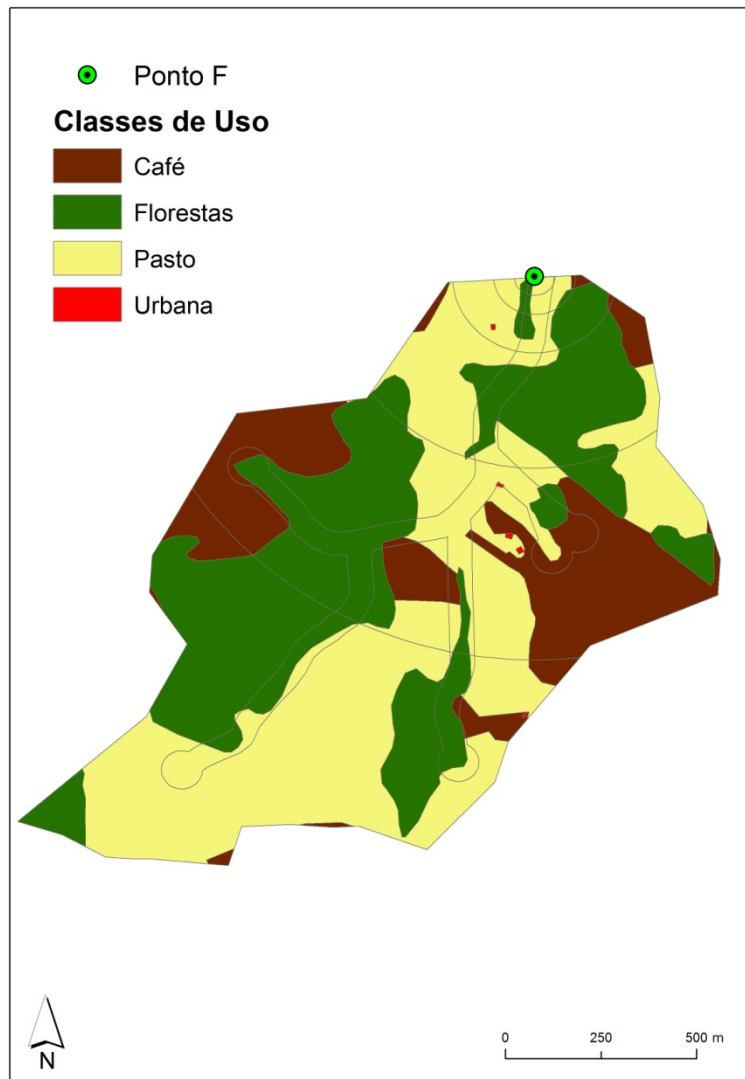
# Ponto E



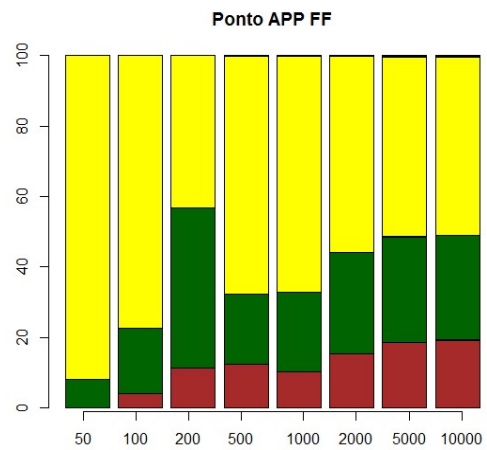
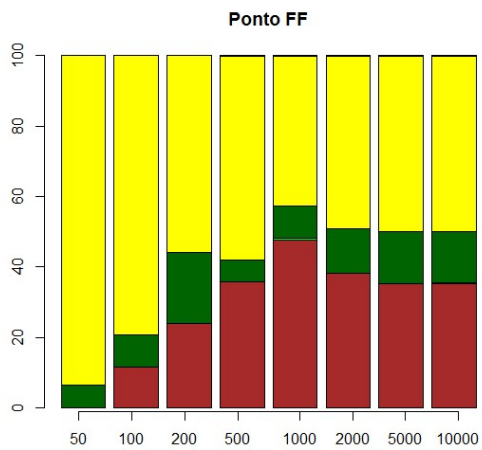
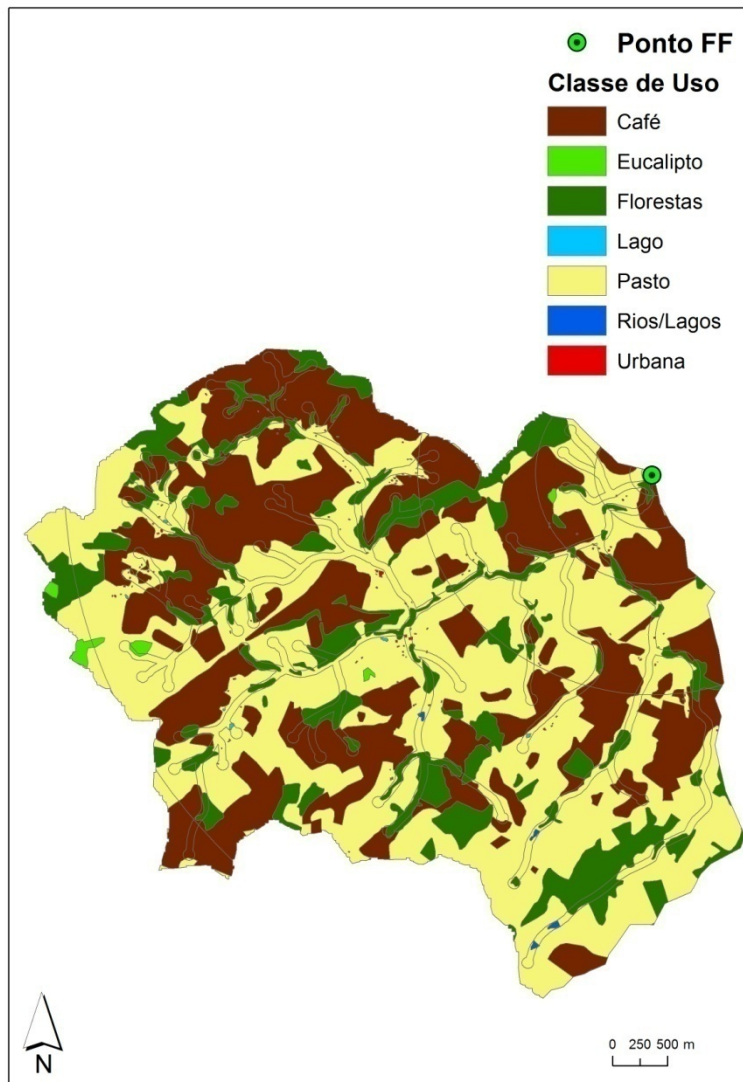
# Ponto EE



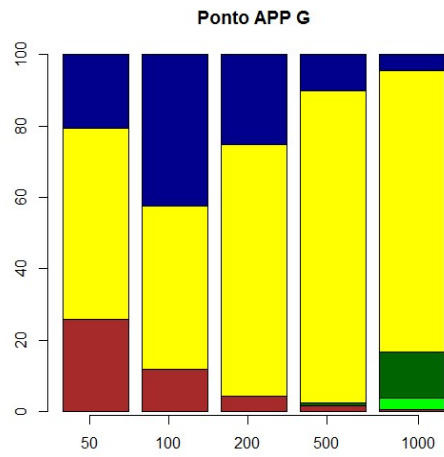
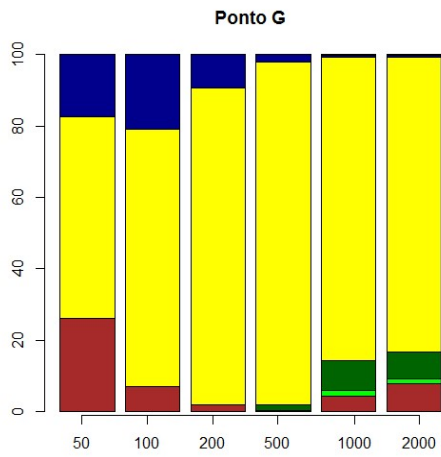
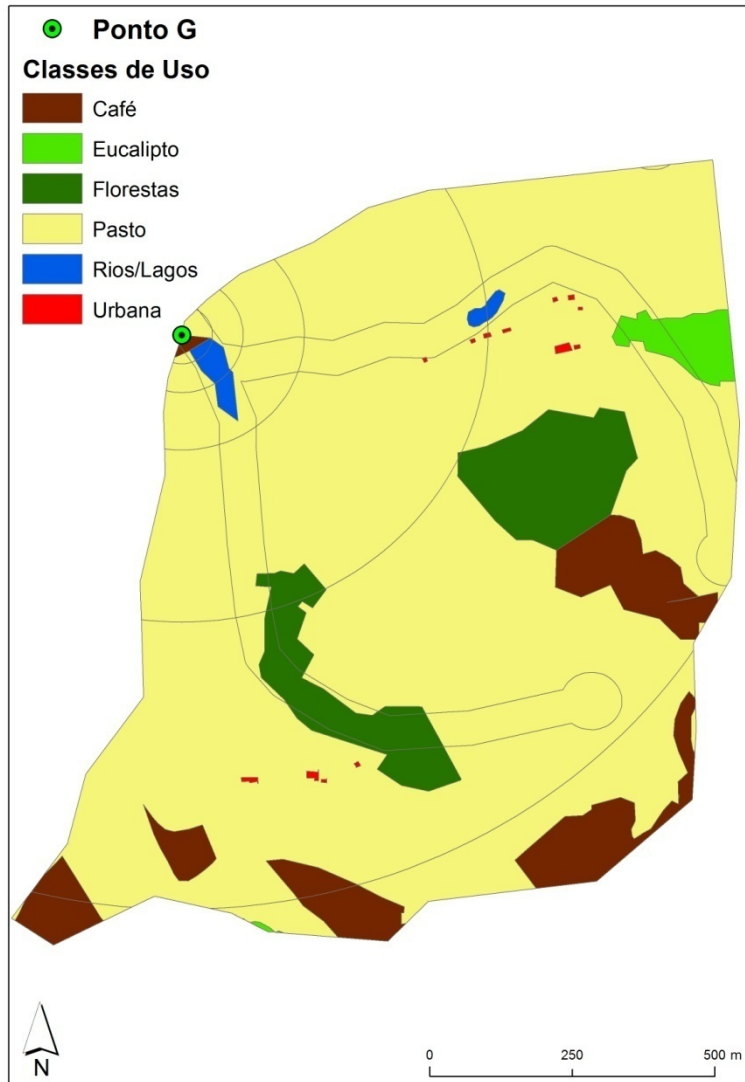
## Ponto F



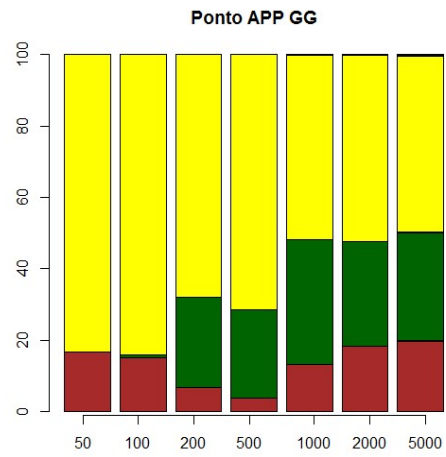
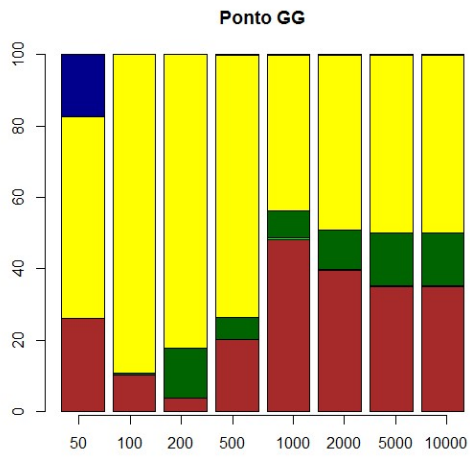
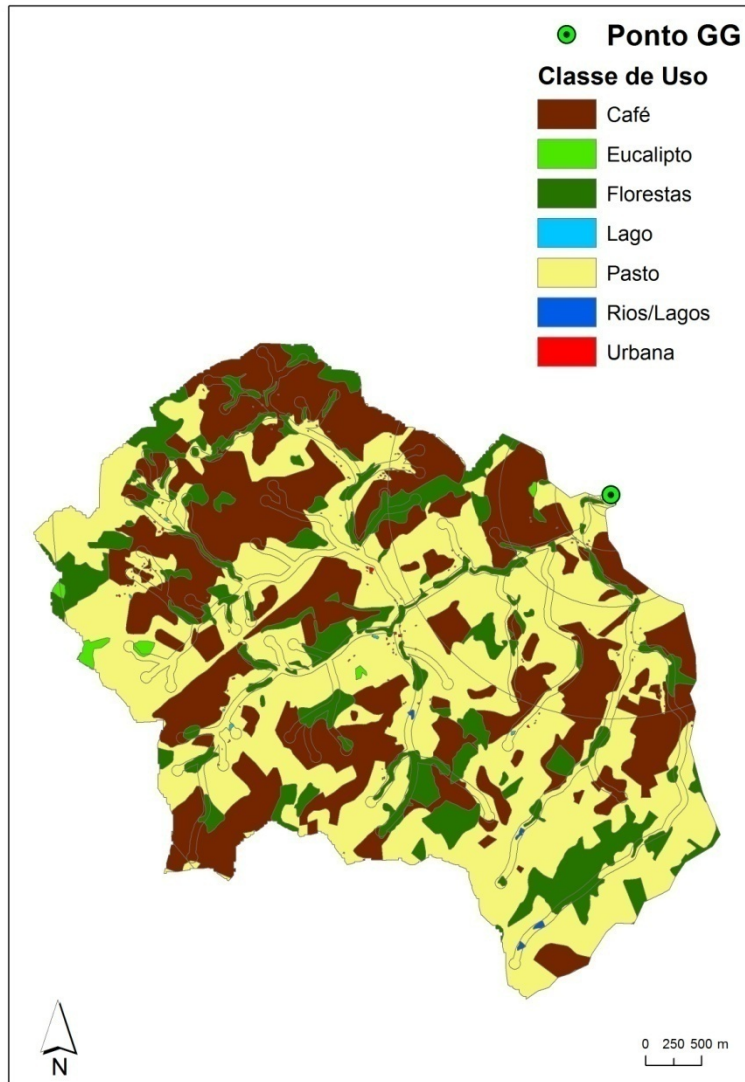
# Ponto FF



# Ponto G

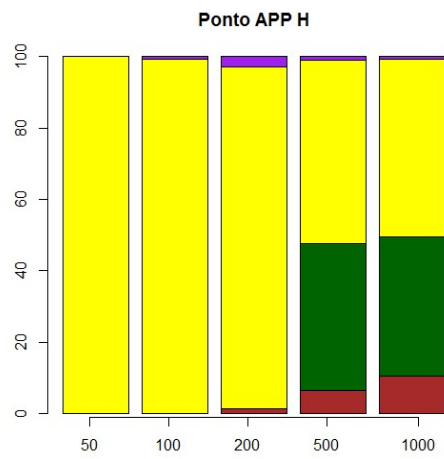
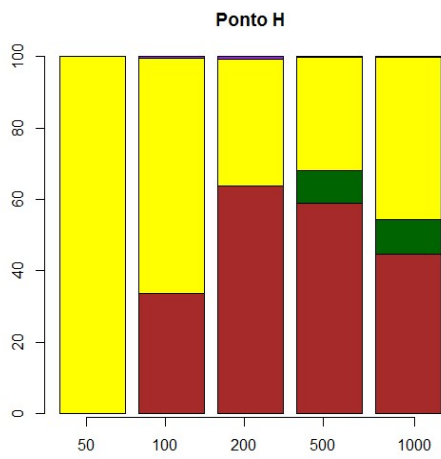
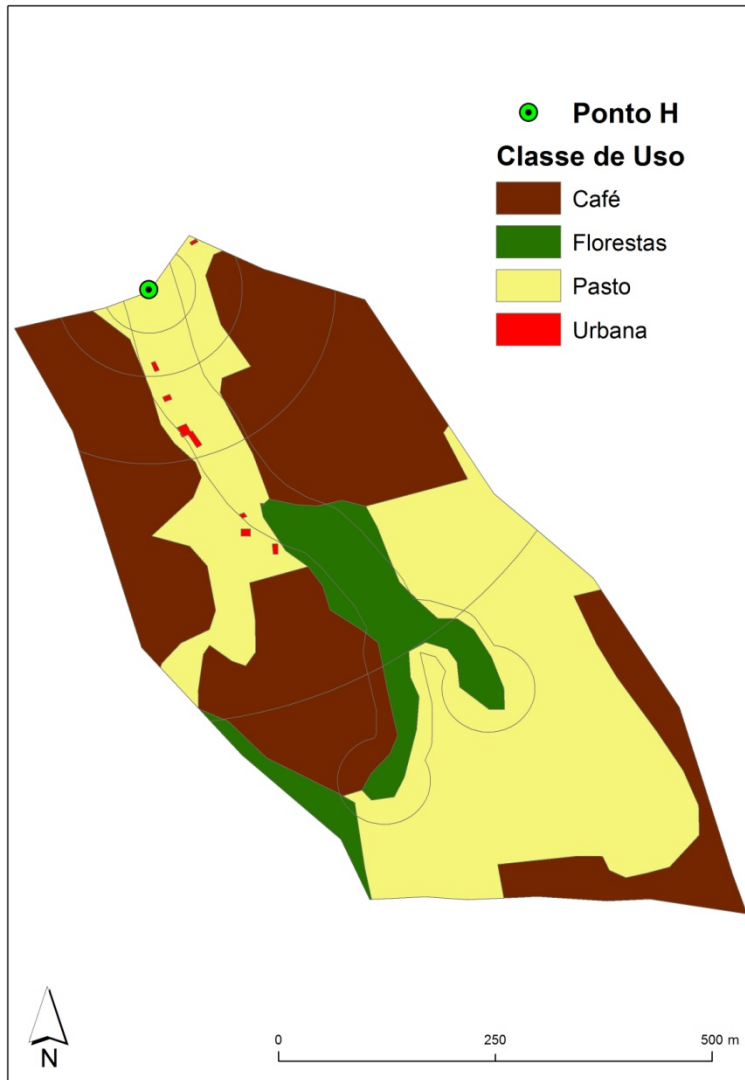


# Ponto GG

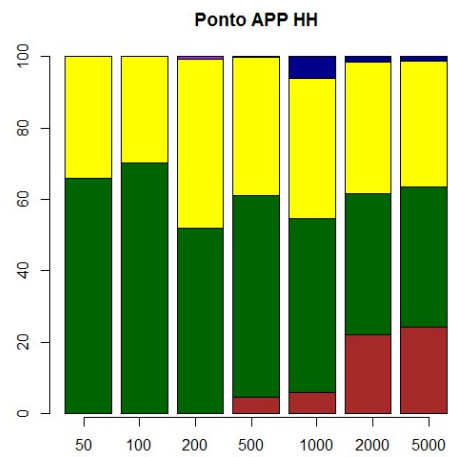
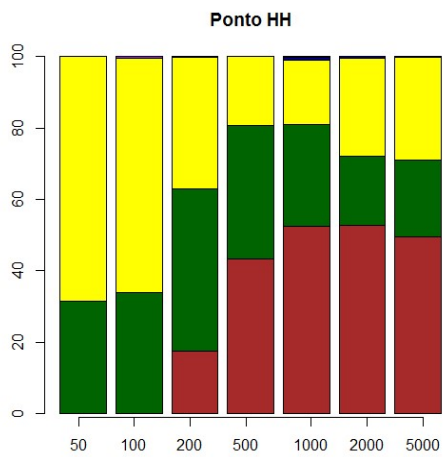
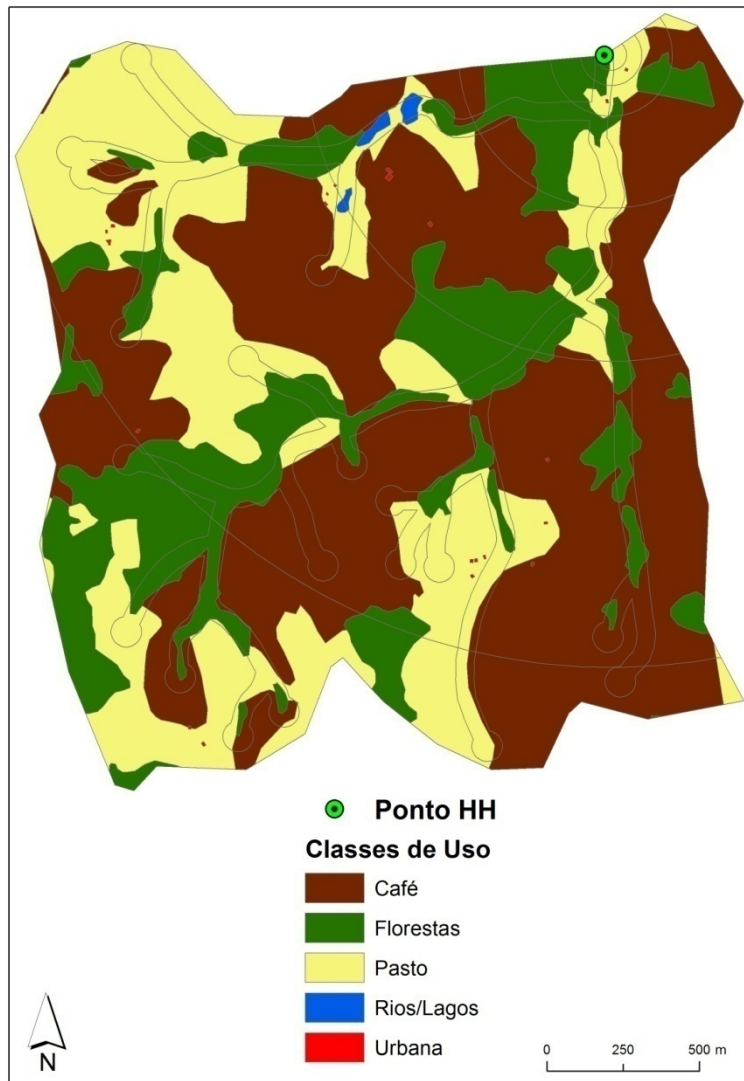




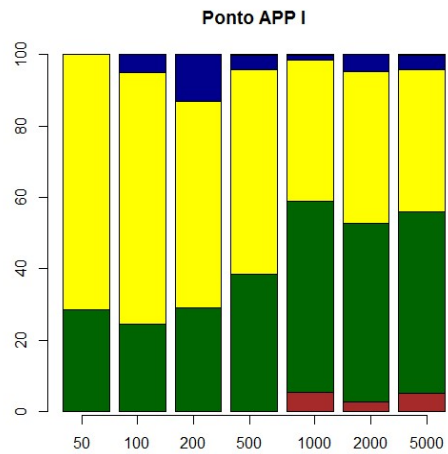
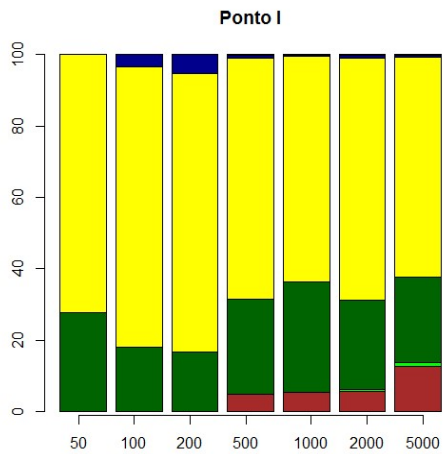
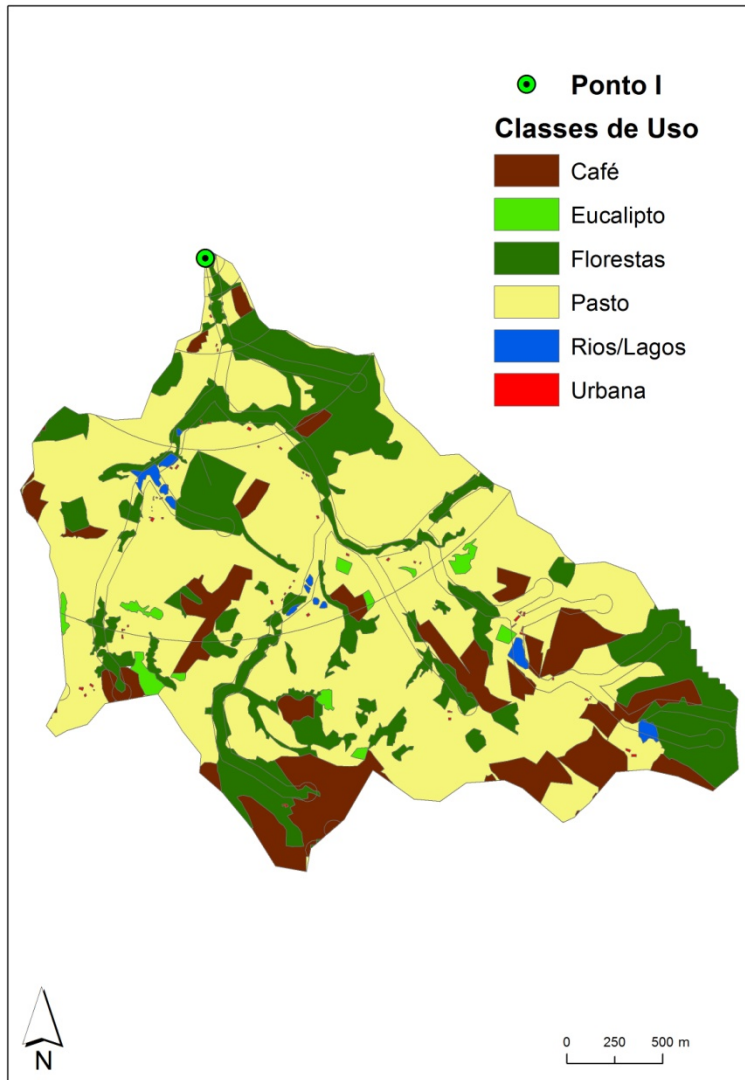
# Ponto H



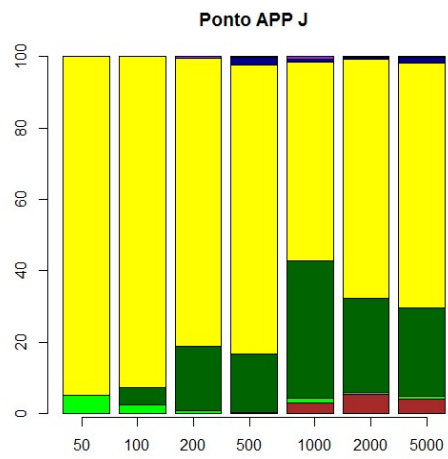
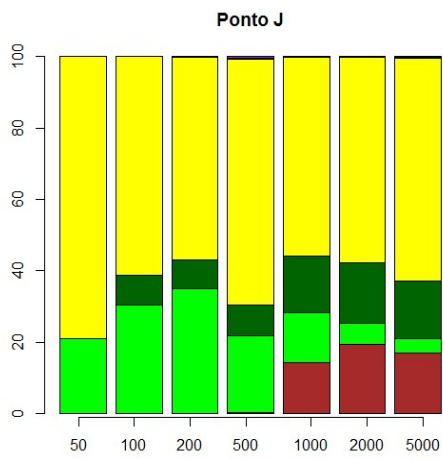
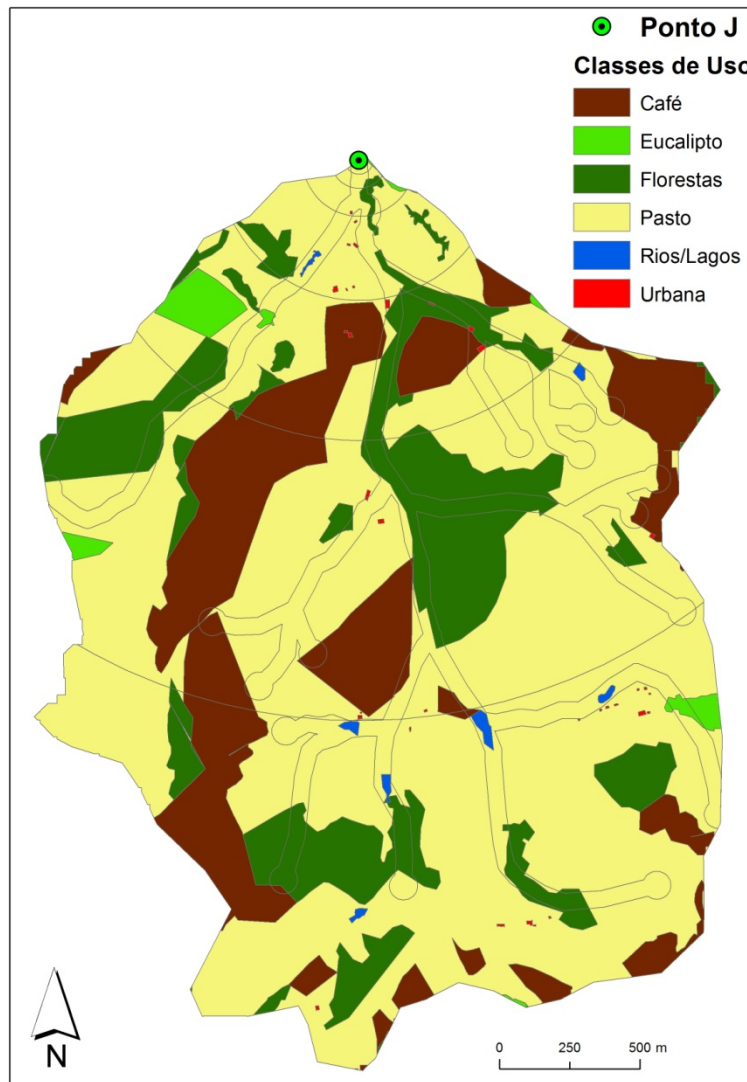
## Ponto HH



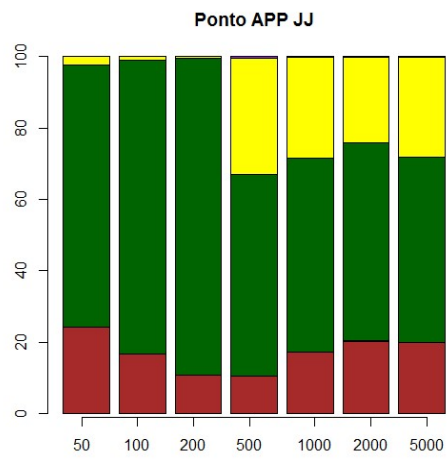
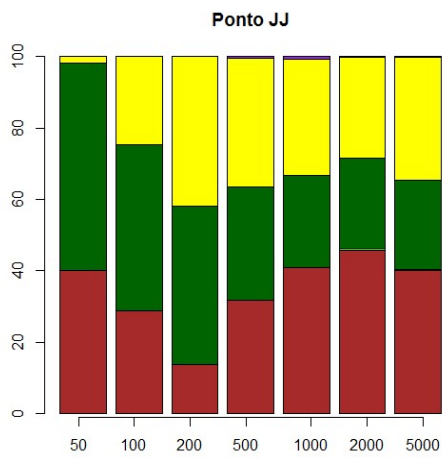
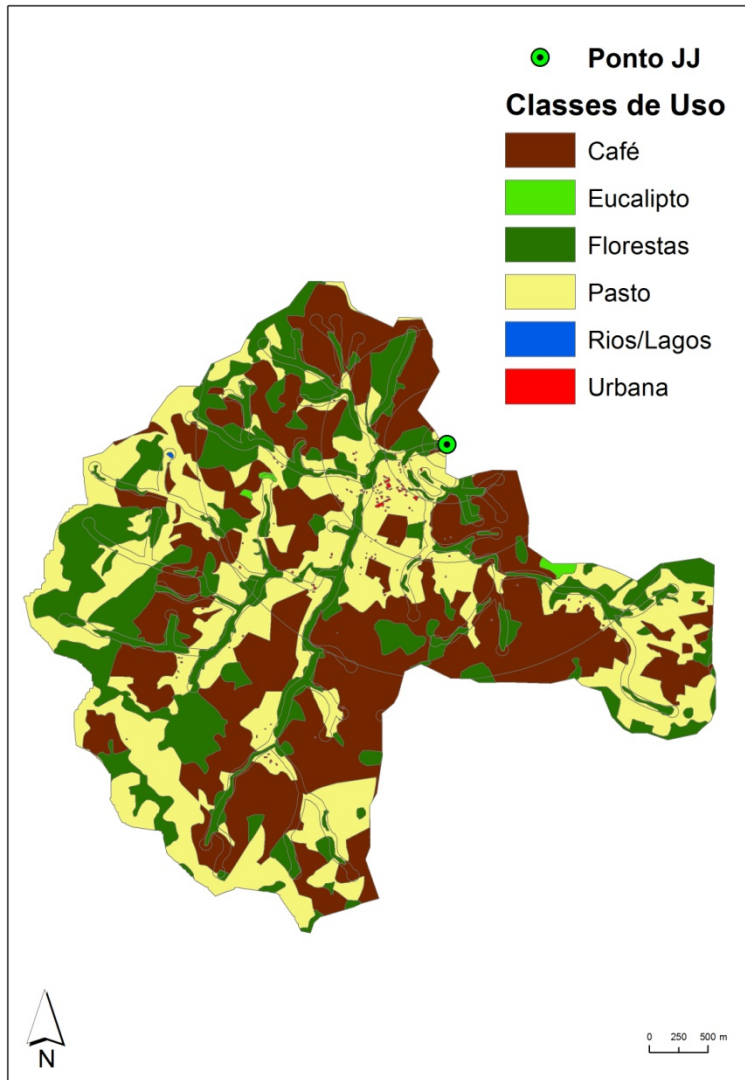
# Ponto I



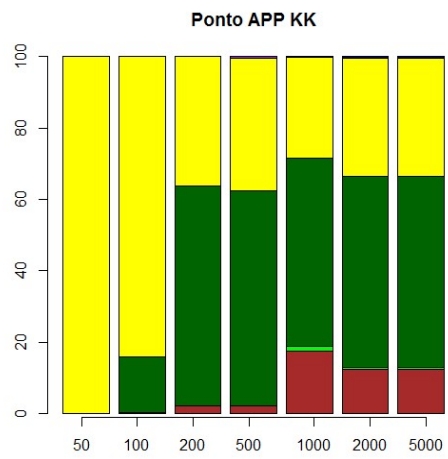
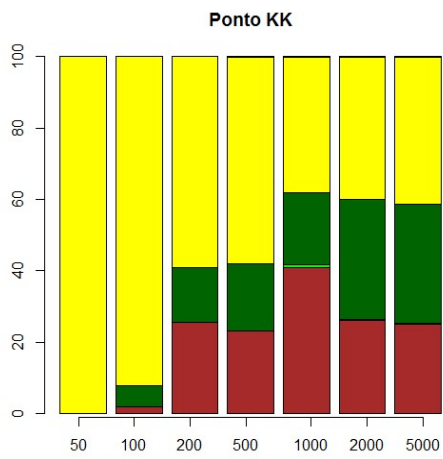
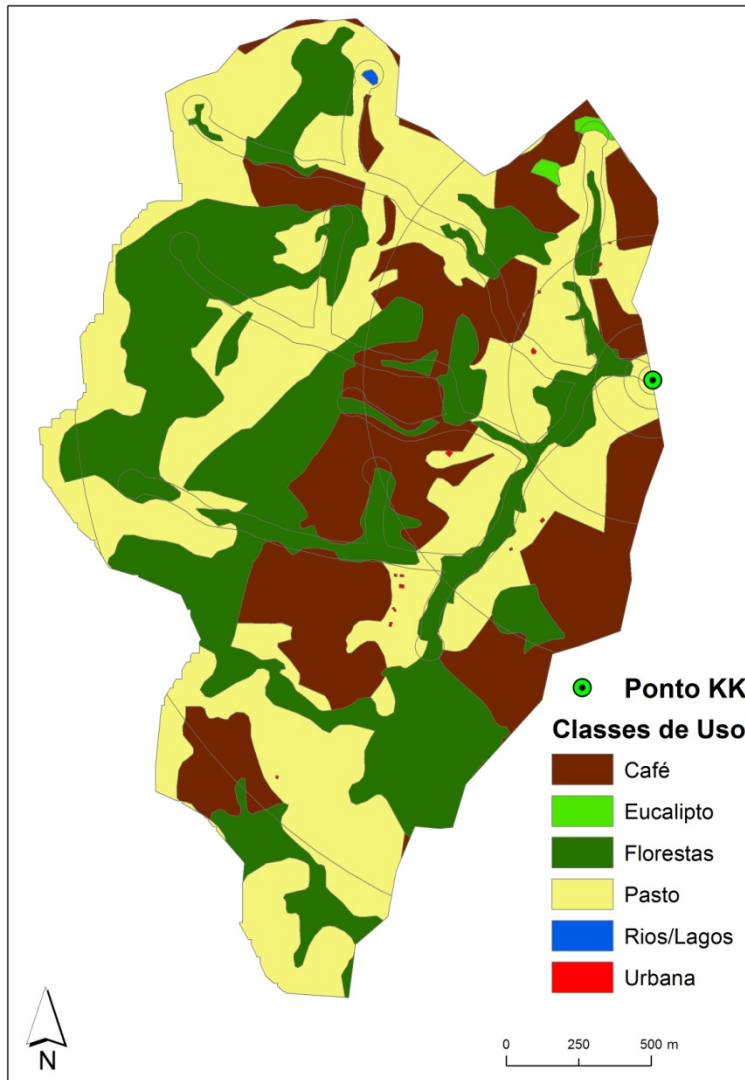
# Ponto J



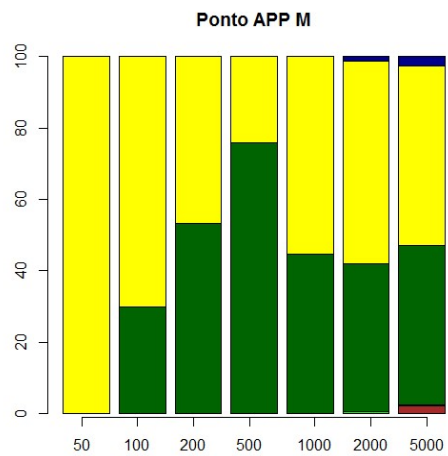
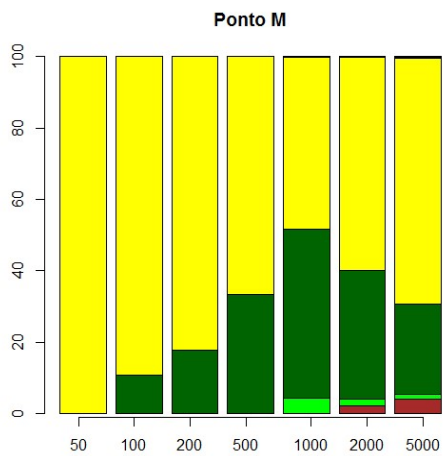
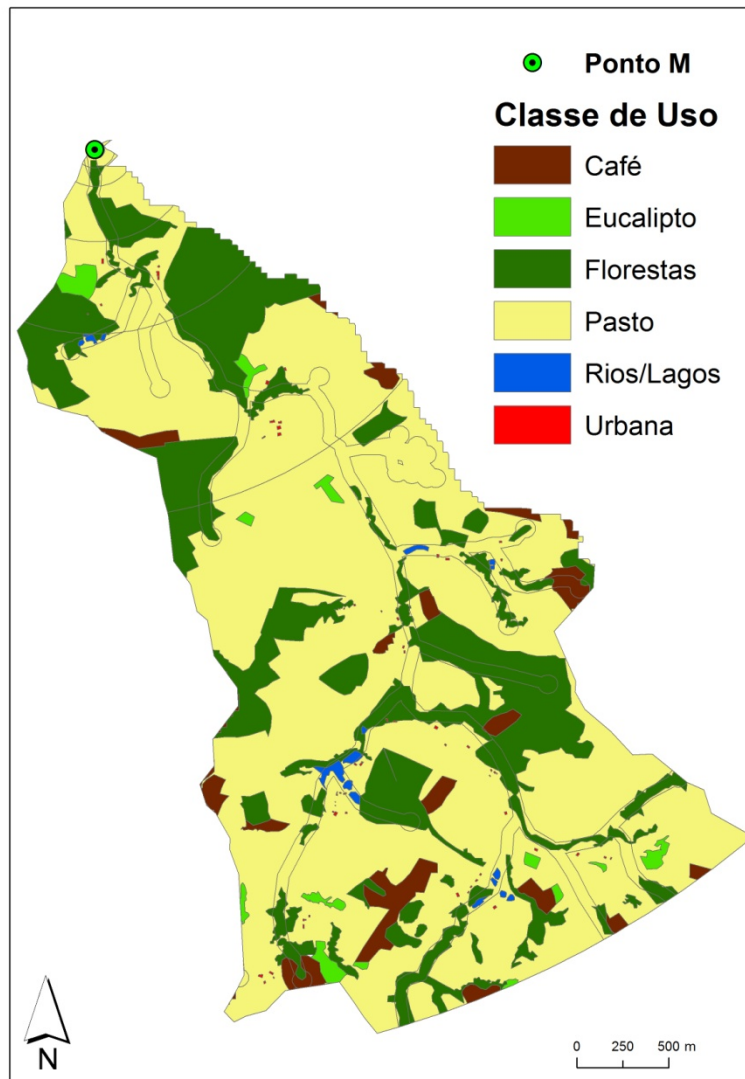
# Ponto JJ



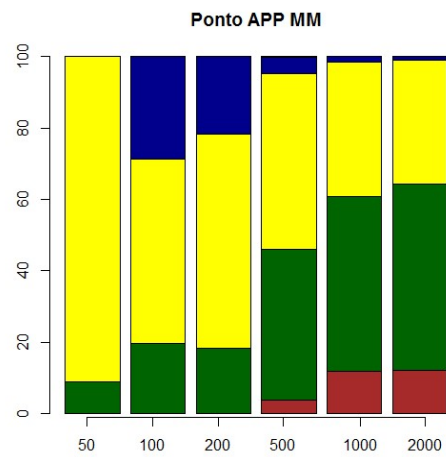
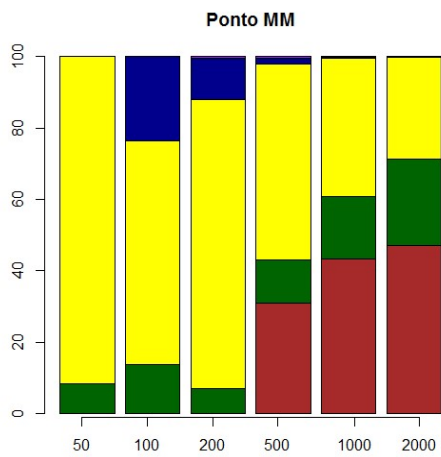
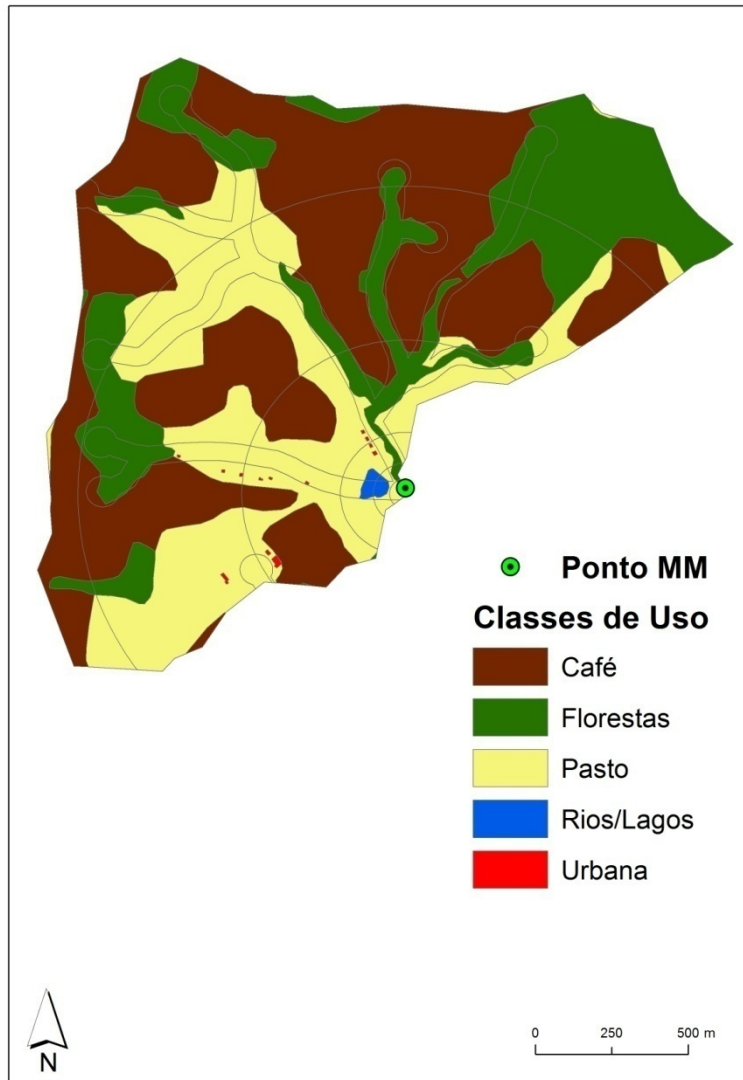
# Ponto KK



# Ponto M

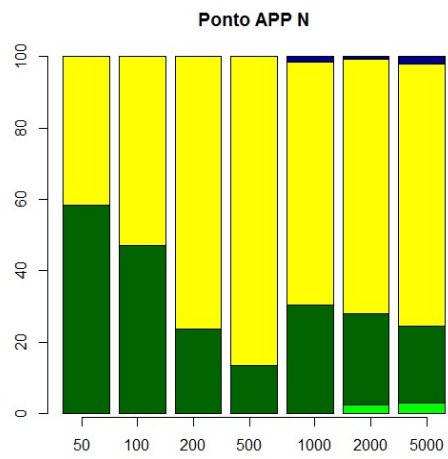
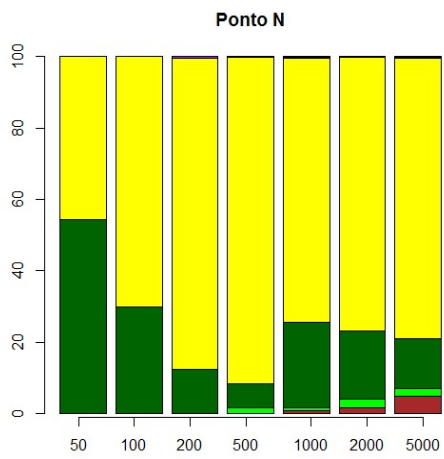
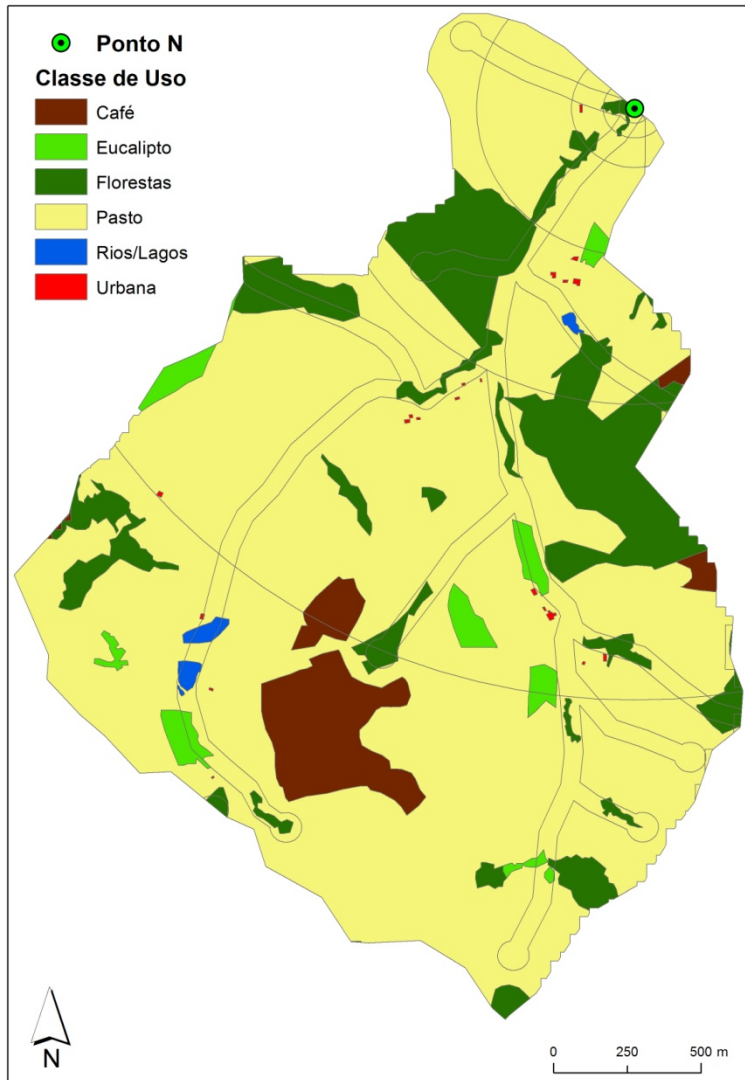


# Ponto MM

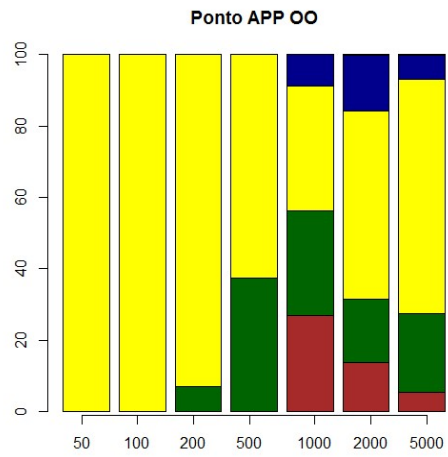
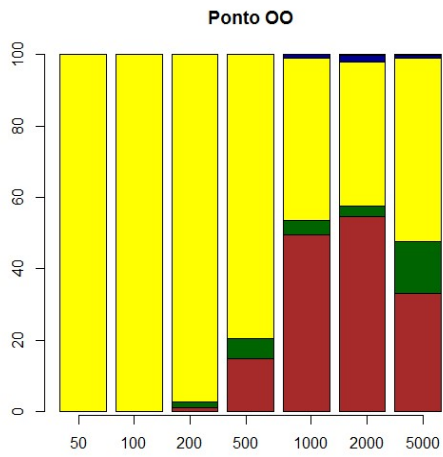
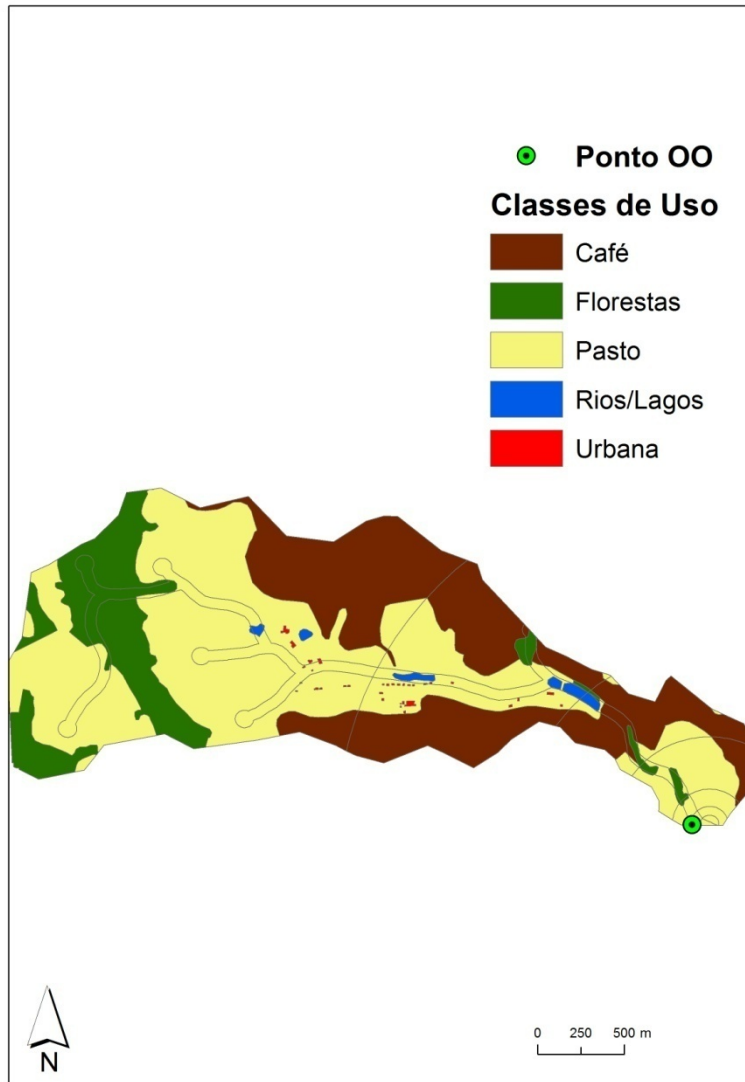




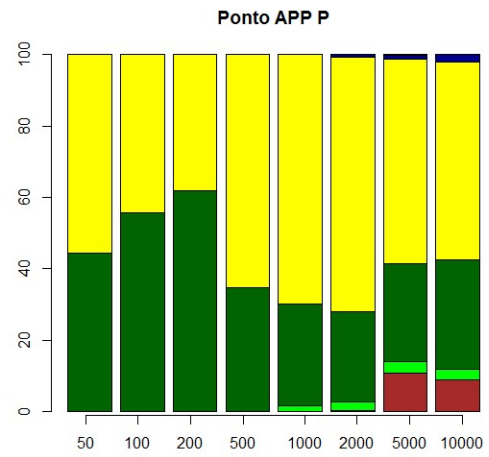
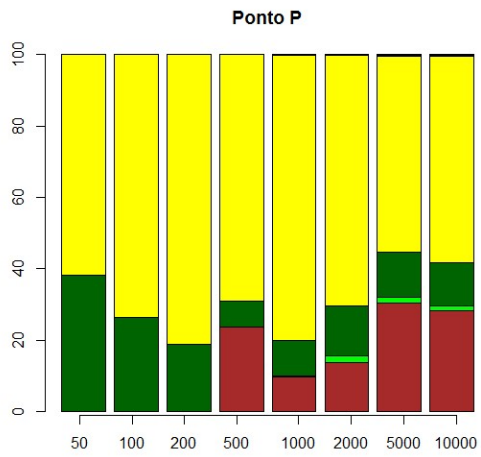
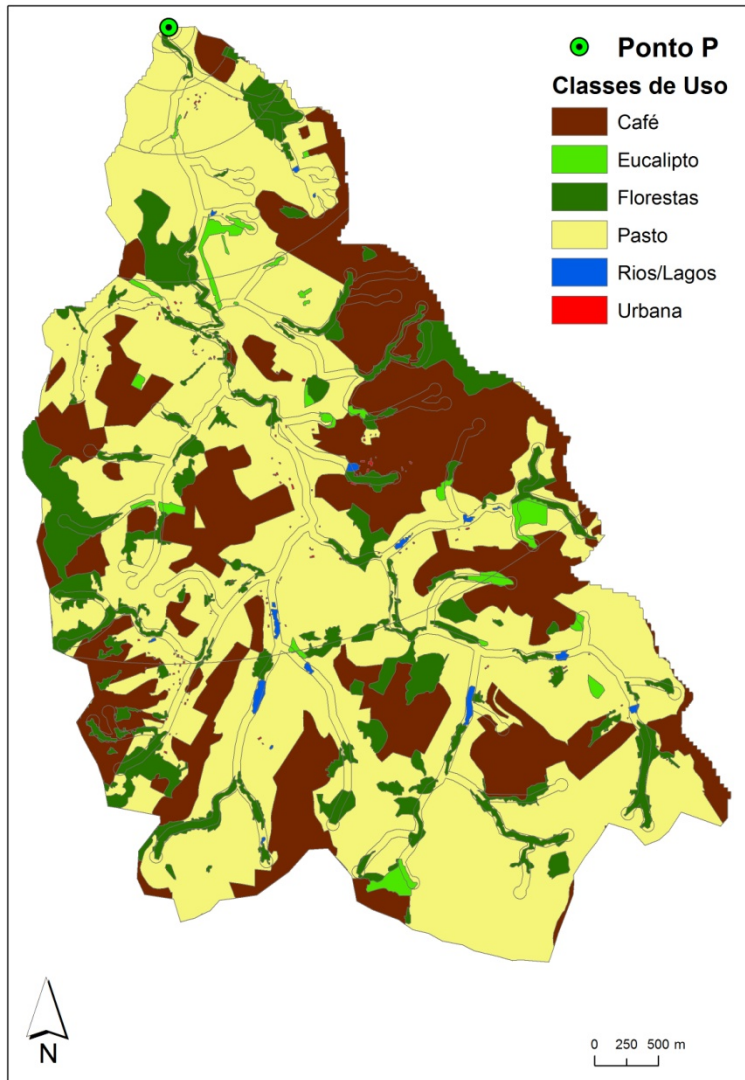
# Ponto N



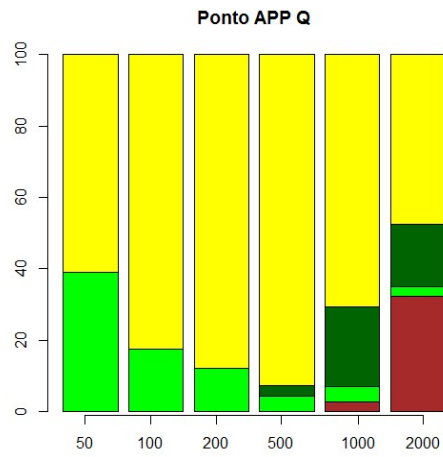
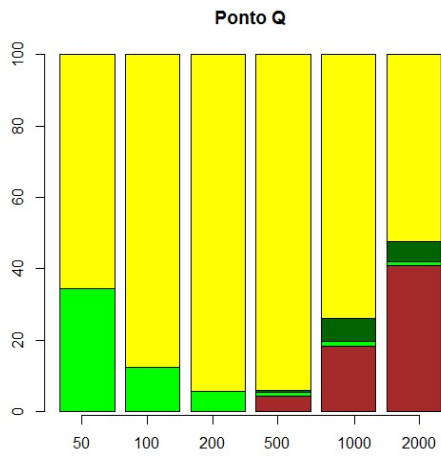
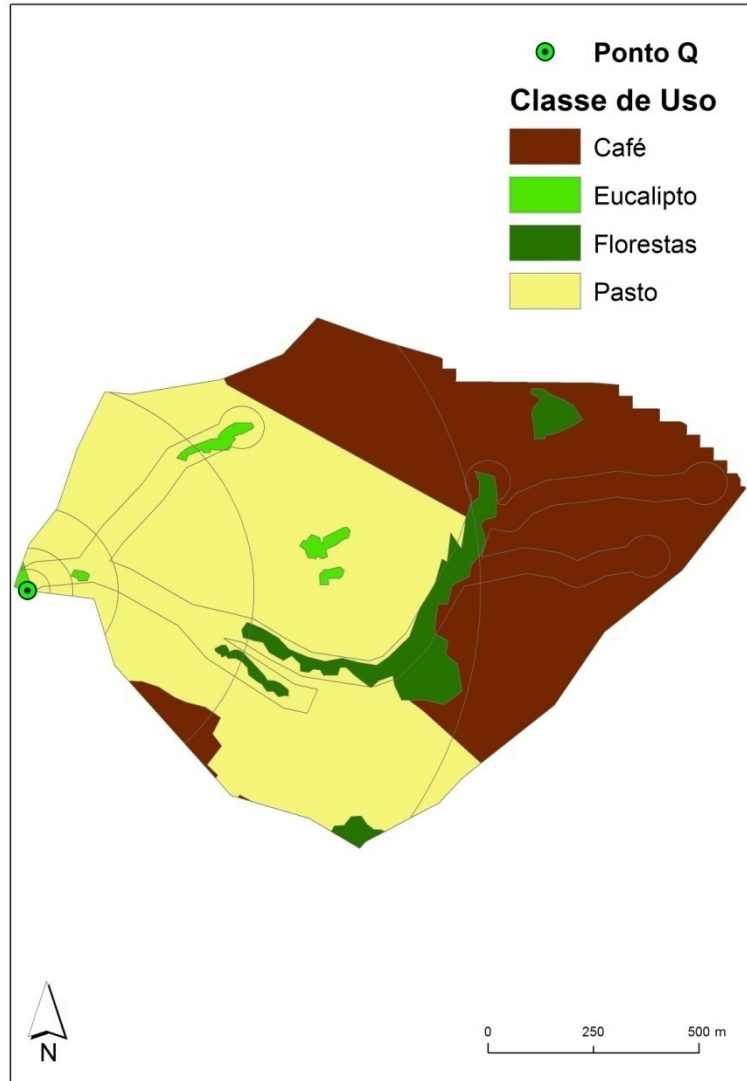
# Ponto OO



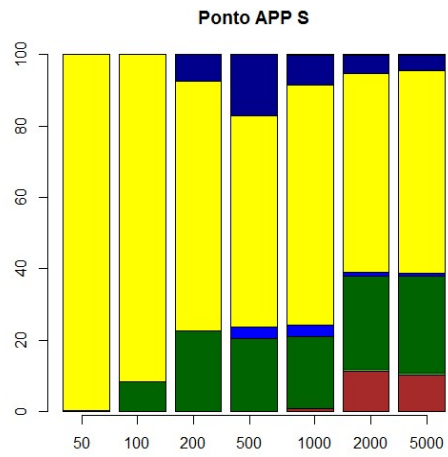
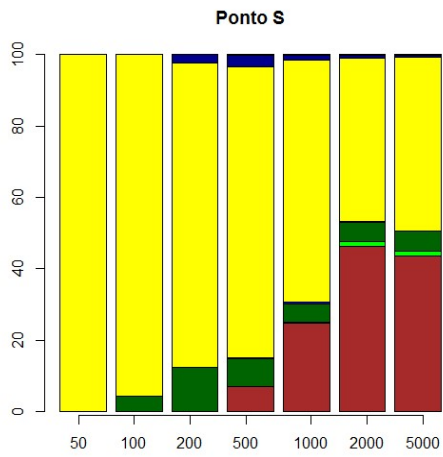
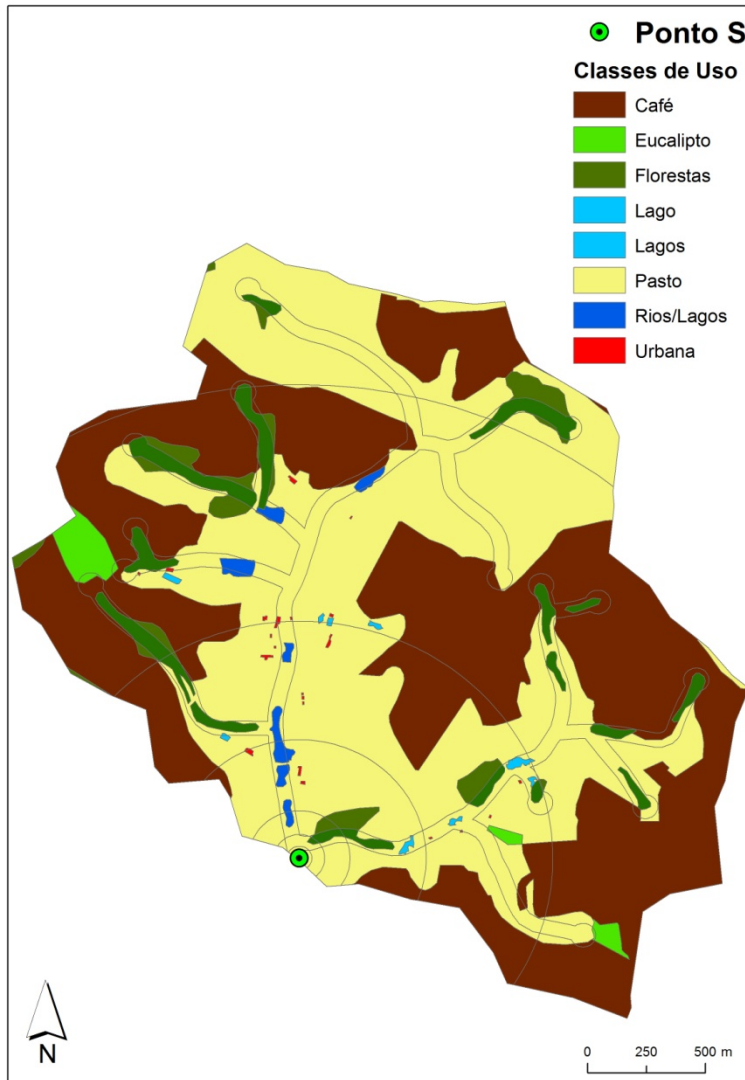
# Ponto P



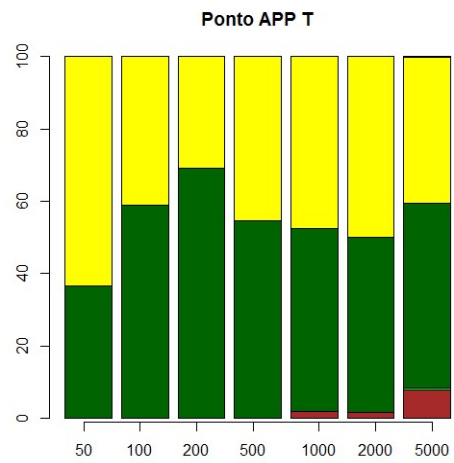
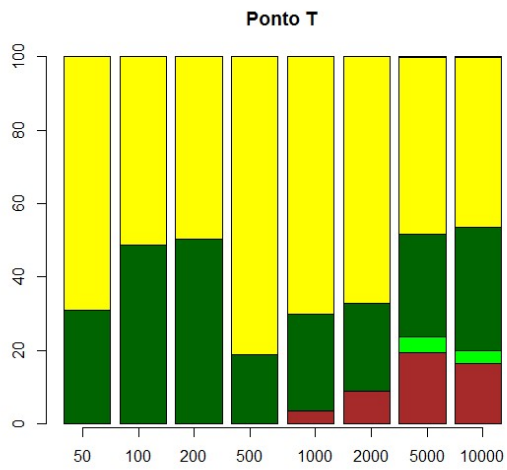
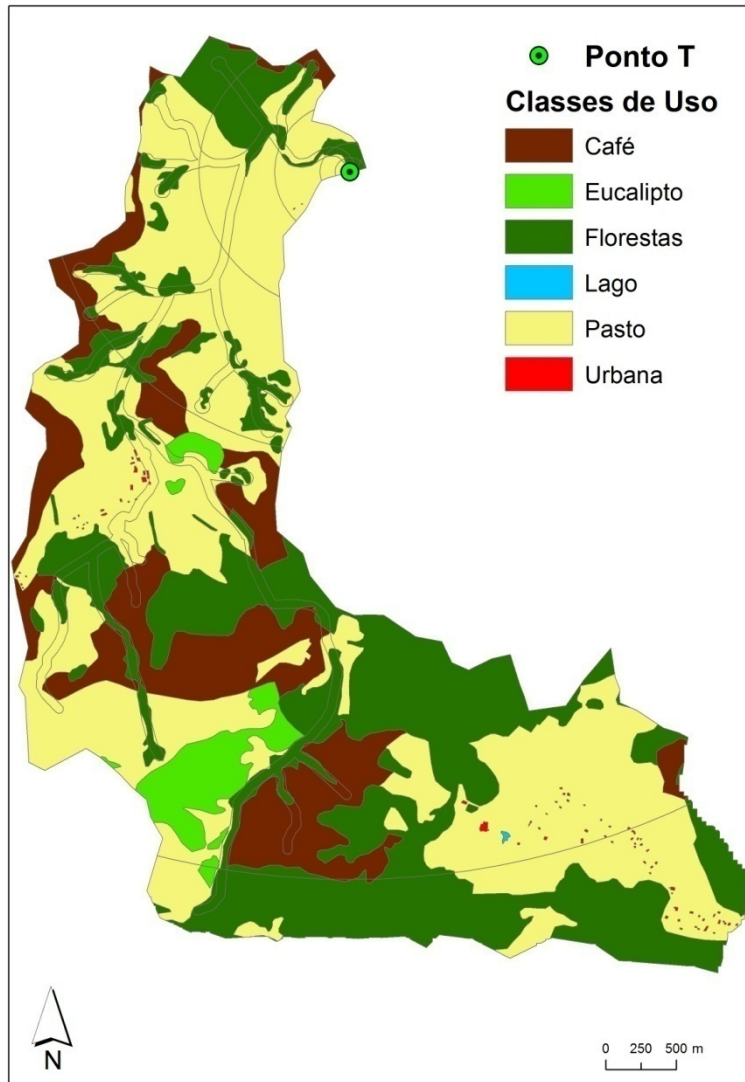
# Ponto Q



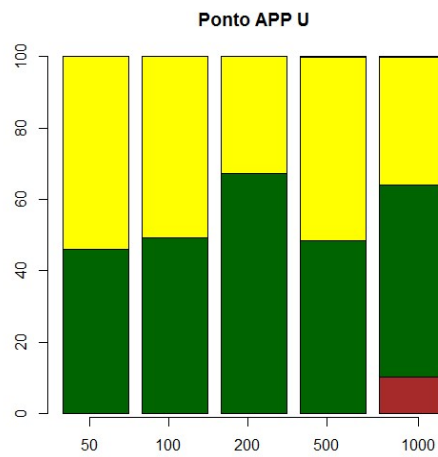
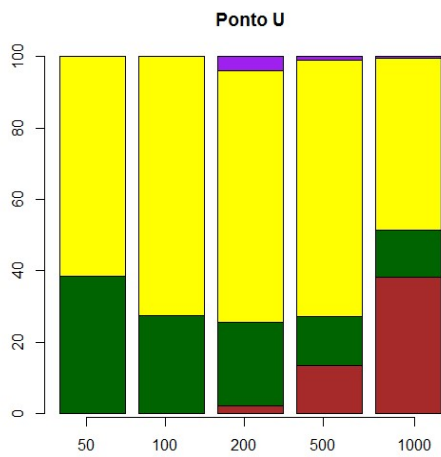
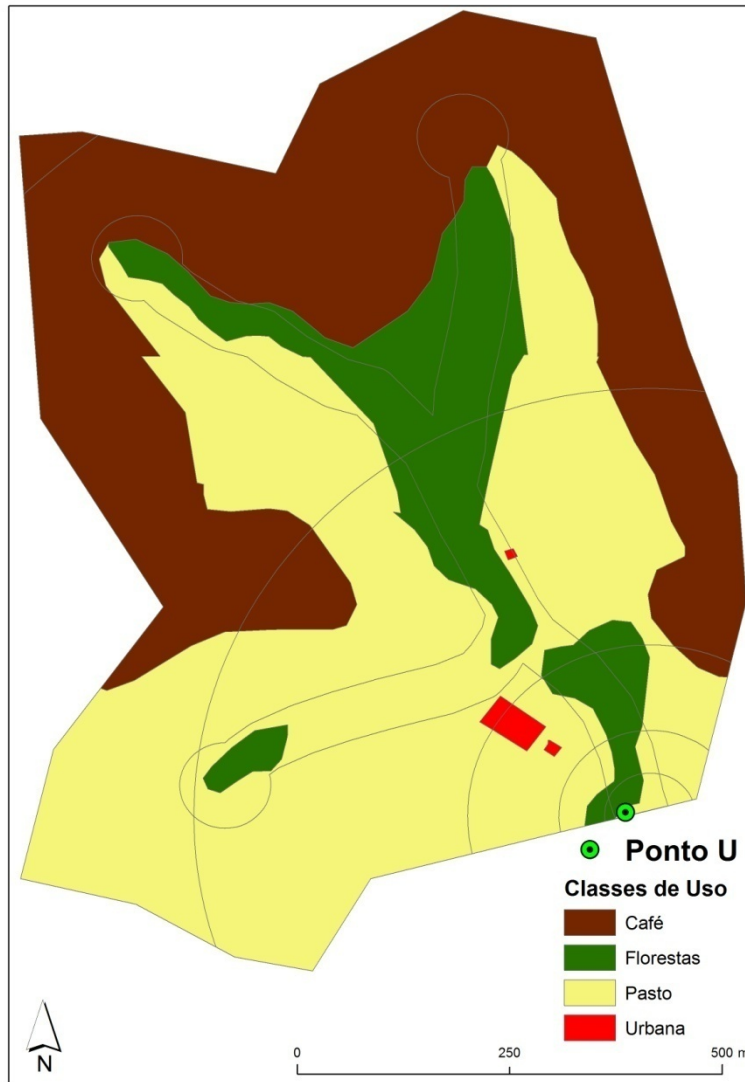
# Ponto S



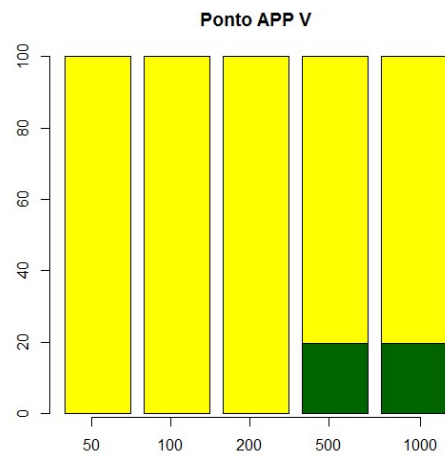
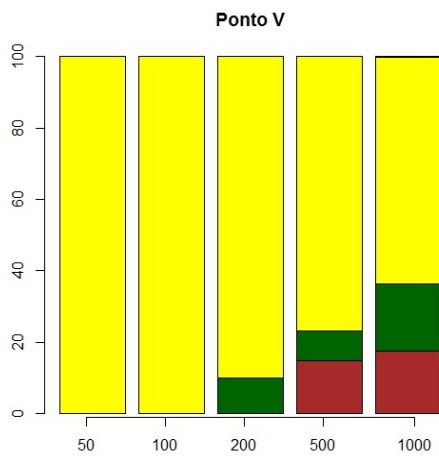
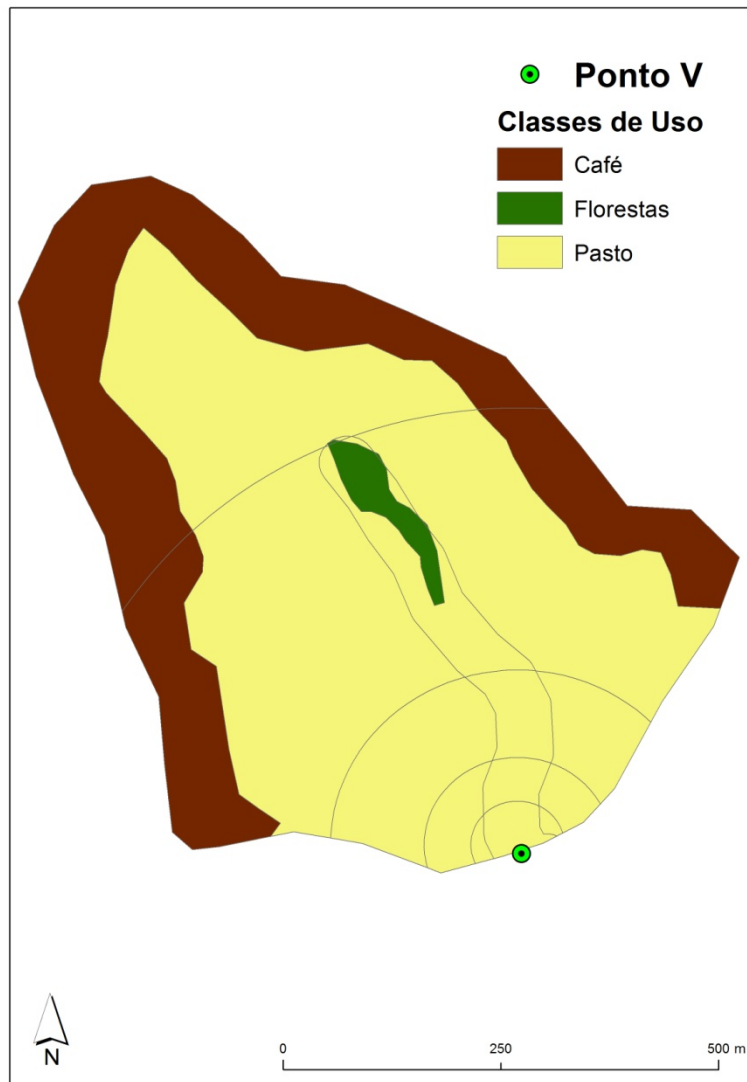
# Ponto T



# Ponto U

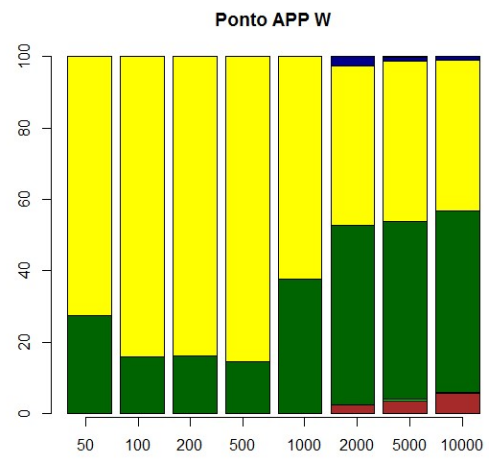
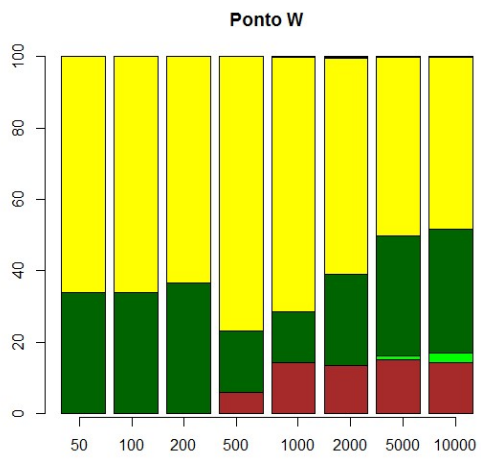
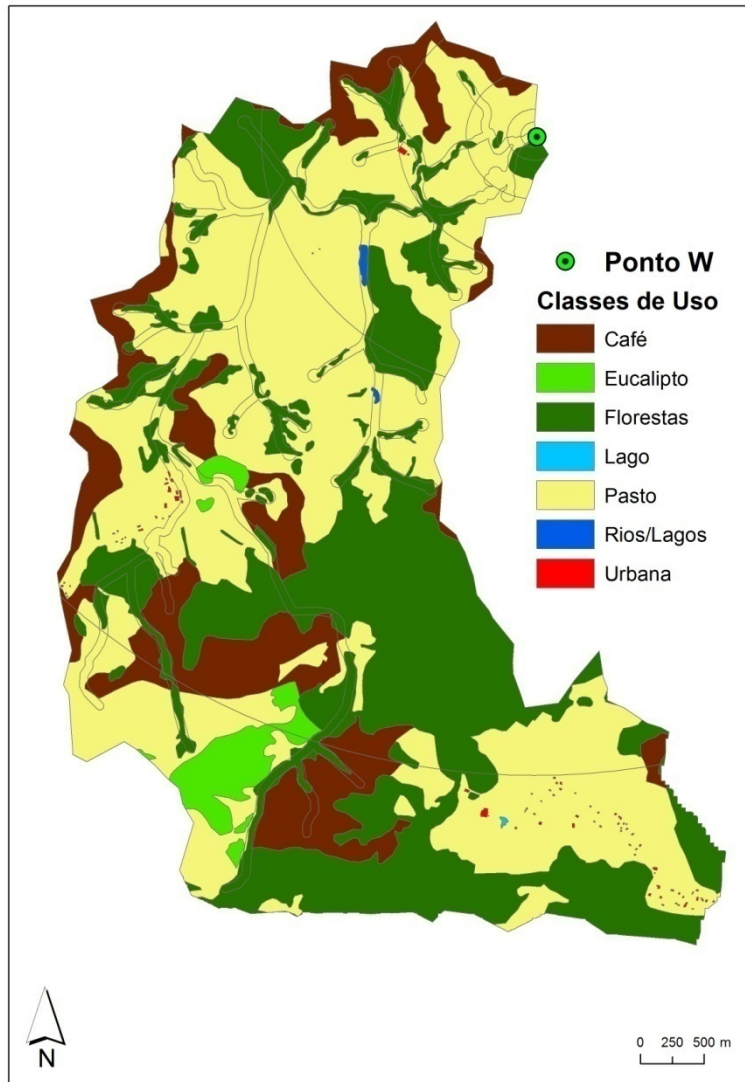


## Ponto V

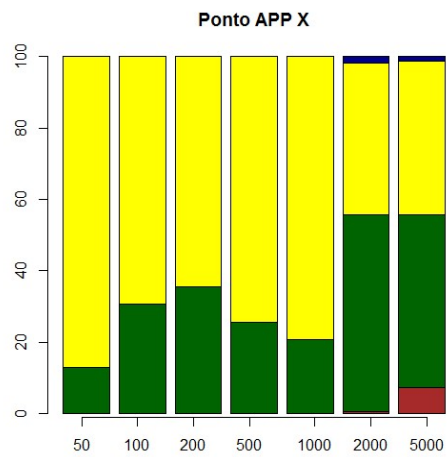
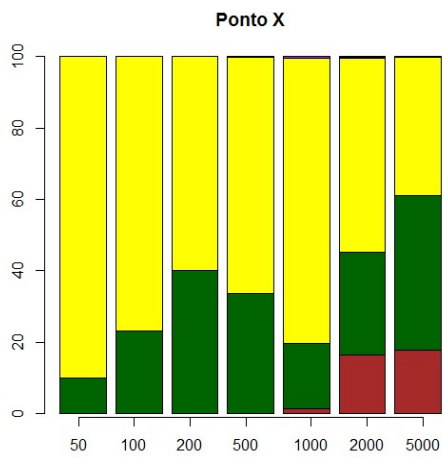
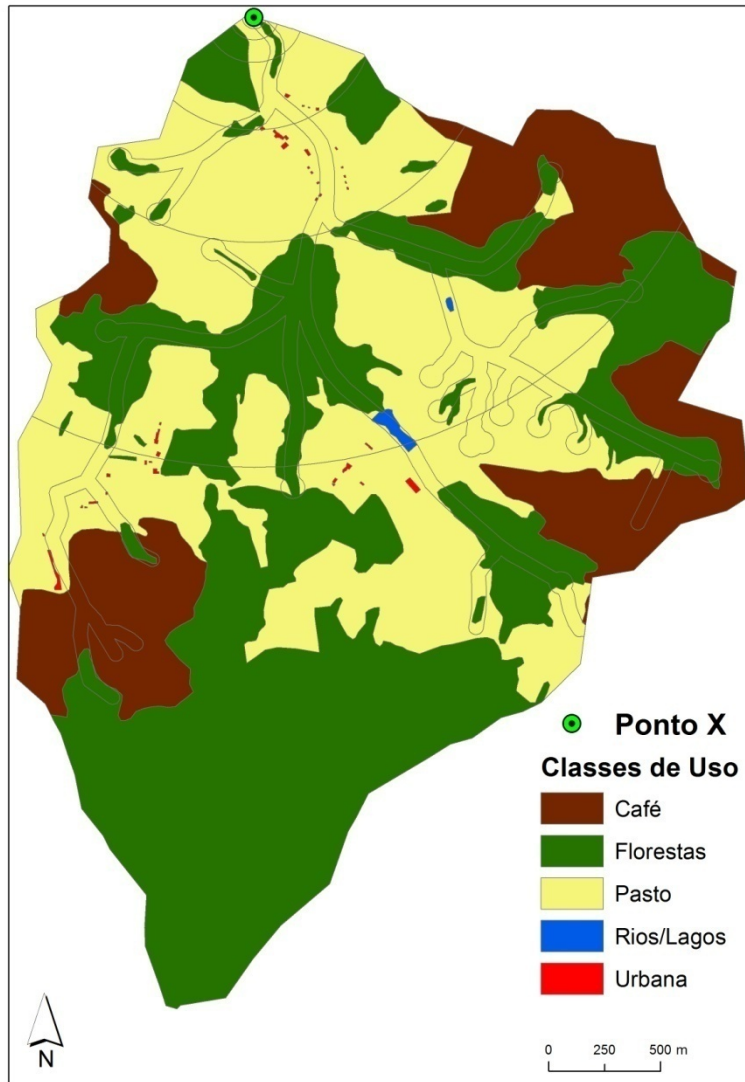




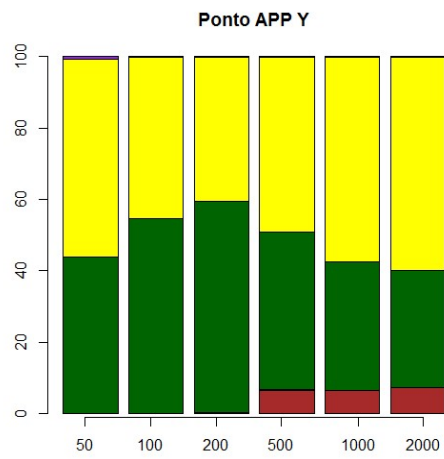
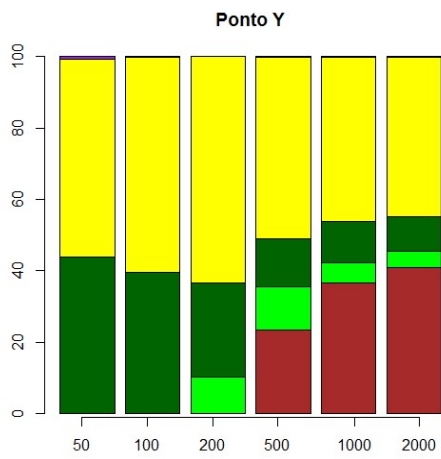
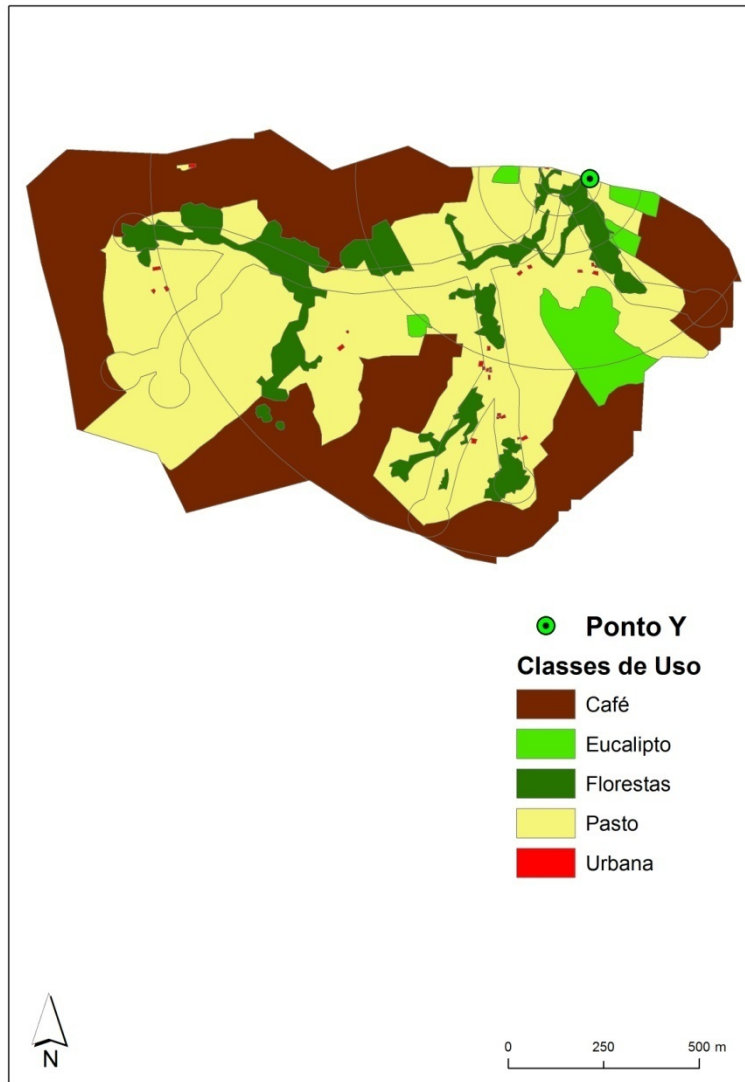
# Ponto W



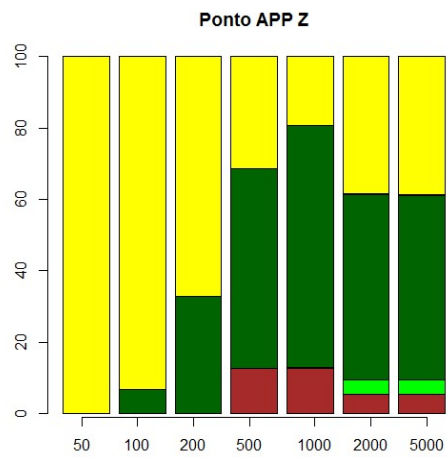
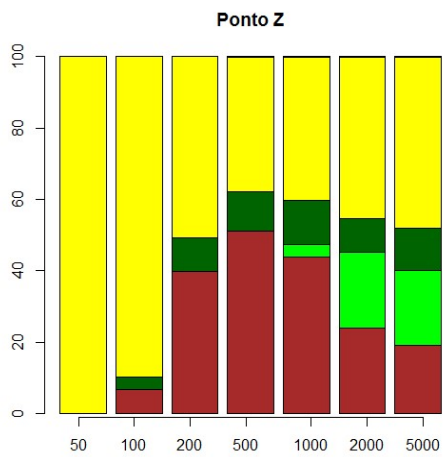
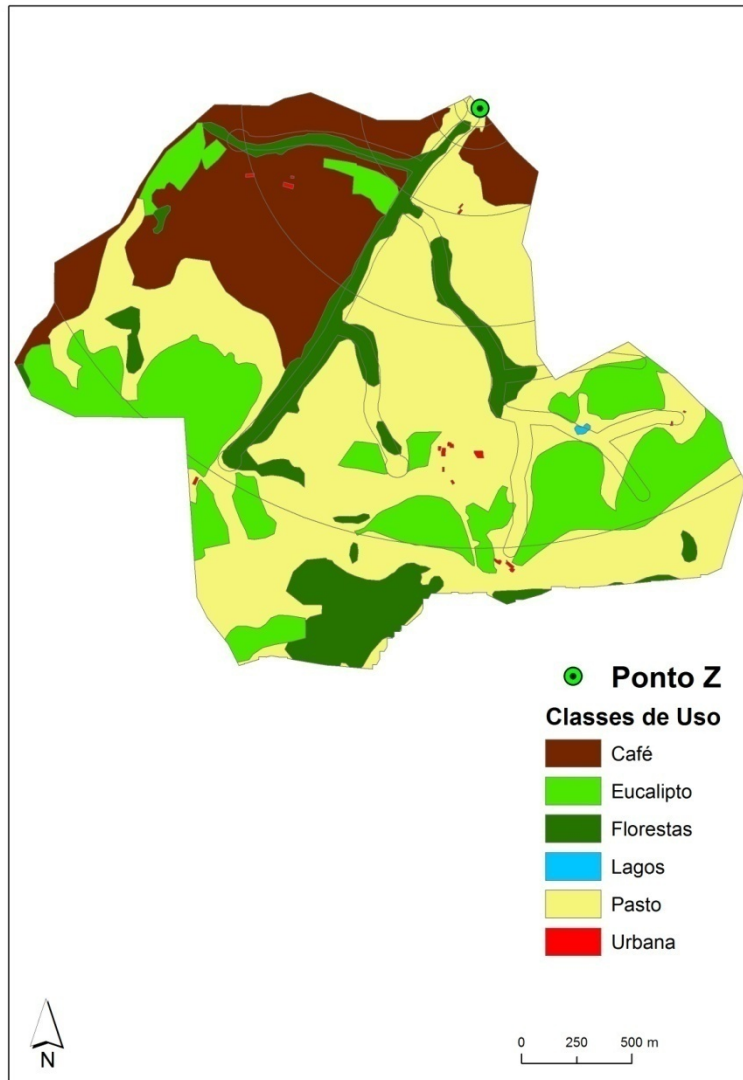
# Ponto X



# Ponto Y



# Ponto Z



## ANEXO C

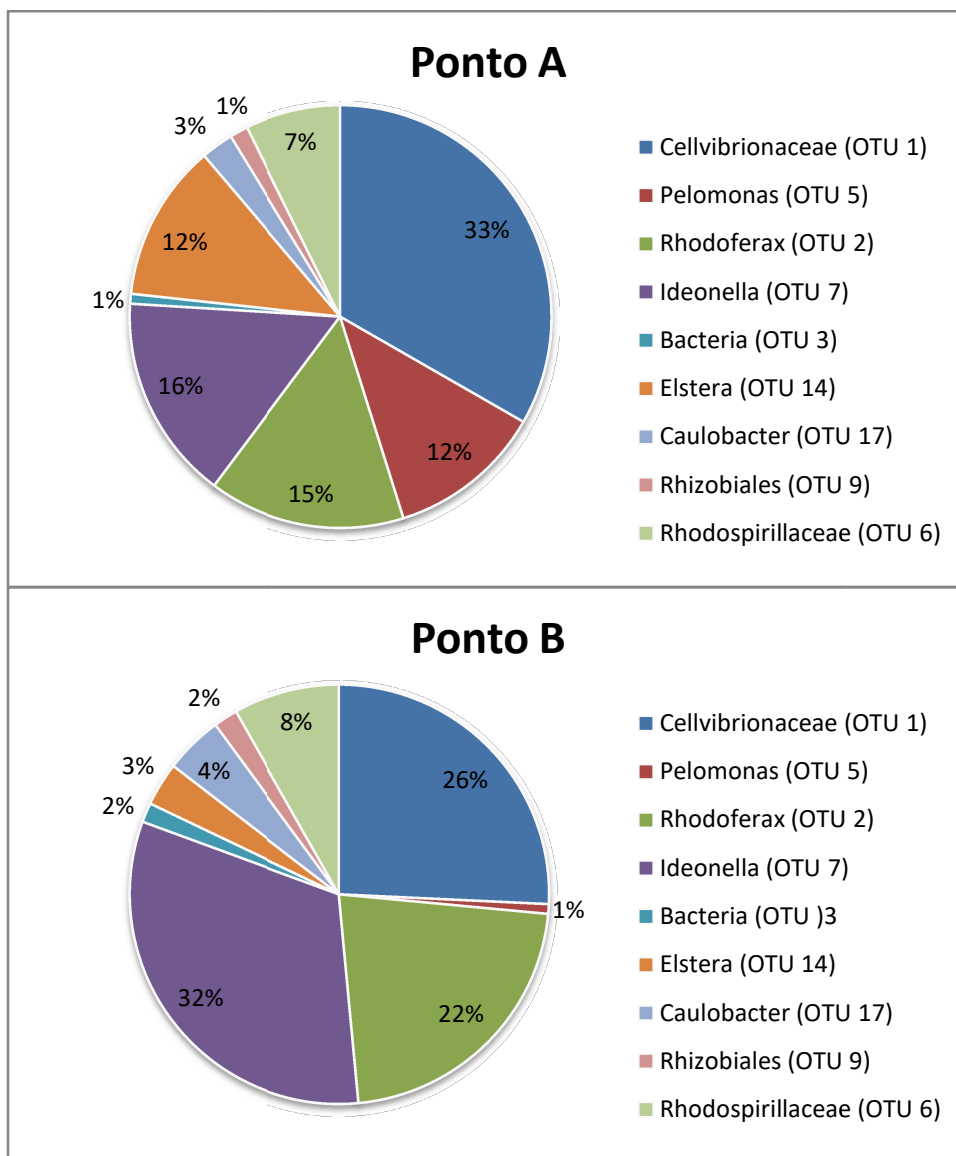
### Resultados das Análises Físico-Químicas

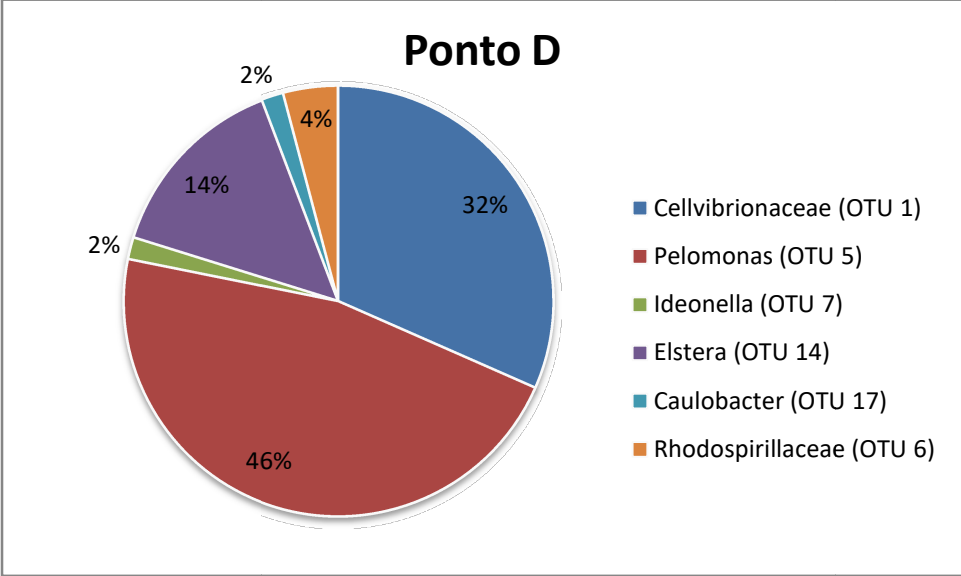
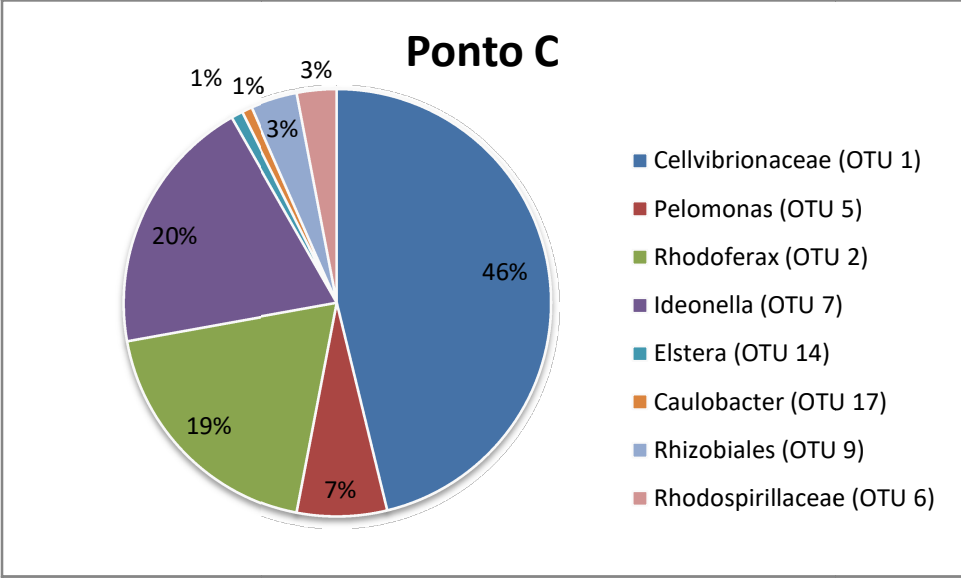
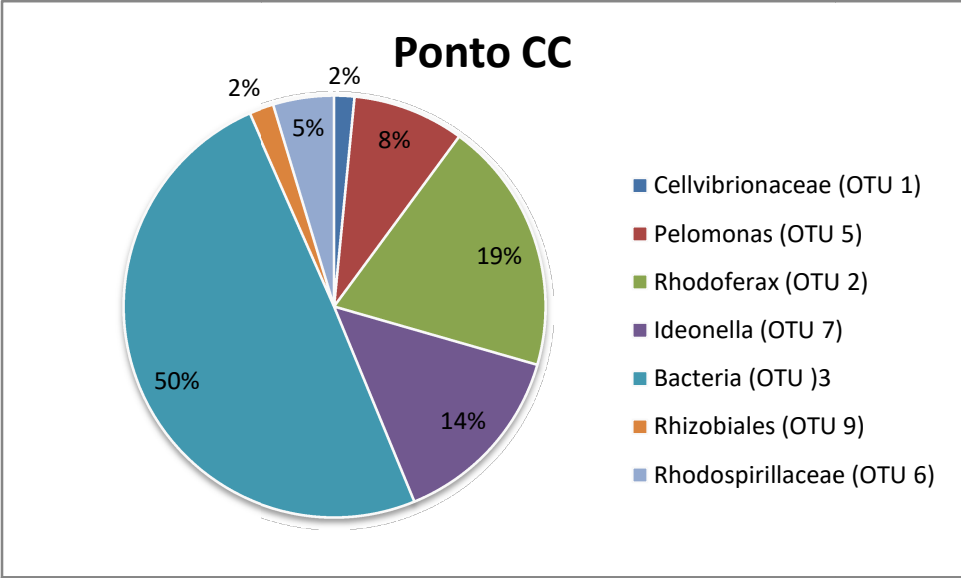
#### Pontos Variáveis Físico-Químicas

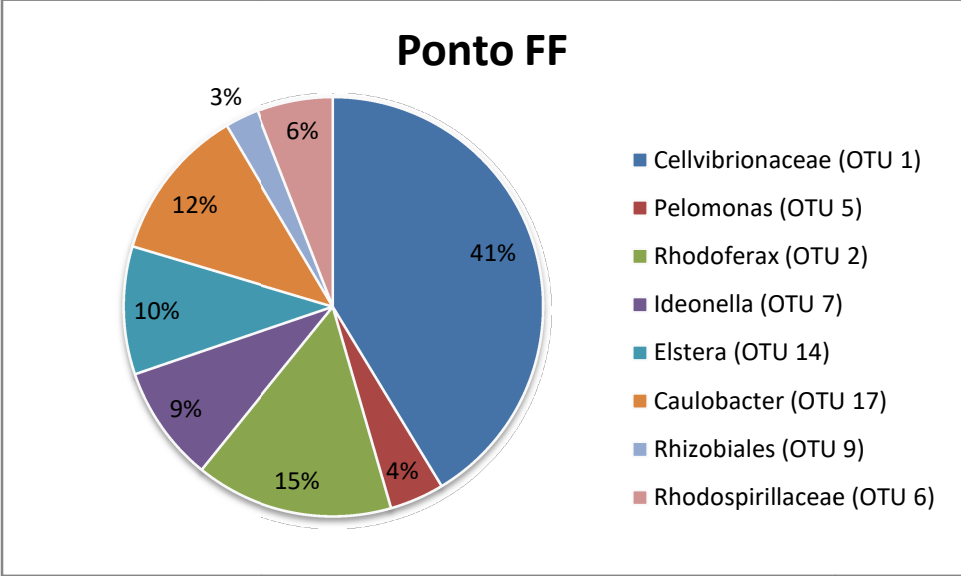
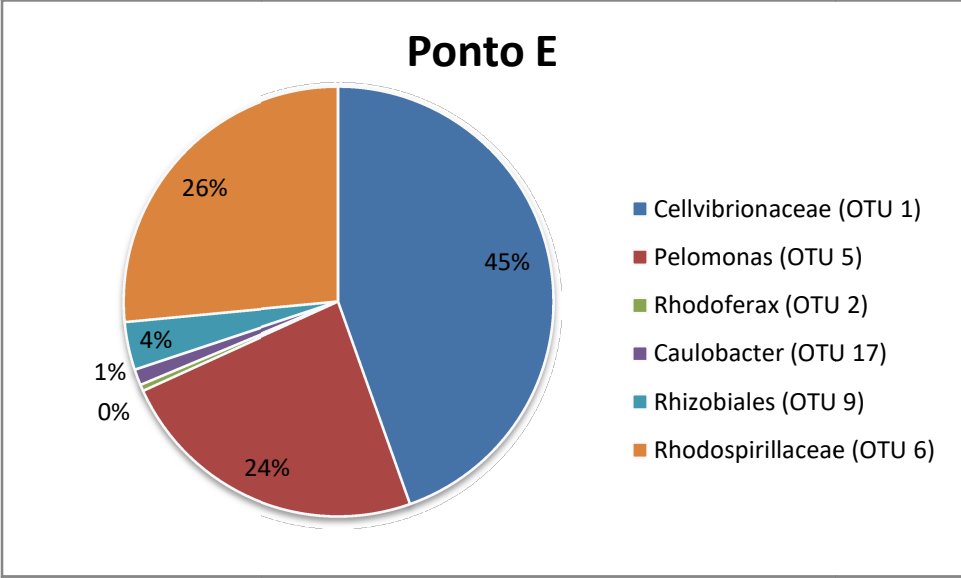
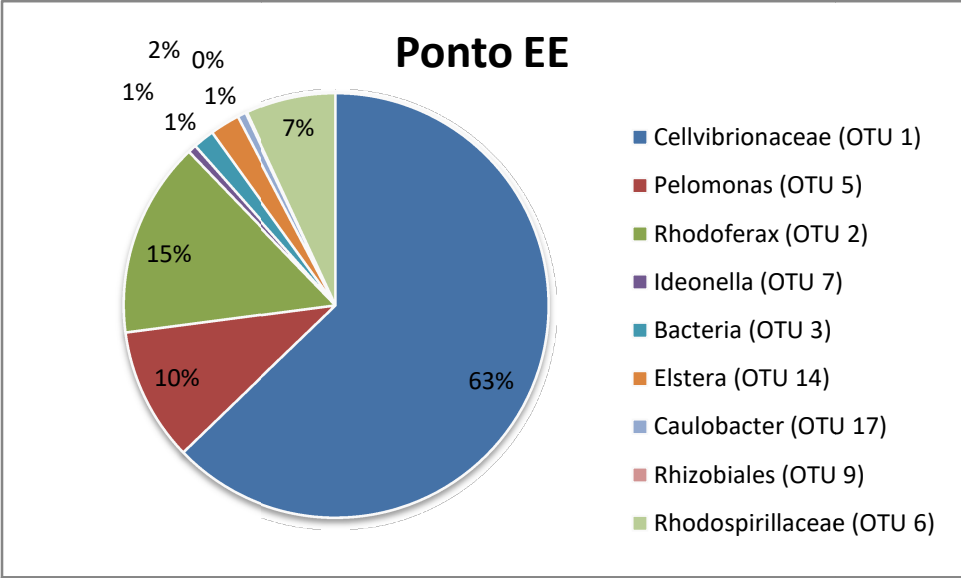
	Ph	Fe	Amônia	Fosfato	Sulfeto	Nitrito	Nitrato	N-NO3	Alcalinidade
<b>A</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	3.0996	0	AP=0
<b>B</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0.0984	0.4428	-0.5412	AP=0
<b>C</b>	6.8	0	0	0	x	0	4.428	0	AP=0
<b>CC</b>	6.8	0	0.3035	0	x	0	0.04428	0	AP=0
<b>D</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	2.214	0	AP=0
<b>E</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	2.214	0	AP=0
<b>EE</b>	6.8	0	0	0	x	0	0.13284	0	AP=0
<b>F</b>	6.8	-2	0.1214	0	x	0	0.13284	0	AP=0
<b>FF</b>	6.8	0	0	0	x	0	2.214	0	AP=0
<b>G</b>	7.2	0	0.1214	0	x	0	0	0	AP=0
<b>GG</b>	6.8	0	0	0	x	0	2.214	0	AP=0
<b>H</b>	7.2	1	0.1214	0	x	0.0328	11.07	10.742	AP=0
<b>HH</b>	6.8	1	0.1214	0	x	0	0.4428	0	AP=0
<b>I</b>	7.8	1	0.1214	0	x	0	0.4428	0	AP=0
<b>J</b>	6.8	0	0	0	x	0	0	0	AP=0
								-	
<b>JJ</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0.164	0.04428	1.59572	AP=0
<b>KK</b>	6.8	0	0.3035	0	x	0	0.13284	0	AP=0
<b>L</b>	7.2	0	0	0	x	0	2.214	2.214	AP=0
<b>M</b>	6.8	1	0.1214	0	x	0	0.4428	0	AP=0
<b>MM</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	2.214	0	AP=0
<b>N</b>	8	-1	0	0	x	0	0	0	AP=0
<b>OO</b>	6.8	0	0.607	0	x	0.164	4.428	2.788	AP=0
<b>P</b>	7.2	0	0.3035	0	x	0.328	4.428	1.148	AP=0
<b>Q</b>	7.2	0.5	0.1214	0	x	0.0328	11.07	10.742	AP=0
<b>S</b>	7.2	1	0.3035	0	x	0.0328	2.214	1.886	AP=0
<b>T</b>	6.8	0	0	0	x	0	0.4428	0	AP=0
<b>U</b>	6.8	1	0.1214	0	x	0	1.3284	0	AP=0
<b>V</b>	6.8	0	0	0	x	0	1.3284	0	AP=0
<b>W</b>	6.8	0	0	0	x	0	1.3284	0	AP=0
<b>X</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	1.3284	0	AP=0
<b>Y</b>	6.8	-1	0	0	x	0	0	0	AP=0
<b>Z</b>	6.8	0	0.1214	0	x	0	2.214	0	AP=0

## ANEXO D

### Porcentagens das 10 OUTs mais abundantes nos pontos de coleta

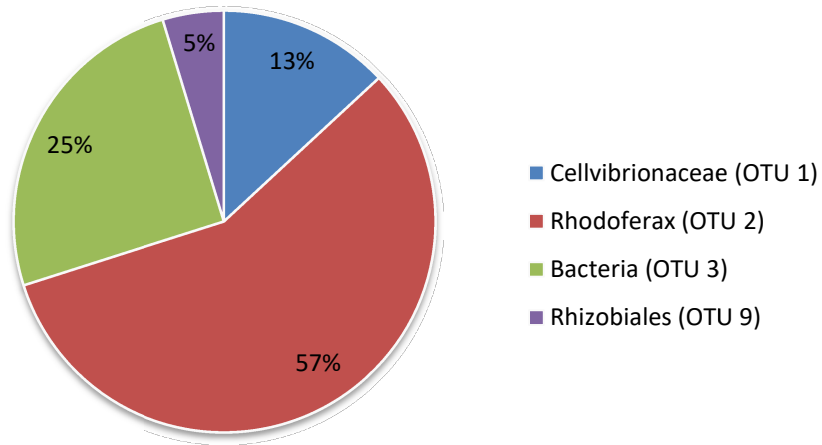




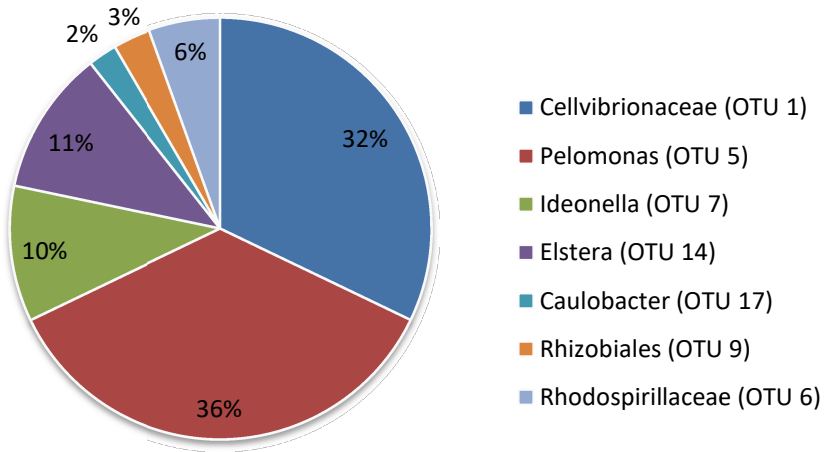




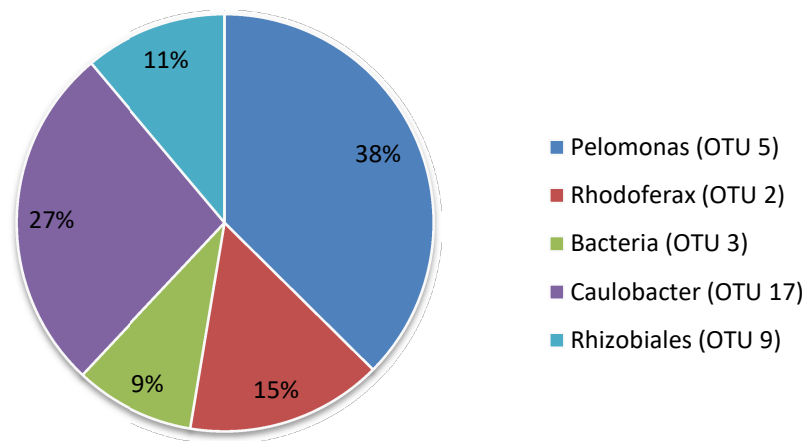
### Ponto F

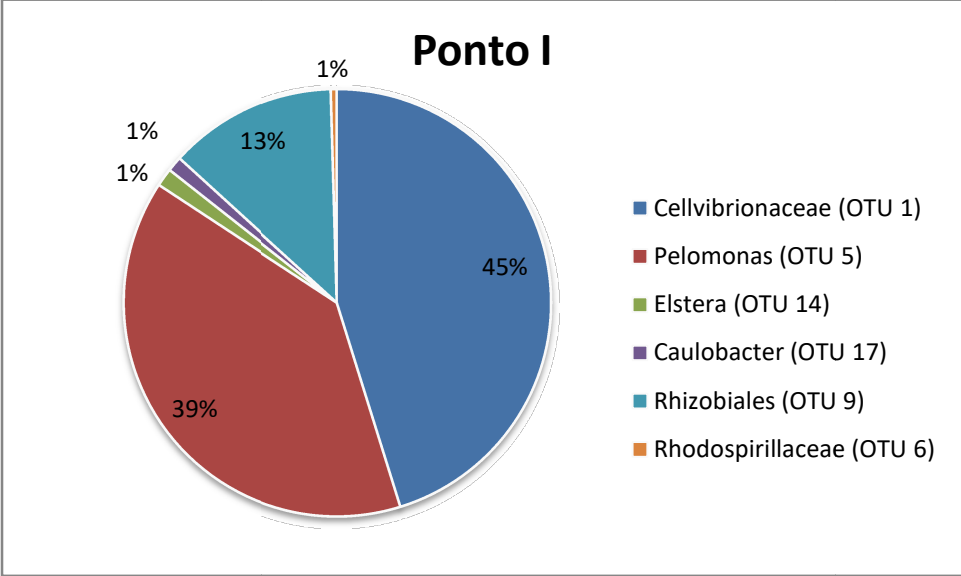
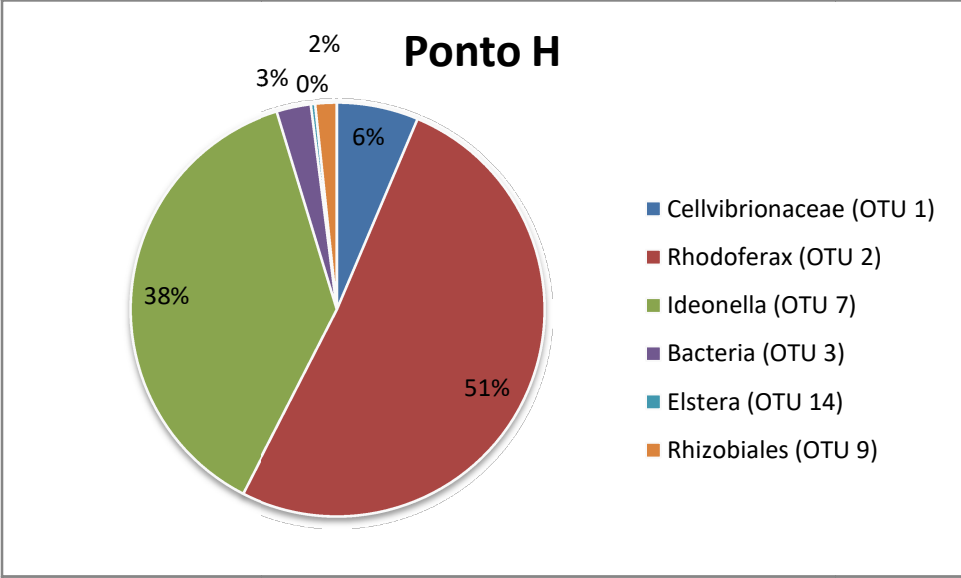
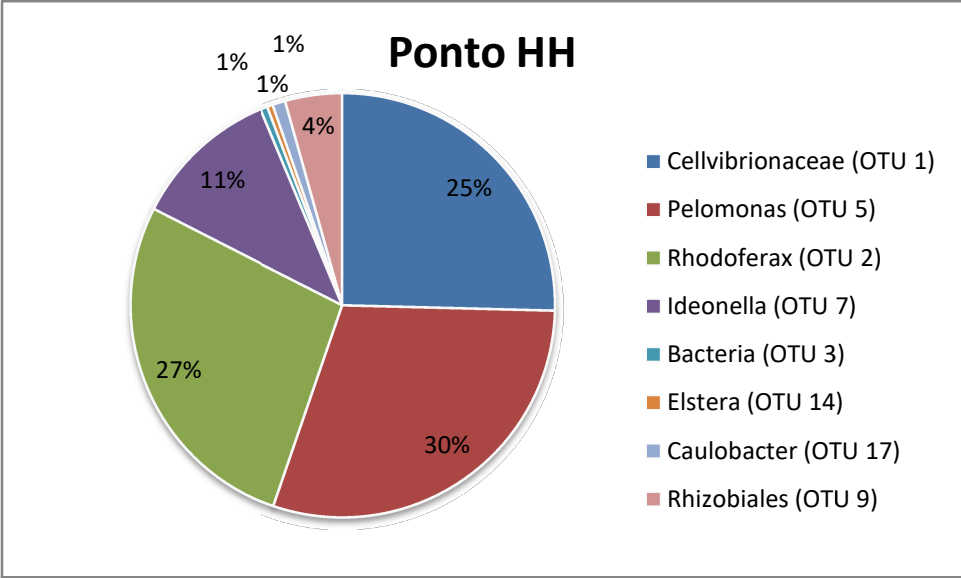


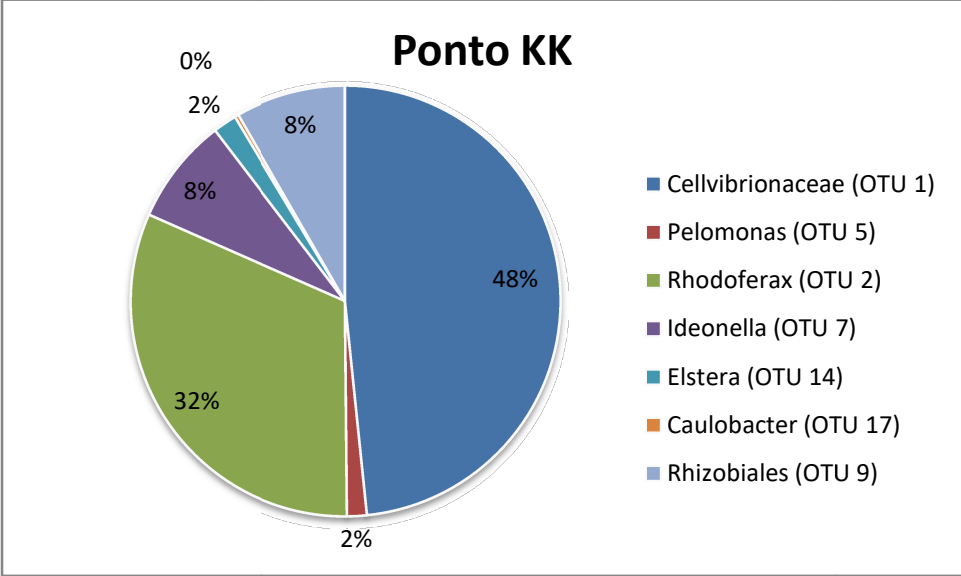
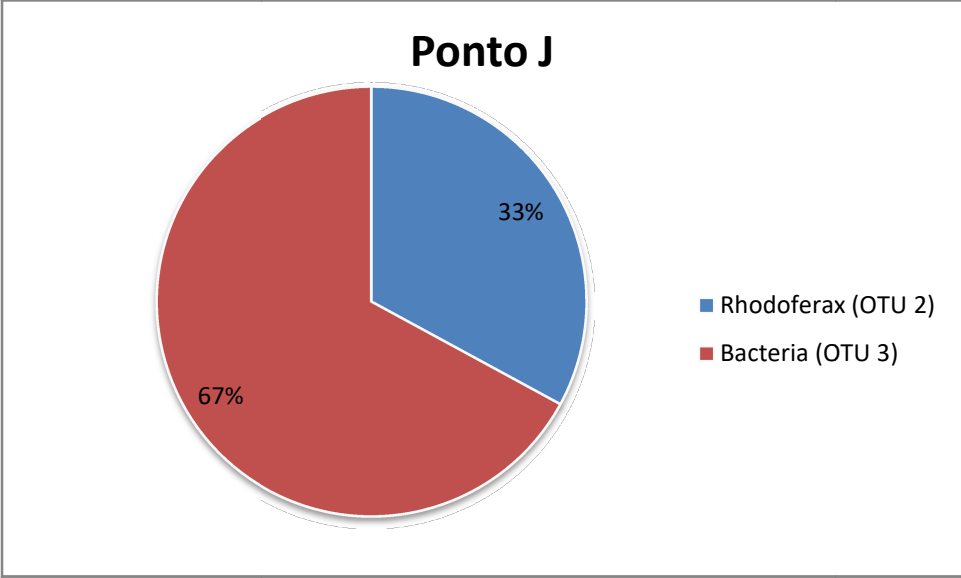
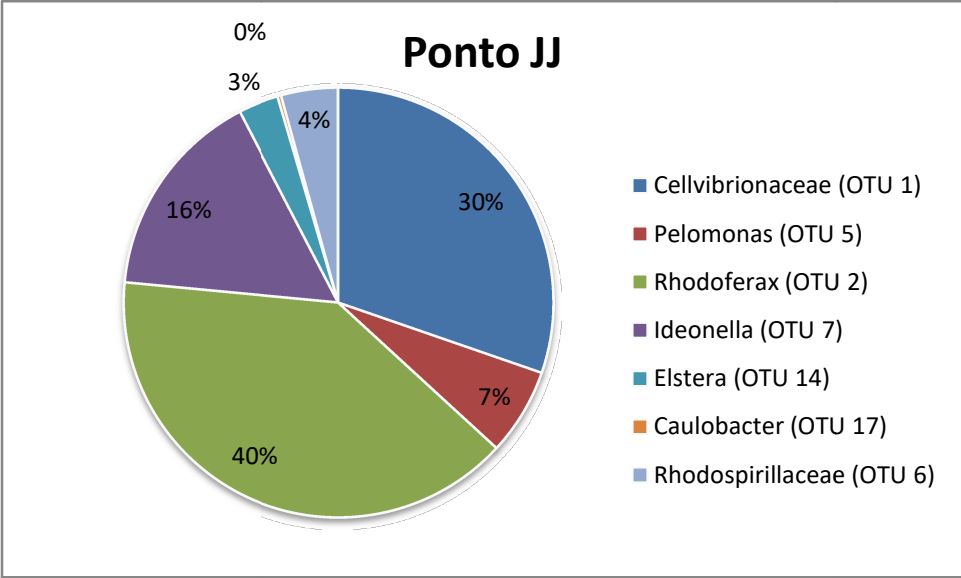
### Ponto GG

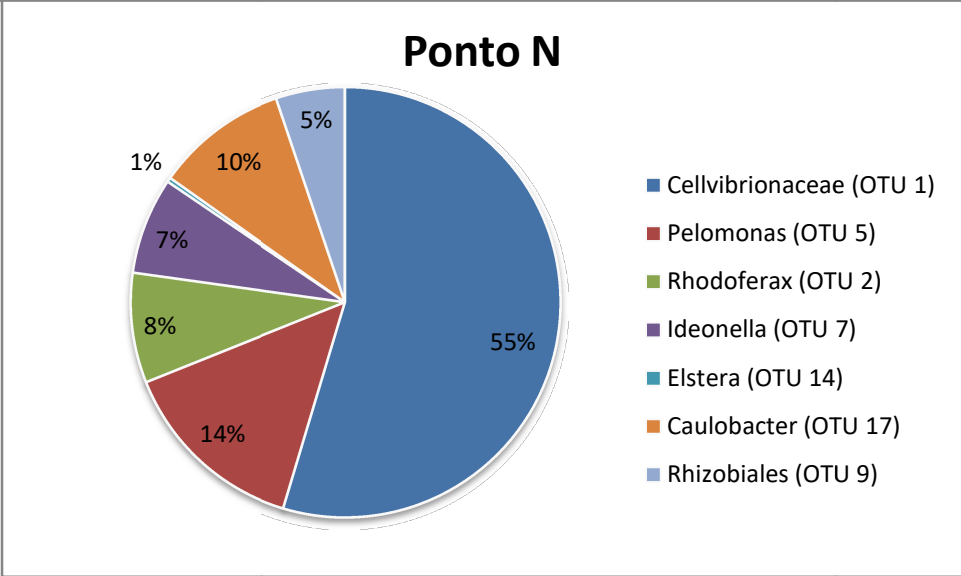
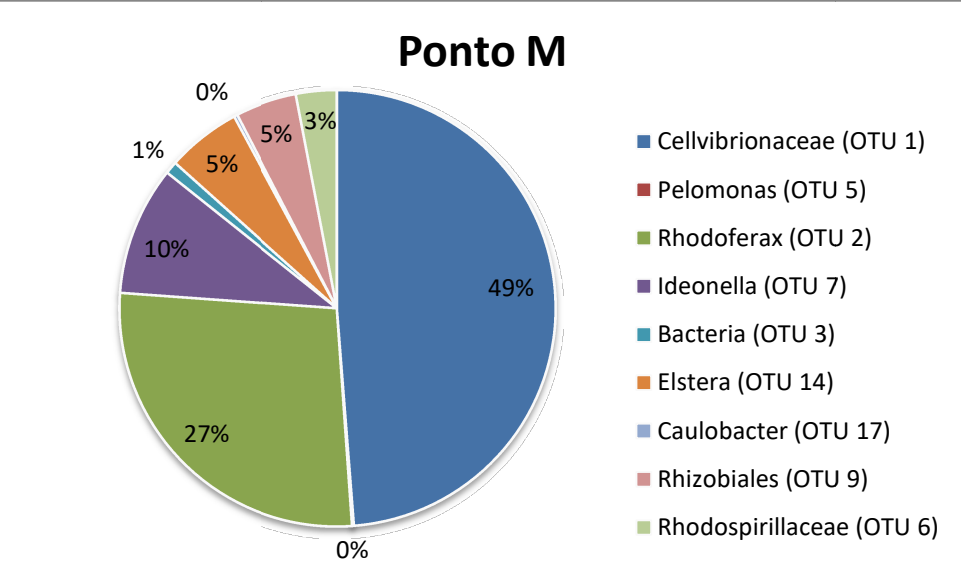
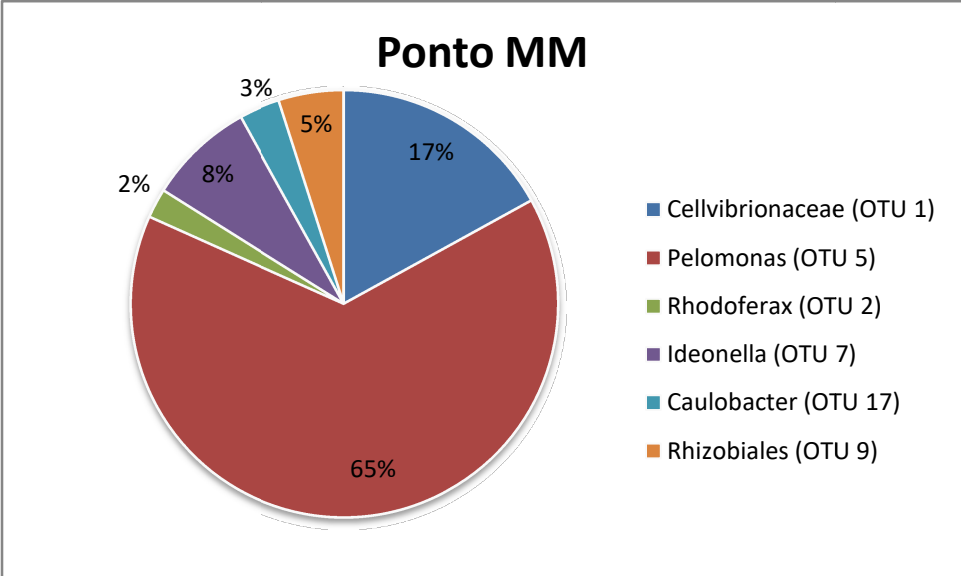


### Ponto G

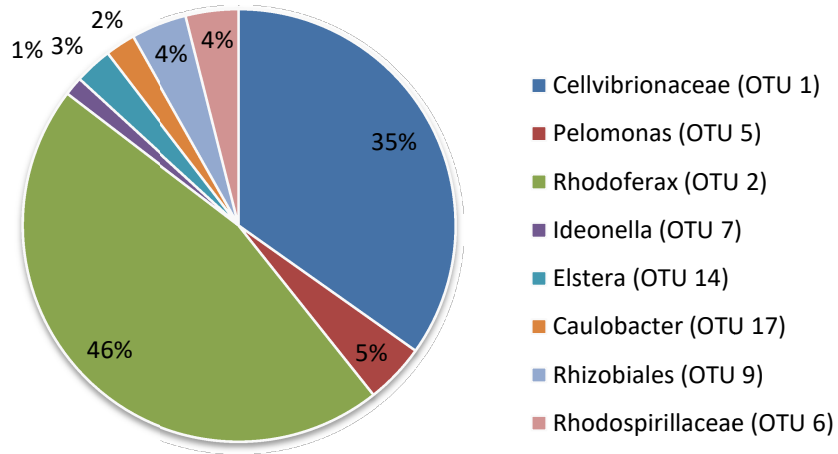




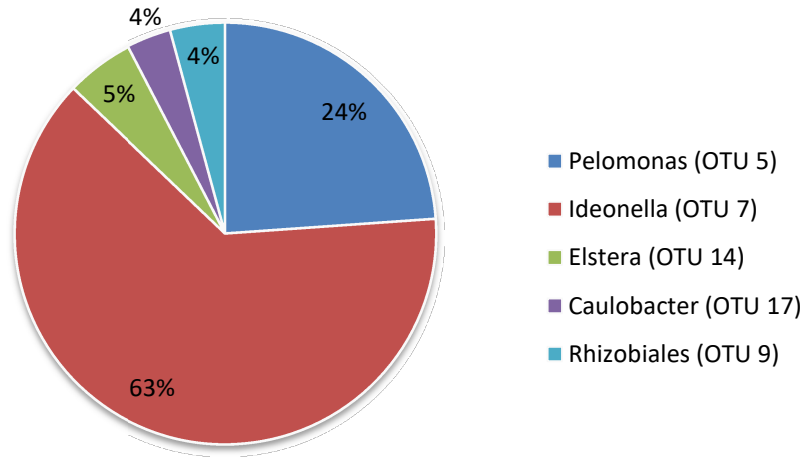




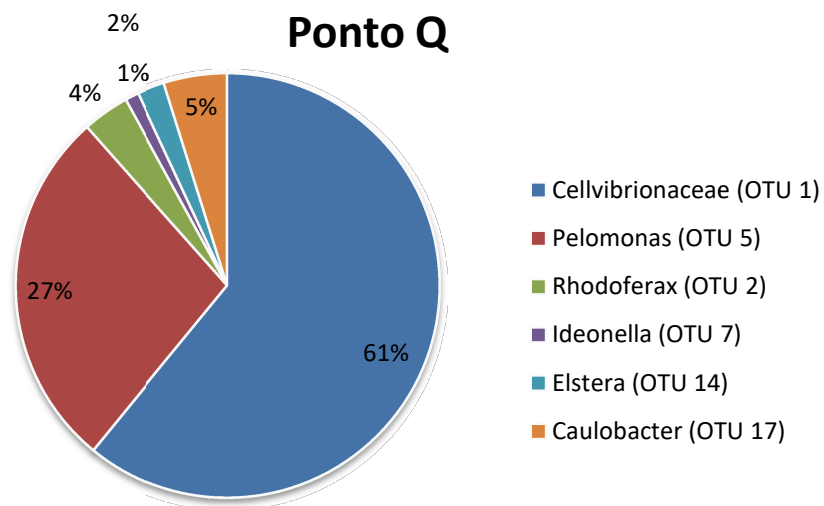
### Ponto OO

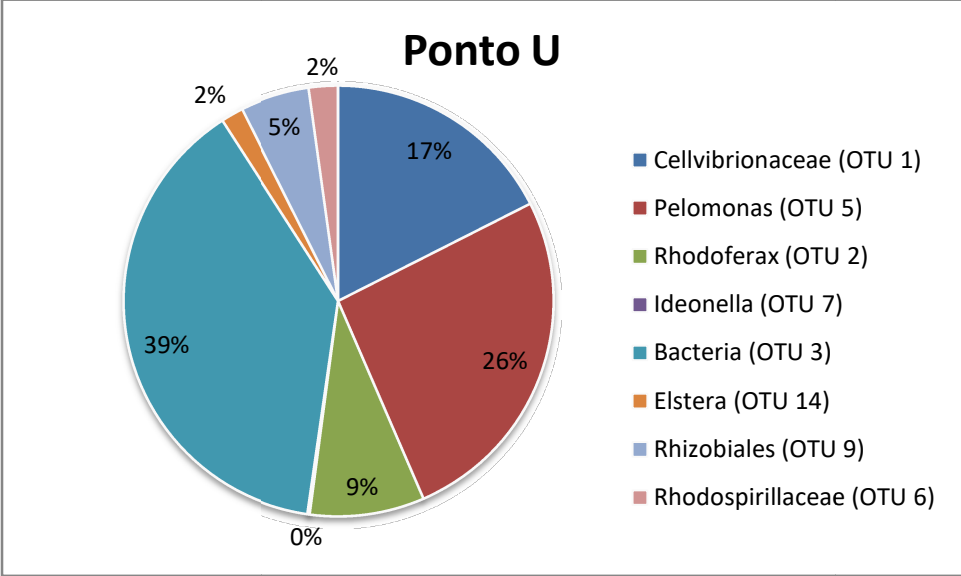
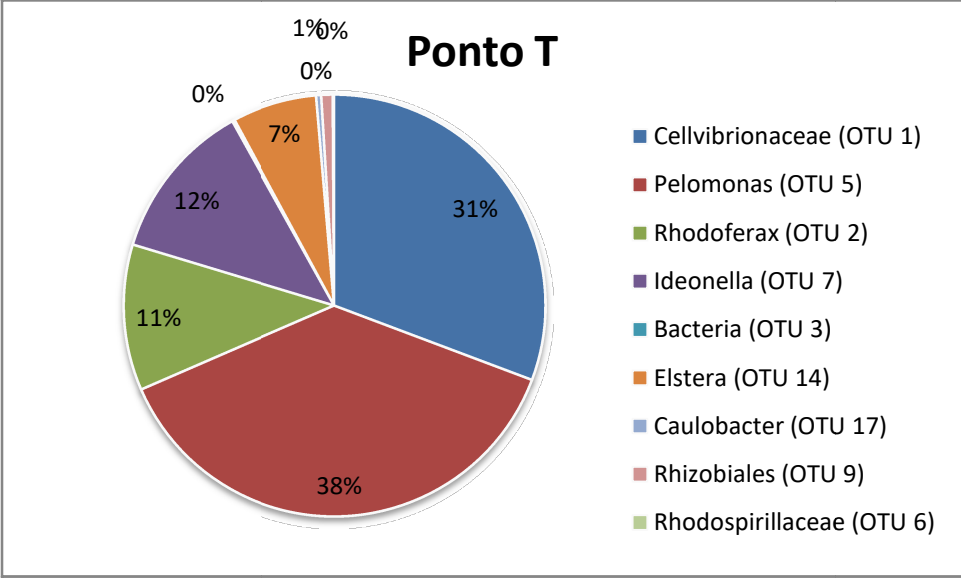
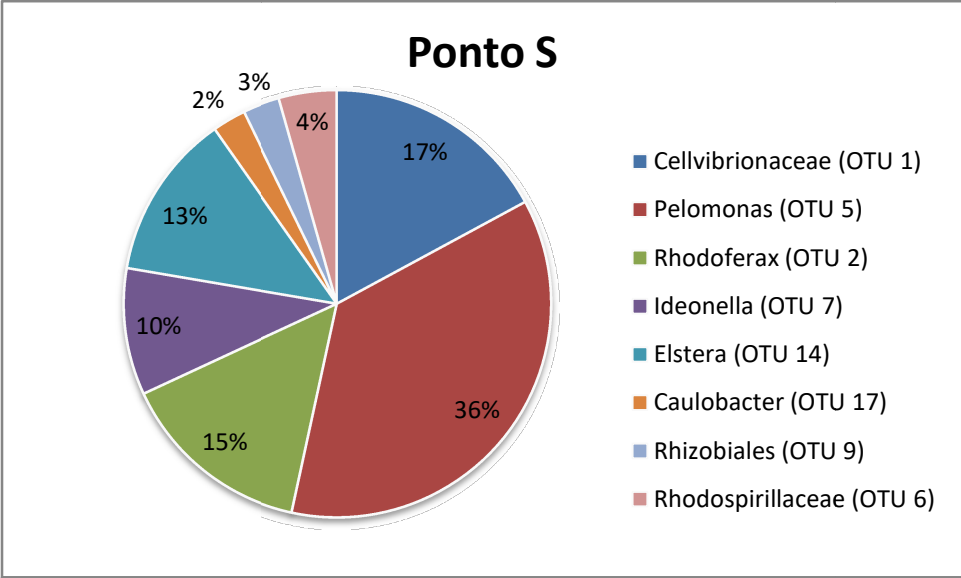


### Ponto P

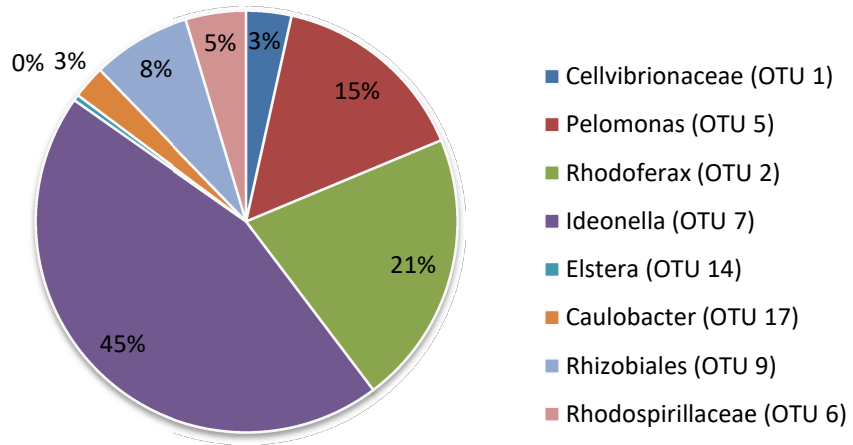


### Ponto Q

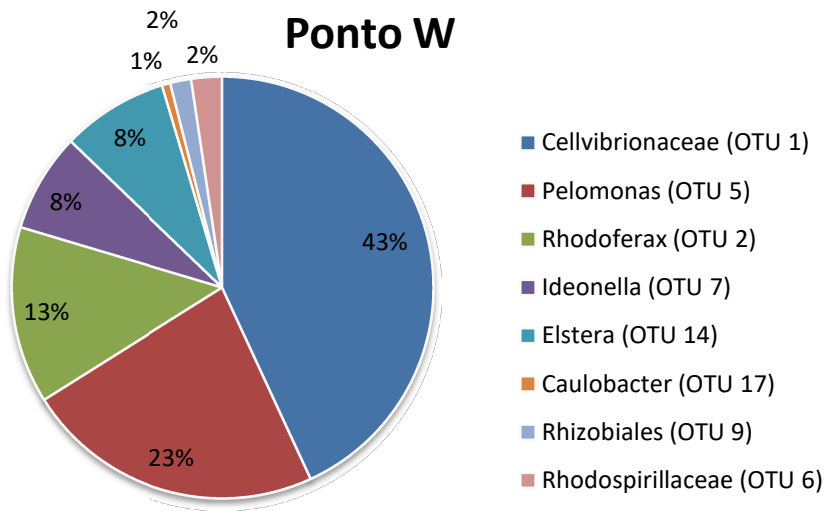




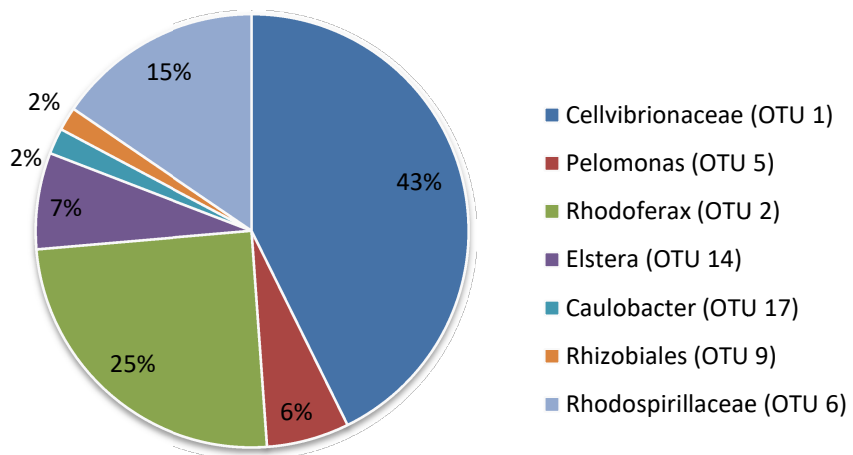
### Ponto V

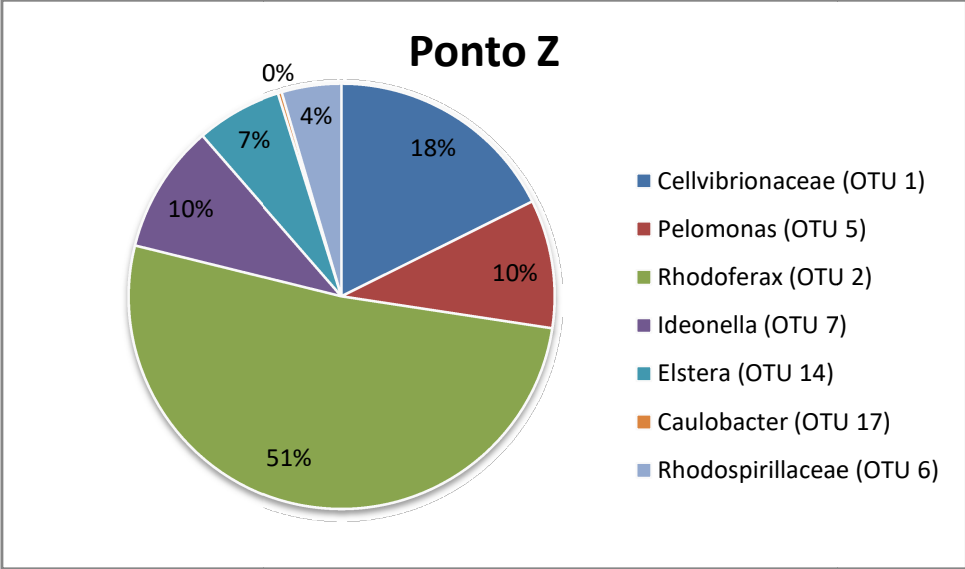
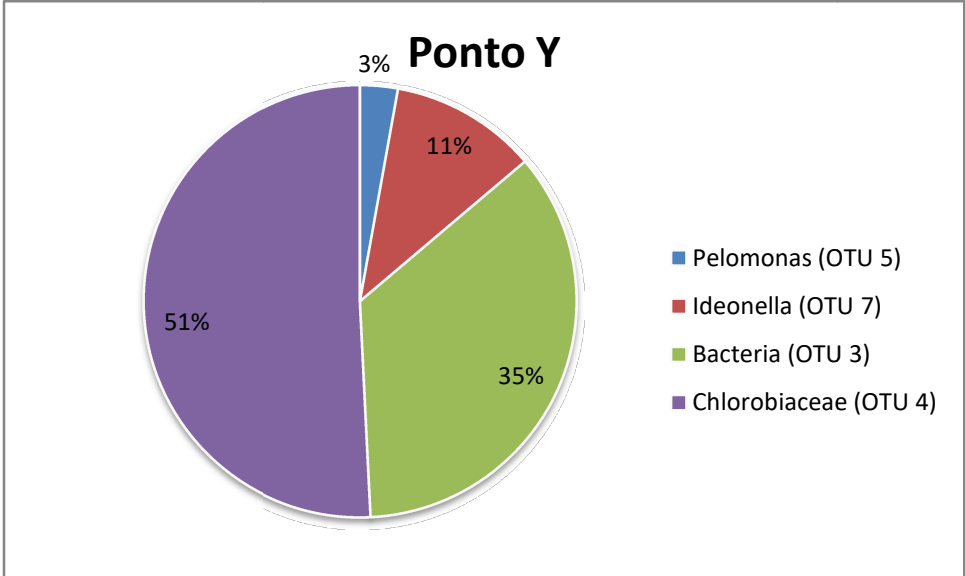


### Ponto W



### Ponto X







## ANEXO E

### Tabela de Ocorrências das 10 OTUs

OTU	Silva Name	Número de acesso	Referência	Fonte	Localização
1	Bacteria(100); Proteobacteria(96); Gammaproteobacteria(94); Cellvibrionales(75); Cellvibrionaceae(75)	NOT	NOT		
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	KP636091	TITLE Conservation of ethB genes in diverse ETBE enrichment cultures dominated by Hydrogenophaga and Mesorhizobium phylotypes JOURNAL Unpublished	"polluted aquifer, water from an upstream monitoring well"	"France"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	KP975302	TITLE Diversity of bacterioplankton in the surface seawaters of Drake Passage near the Chinese Antarctic station JOURNAL FEMS Microbiol. Lett. (2015) In press PUBMED 26184094	"surface water"	China
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	KM221378	TITLE Linking microbial community structure to the S, Fe and N biogeochemical cycling in the hot springs at Tengchong geothermal fields, China JOURNAL Unpublished	"hot spring"	China
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	KJ676402	TITLE Bacterial diversity of neotropical fishfarm freshwater in Brazil JOURNAL Unpublished	"oligotrophic freshwater fishfarm"	Brazil
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JX458407	TITLE Microbial Diversity of Groundwaters and Bottled Natural Mineral Waters JOURNAL Unpublished	"bottled mineral water"	"Portugal"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	HF679070	TITLE Application of special oligotrophic media for determination of bacterial communities originated from ultra pure water JOURNAL Unpublished	"ultra pure water"	??

5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JX285681	TITLE Characterization of Drinking Water Bacterial Community Structures in Bulk Water Samples Collected from a Metropolitan Distribution System JOURNAL Unpublished	"Cincinnati drinking water system"	"USA"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JQ288603	TITLE Release of manganese from groundwater treatment filter media JOURNAL Unpublished	"full-scale drinking water treatment plant green sand filter media"	"USA: Lantern Hill, CT"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JQ178158	TITLE Spatial heterogeneity of bacterial communities in sediments from an infiltration basin receiving highway runoff JOURNAL Microb. Ecol. 64 (2), 461-473 (2012) PUBMED 22391798	"sediment from an infiltration basin"	"USA: Plymouth, MA"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	HE678733	TITLE Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization JOURNAL Environ. Microbiol. 15 (6), 1687-1706 (2013) PUBMED 23731249	"alkaline groundwater"	"Portugal:Southeast, Cabeco de Vide"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JN860405	TITLE Molecular evidences for microorganisms participating in the Fe and S biogeochemical cycling in the low temperature hydrothermal environments at the South West Indian Ridge JOURNAL Unpublished	"low temperature hydrothermal oxides at the South West Indian Ridge"	The South West Indian Ridge
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	JN868837	TITLE Spatial and Temporal Variability of Bacterial Communities in the Water of Lake Taihu JOURNAL Unpublished	"lake water"	China
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	GU761270	TITLE Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant JOURNAL Microbes Environ. 26 (2), 149-155 (2011) PUBMED 21502735	"drinking water (treatment 2)"	??
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	FM211753	TITLE Bacterial community structure of sediments of the bizerte lagoon (Tunisia), a southern Mediterranean coastal anthropized lagoon JOURNAL Microb. Ecol. 59 (3), 445-456 (2010) PUBMED 19789910	"sediment of Bizerte lagoon"	"Tunisia: Bizerte"

5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	FJ719088	TITLE Protozoan grazers alter the diversity of metabolically active bacteria in aquifer sediments JOURNAL Unpublished	"aquifer sediments"	"USA: Waquoit Bay National Estuarine Research Reserve, Waquoit, Massachusetts"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	GU212839	TITLE Phylogenetic diversity of bacteria in ballast water at Ningbo port JOURNAL Unpublished	"ballast water"	China
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	AM989116	TITLE High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms JOURNAL ISME J 3 (3), 314-325 (2009) PUBMED 19020559	"lake water"	"Finland"
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	AB176187	TITLE Spatial distribution, diversity and composition of bacterial communities in sub-seafloor fluids at a deep-sea hydrothermal field of the Suiyo Seamount JOURNAL Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap. 56, 1844-1855 (2009)	"PCR-derived sequence from vent area water"	??
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	AY375142	TITLE Bacterial Community in sediment from the western Pacific Warm Pool and its relationship to environment JOURNAL China Environ. Sci. 48, 282-290 (2005)	"deep sea sediment"	??
5	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Pelomonas(91)	AJ583173	TITLE Molecular analysis of bacterial communities in ground waters of the deep-well injection site Tomsk-7, Siberia, Russia JOURNAL Unpublished	"ground water from a monitoring deep-well at a radioactive waste disposal site"	"Russia:Siberia, Tomsk-7"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	HQ436703	TITLE Influence of salinity on bacterial community composition in Lake Bosten, a large oligosaline lake in the arid northwestern China JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 78, 4748-4751 (2012) PUBMED 22522679	"lake water"	"China: Lake Bosten"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	GU635577	TITLE Microbial community analysis and identification of alternative host-specific fecal indicators in fecal and river water samples using pyrosequencing JOURNAL J. Microbiol. 49 (4), 585-594 (2011) PUBMED 21887641	"river water"	??

2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AB518642	TITLE Preparation of genomic DNA from a single species of magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 76 (5), 1480-1485 (2010) PUBMED 20081000	"sediment in a water well"	"Japan:Chiba, Kimitsu, Kururi"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	GQ340350	TITLE Variability of Prokaryotic Community Structure in a Drinking Water Reservoir (Marathonas, Greece) JOURNAL Microbes Environ. 27 (1), 1-8 (2012) PUBMED 21971081	"water column"	"Greece: Marathonas Reservoir"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	GQ240200	TITLE Abundance and diversity of biofilms in natural and artificial aquifers of the Aspo Hard Rock Laboratory, Sweden JOURNAL Microb. Ecol. 61 (2), 410-422 (2011) PUBMED 21132427	"Aespoe hard rock laboratory fracture KA1362-A06, groundwater"	??
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	FN297285	TITLE Impact of immigrant airborne bacteria in an altitude gradient of sentinel lakes of the Pyrenees JOURNAL Unpublished	"Lake Nera water column"	"Spain:Central Pyrenees"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	EU580469	TITLE Benthic diatoms and associated bacteria from Lake Constance: bacterial phylogeny and functional interactions regarding growth and EPS-secretion JOURNAL Unpublished	"Lake Constance"	"Germany"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	FJ694478	TITLE Circumpolar synchrony in big river bacterioplankton JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (50), 21208-21212 (2009) PUBMED 19940248	"depth-integrated freshwater sample"	"Russia: near the mouth of the Ob' River at Salekhard"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AM989111	TITLE High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms JOURNAL ISME J 3 (3), 314-325 (2009) PUBMED 19020559	"river water"	"Finland"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	EU715297	TITLE Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 74 (24), 7740-7749 (2008) PUBMED 18931294	"bacterial community associated with freshwater diatom"	"Germany: Lake Constance"

2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AB475022	TITLE 16S rRNA sequences of bacteria from an iron containing freshwater source called 'Fuschna' located in the Engiadina Bassa Valley, Switzerland JOURNAL Published Only in Database (2009)	"iron containing freshwater source called 'Fuschna'"	"Switzerland: Canton of Grisons, Engiadina Bassa Valley, close to Scuol"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AB452984	TITLE Ecological niche separation in the Polynucleobacter subclusters linked to quality of dissolved organic matter: a demonstration using a high sensitivity cultivation-based approach JOURNAL Environ. Microbiol. 14 (9), 2511-2525 (2012) PUBMED 22759205	"freshwater lake"	"Japan: Fukushima, Lake Hibara"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	FM176071	TITLE Spatial distribution of the bacterial community in a recent tufa core sample formation JOURNAL Unpublished	"rivulet"	"Germany:Hartz Mountain,Westerhoefer Bach"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	EU802072	TITLE It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities JOURNAL Environ. Microbiol. 10 (9), 2200-2210 (2008) PUBMED 18637951	"Chesapeake Bay, MD"	"USA"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	EU546731	TITLE Real-time detection of actively metabolizing microbes via redox sensing as applied to methyloph populations in Lake Washington JOURNAL Unpublished	"Lake Washington sediment"	Washington
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AM949204	TITLE Evaluation of the microbial diversity of a humic lake using molecular and phospholipid analyses JOURNAL Unpublished	"oxygen stratified polyhumic lake water"	"Finland:Mekkojarvi"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	EF203864	TITLE Heterotrophic symbionts of phototrophic consortia: members of a novel diverse cluster of Betaproteobacteria characterized by a tandem rrn operon structure JOURNAL Environ. Microbiol. 9 (11), 2782-2794 (2007) PUBMED 17922762	"water"	"Germany: Lake Dagow"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	DQ521494	TITLE Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 59 (2), 274-288 (2007) PUBMED 17092309	"4.8 m, Lake Vida ice cover, McMurdo Dry Valleys, Antarctica"	"Antarctica: Southern Victoria Land, Victoria Valley"

2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	DQ501307	TITLE Seasonal dynamics and phylogenetic diversity of free-living and particle-associated bacterial communities in four lakes of northeastern Germany JOURNAL Unpublished	"freshwater"	"Germany: Lake Grosse Fuchskuhle (NE compartment)"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	DQ450175	TITLE Bacterioplankton community composition of an Atlantic coastal lagoon (Uruguay) JOURNAL Unpublished	"Atlantic coastal lagoon"	Uruguay
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AY947997	TITLE Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers JOURNAL Limnol. Oceanogr. 50 (6), 1718-1729 (2005)	Parker River	"USA: Massachusetts, Parker River"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AF141457	TITLE Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 65 (7), 3192-3204 (1999) PUBMED 10388721	River estuary	"USA: Columbia River estuary"  /note="free-living"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	DQ017928	TITLE Bacterial community composition in Central European running waters examined by temperature gradient gel electrophoresis and sequence analysis of 16S rRNA genes JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 74 (1), 188-199 (2008) PUBMED 18024682	"upland stream"	a river in central Germany
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AJ867930	TITLE Environmental Fluctuations Significantly Influence the Microbial Community Composition Present in Nival Lakes JOURNAL Unpublished	"lake water"	"Switzerland:Alpine Lake Joeri XIII"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AJ440986	TITLE Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten Antarctic lakes JOURNAL Syst. Appl. Microbiol. 25 (4), 603-610 (2002) PUBMED 12583721	"lake microbial mat"	"Antarctica:McMurdo Dry Valleys, Lake Fryxell"
2	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Rhodoferrax(94)	AJ287642	TITLE Cellular and molecular diversity of mat sample from lake Fryxell, Antarctica JOURNAL Unpublished	Lake Fryxell	"Antarctica:Lake Fryxell"

7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KR188878	TITLE Interaction between microbial community structure and diversity of biofilms and different physical-chemical parameters along Qinhuai River, China JOURNAL Unpublished	"river biofilms"	China
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	LN806939	TITLE Freshwater anaerobic oxidation of methane associated with sulfate reduction in a natural gas source JOURNAL Unpublished	"groundwater"	"Netherlands:Berkhout"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KM851953	TITLE Bacterial composition of biofilms collected from two service areas in a metropolitan drinking water distribution system JOURNAL Unpublished	"drinking water biofilm"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KM031140	TITLE Diurnal floc generation from neuston biofilms in two contrasting freshwater lakes JOURNAL Environ. Sci. Technol. 48 (17), 10107-10115 (2014) PUBMED 25111370	"Coldspring Lake: Surface microlayer"	"Canada: Algonquin Provincial Park, ON"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KF927518	TITLE The responses of the taxa composition of particle-attached bacterial community to the decomposition of Microcystis blooms JOURNAL Sci. Total Environ. 488-489, 236-242 (2014) PUBMED 24836132	"freshwater"	"China: Lake Taihu"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KJ568441	TITLE Rhizosphere bacterial community of <i>Typha angustifolia</i> L. and water quality in a river wetland supplied with reclaimed water JOURNAL Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 (6), 2883-2893 (2015) PUBMED 25412576	"typha rhizosphere of Bai River"	"China: Beijing"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AB853640	TITLE Microbial Community Composition of Environmentally Conserved Estuary in muddy Midorikawa-river and sandy Shirakawa-river JOURNAL Unpublished	??	"Japan:Kumamoto, Midorikawa estuary"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KF956494	TITLE Bioreduction of vanadium (V) in groundwater by autohydrogentrophic bacteria: mechanisms and microorganisms JOURNAL Unpublished	"batch anaerobic bioreduction of vanadate in contaminated groundwater"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KF802876	TITLE Microbial communities in sandy river JOURNAL Unpublished	"sediment"	??

7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JX458402	TITLE Microbial Diversity of Groundwaters and Bottled Natural Mineral Waters JOURNAL Unpublished	"bottled mineral water"	"Portugal"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JX257317	TITLE Microbial community composition and endolith colonization at an Arctic thermal spring are driven by calcite precipitation JOURNAL Environ Microbiol Rep 5 (5), 648-659 (2013) PUBMED 24115614	"periphyton"	an Arctic thermal spring
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KC625230	TITLE Spatial and temporal variation of bacterial and microeukaryotic diversity in a Brazilian freshwater reservoir JOURNAL Unpublished	"freshwater lake, summer season, site 3"	"Brazil"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KC607203	TITLE Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer JOURNAL BMC Microbiol. 13 (1), 146 (2013) PUBMED 23800252	"groundwater"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	KC914430	TITLE Bacterial diversity in culture area of Weishan Lake and the differences from non-culture area JOURNAL Unpublished	"Weishan Lake sediment"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JQ910752	TITLE Role of anthropogenic activity on microbial community structure JOURNAL Unpublished	"river sediment"	"Canada: Quebec"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AB780355	TITLE Analysis of bacterial communities in the sediment of Lake Jusan JOURNAL Unpublished	"sediment of Lake Jusan"	"Japan:Aomori"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JQ968867	TITLE Comprehensive Assessment of Bacterial Communities and Analysis of PCB Congeners in PCB- contaminated Sediment with Depth JOURNAL J Environ Eng (New York) (2012) In press	"Grasse River sediment"	"USA"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JX085920	TITLE Establishment and early succession of bacterial communities in monochloramine-treated drinking water biofilms JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 86 (3), 404-414 (2013) PUBMED 23789638	"drinking water biofilm"	??



7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	HM750122	TITLE Diversity and composition of the bacterial community of Poyang Lake (China) as determined by 16S rRNA gene sequence analysis JOURNAL World J. Microbiol. Biotechnol. 28 (1), 233-244 (2012) PUBMED 22806799	"Poyang Lake"	"China"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JQ923538	TITLE Molecular characterization of natural biofilms from household taps with different materials: PVC, stainless steel, and cast iron in drinking water distribution system JOURNAL Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (18), 8393-8401 (2013) PUBMED 23143469	"drinking water distribution system"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JQ793037	TITLE Comparison of bacteria and archaea community structure in high arctic freshwater sediments JOURNAL Unpublished	"sediment core from an arctic oligotrophic lake (Char Lake)"	"Canada: Cornwallis Island, NU"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JQ815606	TITLE Microbial diversity of anaerobic zones of Tinto River combining culture dependent and non-dependent methods JOURNAL Unpublished	"Tinto River sediment (extreme acid environment)"	"Spain"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	HE672954	TITLE Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization JOURNAL Environ. Microbiol. 15 (6), 1687-1706 (2013) PUBMED 23731249	"alkaline groundwater"	"Portugal:Southeast, Cabeco de Vide"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JN869177	TITLE Spatial and Temporal Variability of Bacterial Communities in the Water of Lake Taihu JOURNAL Unpublished	"lake water"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JN865756	TITLE Metagenomic analysis of the diversity and seasonal changes of bacterial assemblages in an aquatic ecosystem from South Africa JOURNAL Unpublished	"freshwater"	"South Africa: Vaal River, Parys"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JN833492	TITLE Microbial community changes in association with biodegradation of anthracene under nitrate-reducing condition JOURNAL Unpublished	"aquifer"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JN397935	TITLE Microbial communities of spring pits in Jing-Mei River at the southeastern Taipei basin JOURNAL Unpublished	"spring pit"	"Taiwan: Jing-Mei River, Taipei"

7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JN105008	TITLE Diversity and spatial distribution of bacterial communities in sediments of Bosten Lake, NW China JOURNAL Unpublished	"pelagic sediment in center of Lake Bosten"	"China: Lake Bosten, Xingjiang province"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	JF429379	TITLE Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 80 (1), 30-44 (2012) PUBMED 22133045	"primary drinking water supply"	"China: south China, Dongjiang River"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	HQ661280	TITLE Bacterial community composition in four freshwater reservoirs JOURNAL Unpublished	"Shidou freshwater reservoir"	China
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	GU742037	TITLE Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant JOURNAL Microbes Environ. 26 (2), 149-155 (2011) PUBMED 21502735	"drinking water (treatment 1)"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	HM446143	TITLE Microbial communities and chemosynthesis in yellowstone lake sublacustrine hydrothermal vent waters JOURNAL Front Microbiol 2, 130 (2011) PUBMED 21716640	"West Thumb 129"	"USA: Yellowstone National Park"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	GU641793	TITLE Microbial community analysis and identification of alternative host-specific fecal indicators in fecal and river water samples using pyrosequencing JOURNAL J. Microbiol. 49 (4), 585-594 (2011) PUBMED 21887641	"river water"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	GU183585	TITLE Similarities and Differences in Bacterial Community Structures in a Reduced Aquifer with High Aqueous Arsenic and an Oxidized Aquifer lower in Aqueous Arsenic at Titas, Bangladesh JOURNAL Unpublished	"arsenic contaminated 85 m deep aquifer"	"Bangladesh"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	FJ205115	TITLE Characterization of geochemical constituents and bacterial populations associated with As mobilization in deep and shallow tube wells in Bangladesh JOURNAL Water Res. 43 (6), 1720-1730 (2009) PUBMED 19215956	"well water"	"Bangladesh"

7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	FN297293	TITLE Impact of immigrant airborne bacteria in an altitude gradient of sentinels lakes of the Pyrenees JOURNAL Unpublished	"Lake Nera water column"	"Spain:Central Pyrenees"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	FJ517015	TITLE The bacterial diversity from the semiarid 'Tablas de Daimiel National Park' wetland (Central Spain) unravelled JOURNAL Unpublished	"water"	"Spain: Tabla de Daimiel National Park"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AM921457	TITLE Molecular approaches for studying microbial biodiversity in the Southern Ocean JOURNAL Unpublished	"marine surface water"	"Antarctica:Scotia sea, Southern Thule"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	EU803497	TITLE It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities JOURNAL Environ. Microbiol. 10 (9), 2200-2210 (2008) PUBMED 18637951	"Lake Gatun"	"Panama"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	EU546802	TITLE Real-time detection of actively metabolizing microbes via redox sensing as applied to methylotroph populations in Lake Washington JOURNAL Unpublished	"Lake Washington sediment"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AM777987	TITLE Microbial and functional diversity of a subterrestrial high pH groundwater associated to serpentinization JOURNAL Environ. Microbiol. 15 (6), 1687-1706 (2013) PUBMED 23731249	"alkaline groundwater"	"Portugal"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	EF667599	TITLE Identification of novel perchloroethene-respiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing JOURNAL Environ. Microbiol. 10 (1), 31-46 (2008) PUBMED 18211265	"uncultivated river sediment bacterium"	"Germany: River Lahn, Marburg"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	EF575104	TITLE Study of the diversity of marine microorganisms of Coco's Island based on environmental DNA samples JOURNAL Unpublished	"site S25 near Coco's Island"	"Costa Rica"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AM181866	TITLE Identification of acetate- utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA JOURNAL Environ. Microbiol. 9 (1), 223-237 (2007) PUBMED 17227427	"lake profundal sediment"	"Israel:Lake Kinneret"

7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	NR_043921	TITLE Methylibium aquaticum sp. nov., a betaproteobacterium isolated from a eutrophic freshwater pond JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57 (PT 9), 2125-2128 (2007) PUBMED 17766884	"freshwater pond"	??
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	DQ463246	TITLE Effect of benzene-like compounds on the structure of microbial community in Songhuajiang River sediments JOURNAL Unpublished	"Songhuajiang River sediment"	"China"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AY396009	TITLE Diverse Microbial Community Found In Extremely Alkaline (pH 12 to 13) Groundwater JOURNAL Unpublished	"extremely alkaline (pH 12 to 13) groundwater"	"USA"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AY345493	TITLE Microbial Communities in the Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot JOURNAL Unpublished	"Lake Waiiau sediment"	"USA: Hawaii"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AJ876723	TITLE Impact of chromium-contaminated wastewaters on the microbial community of a river JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 54 (1), 35-46 (2005) PUBMED 16329970	"river sediment"	"Portugal:Alcanena"
7	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Betaproteobacteria(100); Burkholderiales(100); Comamonadaceae(100); Ideonella(59)	AY435505	TITLE Bacterial community composition determined by culture-independent and -dependent methods during propane-stimulated bioremediation in trichloroethene-contaminated groundwater JOURNAL Environ. Microbiol. 7 (2), 165-178 (2005) PUBMED 15658984	"propane-sparged ground water from well C4"	"USA: California, Sacramento, McClellan Air Force Base"
3	Bacteria(92); Firmicutes(34); Bacilli(21); Bacillales(9); Thermoactinomycetaceae(4); Hazenella(4)	KC607121	TITLE Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer JOURNAL BMC Microbiol. 13 (1), 146 (2013) PUBMED 23800252	"groundwater"	??
3	Bacteria(92); Firmicutes(34); Bacilli(21); Bacillales(9); Thermoactinomycetaceae(4); Hazenella(4)	GQ994656	TITLE Diversity of planctomycete populations associated with an algal bloom in an eutrophic lake and simulated blooms in algal microcosms JOURNAL Unpublished	"lake water; isolated from algal microcosm"	"USA: LaBonte Lake, Laramie, WY"
14	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhodospirillales(99); Rhodospirillaceae(98); Elstera(94)	GU784485	TITLE Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant JOURNAL Microbes Environ. 26 (2), 149-155 (2011) PUBMED 21502735	"drinking water (treatment 3)"	??

14	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhodospirillales(99); Rhodospirillaceae(98); Elstera(94)	GQ340152	TITLE Variability of Prokaryotic Community Structure in a Drinking Water Reservoir (Marathonas, Greece) JOURNAL Microbes Environ. 27 (1), 1-8 (2012) PUBMED 21971081	"water column"	"Greece: Marathonas Reservoir"
14	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhodospirillales(99); Rhodospirillaceae(98); Elstera(94)	GU642298	TITLE Microbial community analysis and identification of alternative host-specific fecal indicators in fecal and river water samples using pyrosequencing JOURNAL J. Microbiol. 49 (4), 585-594 (2011) PUBMED 21887641	"river water"	
6	Bacteria(100); Proteobacteria(97); Alphaproteobacteria(92); Rhodospirillales(66); Rhodospirillaceae(66); Defluviococcus(47)	NOT	NOT		
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	KU032367	TITLE Biogeochemical gradients above a coal tar DNAPL JOURNAL Sci. Total Environ. (2015) In press PUBMED 26610368	"contaminated groundwater aquifer"	"Austria"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	KF638301	TITLE Uncultured bacterium from water collected in Kyrgyzstan, 16S rRNA gene JOURNAL Unpublished	"water"	"Kyrgyzstan"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	KF515020	TITLE Bacterial communities in drinking water distribution systems JOURNAL Unpublished	"drinking water"	??
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	KC161681	TITLE Phylogenetic and biodiversity characterization of microbial communities associated with PCB-dechlorination in river sediment enrichment microcosms JOURNAL Unpublished	"polychlorinated biphenyl contaminated Grasse River sediment"	??
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	JQ968917	TITLE Comprehensive Assessment of Bacterial Communities and Analysis of PCB Congeners in PCB- contaminated Sediment with Depth JOURNAL J Environ Eng (New York) (2012) In press	"Grasse River sediment"	"USA"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	HM750100	TITLE Diversity and composition of the bacterial community of Poyang Lake (China) as determined by 16S rRNA gene sequence analysis JOURNAL World J. Microbiol. Biotechnol. 28 (1), 233-244 (2012) PUBMED 22806799	"Poyang Lake"	"China"

9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	JN887270	TITLE Microbial community in a full-scale drinking water sand filter JOURNAL Unpublished	"drinking water sand filter"	"China"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	JN865295	TITLE Metagenomic analysis of the diversity and seasonal changes of bacterial assemblages in an aquatic ecosystem from South Africa JOURNAL Unpublished	"freshwater"	"South Africa: Vaal River, Vaal Barrage"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	HQ143770	TITLE Molecular ecology of freshwater microbialite structures in a carbonate-rich lake in British Columbia, Canada JOURNAL Unpublished	"microbialite"	"Canada: Pavilion Lake"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	GU779579	TITLE Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant JOURNAL Microbes Environ. 26 (2), 149-155 (2011) PUBMED 21502735	"drinking water (treatment 3)"	
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	GQ500773	TITLE Molecular Surveys of Eubacteria from Biofilms and Sediments in Mammoth Cave Karst Aquifers JOURNAL Unpublished	"Bio-Sep beads containing 30% limestone, one year in base level cave stream, Roaring River"	"USA: Mammoth Cave, Kentucky"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	GQ500716	TITLE Molecular Surveys of Eubacteria from Biofilms and Sediments in Mammoth Cave Karst Aquifers JOURNAL Unpublished	"Charon's Cascade, sandy clastic sediments"	"USA: Mammoth Cave, Kentucky"
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	FJ801182	TITLE Investigation of Bacterial Community Diversity in Water of Zoige Wetland by PCR-DGGE and 16S rDNA Clone Library JOURNAL Unpublished	"Zoige Alpine Wetland"	??
9	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Rhizobiales(100); A0839(100); unclassified;	EU746713	TITLE Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system JOURNAL Environ Monit Assess 165 (1-4), 27-38 (2010) PUBMED 19404754	"drinking water system"	"Greece: Trikala City"
19	Bacteria(100); Cyanobacteria(100); Chloroplast(100); unclassified; unclassified; unclassified;	JQ910723	TITLE Role of anthropogenic activity on microbial community structure JOURNAL Unpublished	"river sediment"	"Canada: Quebec"

17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JN634216	TITLE Correlating Bioavailability of Raw Water Carbon Fractions with Bacterial Community Composition in North American Freshwater Reservoirs JOURNAL Unpublished	"drinking water reservoir"	"USA"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KP004421	TITLE Thermophilic hydrogen- producing bacteria <i>Caloranaerobacter</i> from deep-sea hydrothermal environments: phylogeny, physiology and diverse [FeFe] hydrogenases JOURNAL Unpublished	"hydrogen-producing enrichment"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KM221295	TITLE Linking microbial community structure to the S, Fe and N biogeochemical cycling in the hot springs at Tengchong geothermal fields, China JOURNAL Unpublished	"hot spring"	
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JX458448	TITLE Microbial Diversity of Groundwaters and Bottled Natural Mineral Waters JOURNAL Unpublished	"deep mineral water aquifer"	"Portugal"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KF514978	TITLE Bacterial communities in drinking water distribution systems JOURNAL Unpublished	"drinking water"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KC607409	TITLE Functional microbial diversity explains groundwater chemistry in a pristine aquifer JOURNAL BMC Microbiol. 13 (1), 146 (2013) PUBMED 23800252	"groundwater"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KC516478	TITLE A 454-pyrosequencing study of bacterial community dynamics within a river system impacted by human activities JOURNAL Unpublished	"freshwater"	"South Africa"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	FR820082	TITLE Bacterial community composition in a long sediment core reflects the history of a sea basin JOURNAL Unpublished	"sediment, subsurface depth 533.5 cm"	"Finland:The Baltic Sea, the Gulf of Finland"

17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KC160785	TITLE Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of king george island, antarctica JOURNAL PLoS ONE 8 (11), E79668 (2013) PUBMED 24223990	"Antarctic sea sediment"	Antarctic
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	KC003107	TITLE Characterization of Spatial Regime Shifts in Marine Microbial Communities under Stress of Human Activities JOURNAL Unpublished	"surface seawater samples from China offshore waters and South China Sea"	China
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JQ678534	TITLE Microbial community structure across fluid gradients in the Juan de Fuca Ridge hydrothermal system JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 83 (2), 324-339 (2013) PUBMED 22928928	"hydrothermal vent diffuse flow from Juan de Fuca Ridge"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JX196324	TITLE Microbial structure and diversity in high arsenic shallow aquifers of Hetao Basin, Inner Mongolia JOURNAL Unpublished	"high arsenic groundwater from Inner Mongolia"	"China"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JX085649	TITLE Establishment and early succession of bacterial communities in monochloramine-treated drinking water biofilms JOURNAL FEMS Microbiol. Ecol. 86 (3), 404-414 (2013) PUBMED 23789638	"drinking water biofilm"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JN198970	TITLE Change in Pipe Biofilm Microbial Community Structure with Conversion from Free Chlorine to Monochloramine Disinfection JOURNAL Unpublished	"drinking water"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	HM066713	TITLE Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer JOURNAL ISME J 7 (2), 325-337 (2013) PUBMED 23151637	"Texas state well #DX 68-23-619A"(calcite e dolomite)	Texas
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	JF460998	TITLE Distribution of bacteria in drinking water distribution system around Knoxville Tennessee JOURNAL Unpublished	"drinking water"	USA



17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	GU940893	TITLE Molecular Diversity study on South China Sea Cruise Samples: revealed the hidden species distribution based on the universal primers methods JOURNAL Unpublished	"South China Sea"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	HQ711902	TITLE Bacterial Community in Drinking Water Distribution System JOURNAL Unpublished	"drinking water"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	GU782242	TITLE Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant JOURNAL Microbes Environ. 26 (2), 149-155 (2011) PUBMED 21502735	"drinking water (treatment 3)"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	HM799072	TITLE Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment JOURNAL Environ Microbiol Rep 3 (4), 449-458 (2011) PUBMED 23761307	"ocean water collected from 6,000m depth within the Puerto Rico Trench"	??
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	FN813444	TITLE Phylogenetic diversity of bacterial communities inhabiting the sediment of Lake Heviz - a comparison of cultivation and cloning JOURNAL Unpublished	"lake sediment"	"Hungary:Lake Heviz"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	AM989012	TITLE High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms JOURNAL ISME J 3 (3), 314-325 (2009) PUBMED 19020559	"lake water"	"Finland"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	AY345391	TITLE Microbial Communities in the Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot JOURNAL Unpublished	"Green Lake water"	"USA: Hawaii"
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacterales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	AY662024	TITLE Impacts on microbial communities and cultivable isolates from groundwater contaminated with high levels of nitric acid-bearing uranium waste at the NABIR-FRC JOURNAL Unpublished	"groundwater contaminated with high levels of nitric acid-bearing uranium waste"	??

17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacteriales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	DQ088751	TITLE Planktonic microbial communities associated with fracture-derived groundwater in a deep gold mine of South Africa JOURNAL Geomicrobiol. J. 23 (6), 475-497 (2006) REFERENCE 2 (bases 1 to 1446)	"0.7 to 1.4 kmbls section of the continental crust"	South Africa
17	Bacteria(100); Proteobacteria(100); Alphaproteobacteria(100); Caulobacteriales(100); Caulobacteraceae(100); Caulobacter(100)	M83799	TITLE The phylogeny of marine and freshwater caulobacters reflects their habitat JOURNAL J. Bacteriol. 174 (7), 2193-2198 (1992) PUBMED 1551840	"Caulobacter vibrioides"	
4	Bacteria(100); Chlorobi(100); Chlorobia(100); Chlorobiales(100); Chlorobiaceae(100); Chlorobium(100)	HE616516	TITLE Bacterial and phytoplankton responses to nutrient amendments in a boreal lake at different taxonomic resolutions JOURNAL Unpublished	"lake"	??
4	Bacteria(100); Chlorobi(100); Chlorobia(100); Chlorobiales(100); Chlorobiaceae(100); Chlorobium(100)	AM949390	TITLE Evaluation of the microbial diversity of a humic lake using molecular and phospholipid analyses JOURNAL Unpublished	"oxygen stratified polyhumic lake water" /db_xref="taxon:77133"	"Finland:Mekkojarvi"