



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DO AMBIENTE
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA
EM AMBIENTE AQUÁTICO COM DESPEJO CONTINUO
DE EFLUENTES DE HIDROCARBONETOS

Manaus-AM
Fevereiro de 2014

MARELIS MARGARITA RUIZ

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA
EM AMBIENTE AQUÁTICO COM DESPEJO CONTINUO
DE EFLUENTES DE HIDROCARBONETOS

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Odair Pereira

Manaus-AM
Fevereiro de 2014



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DO AMBIENTE
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

MARELIS MARGARITA RUIZ

ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA
EM AMBIENTE AQUÁTICO COM DESPEJO
CONTINUO DE EFLUENTES DE HIDROCARBONETOS

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia – Área de concentração: Agroflorestal.

Membros da Banca Examinadora:
Dr. Spartaco Astolfi Filho – (UFAM)
Dr. Daniel Saito – (CBA)
Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio - (CBA)

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Ruiz, Marelis Margarita

R934a Análise da biodiversidade microbiana em ambiente aquático com despejo contínuo de efluentes de hidrocarbonetos / Marelis Margarita Ruiz. - Manaus, 2014.

115f. il. color.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

1. Efluentes industriais 2. Biodiversidade - Conservação 3. Resíduos industriais 4. Petróleo I. Pereira, José Odair (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 2007 577.15(811.3) (043.2)

*A Deus em primeiro lugar porque,
"Tudo posso naquele que me fortalece..." Fil. 4.13.
"...Para Deus tudo é possível". Mateus 19:26.
"Sé forte e corajoso; não temas, nem te
espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo
por onde quer que andares".
Josué 1:9.*

*A minha mãe Margarita e meus irmãos.
A meu esposo Efrain Antônio, a meus filhos
Efrain David, Alejandro Elías e ao caçula
Samuel Josué. Por seu apoio, amor e compreensão.*

*Com amor,
Dedico esta grande conquista.*

Agradecimentos

À minha família pelo amor, compreensão, apoio e incentivo para alcançar as metas planejadas. Especialmente a Efrain Antonio, o esposo maravilhoso que Deus me deu, quem sempre é a força, ânimo e grande ajuda para conseguir superar os obstáculos. A meus filhos Efrain David e Alejandro Elias por me ajudar na elaboração do trabalho, assim como também à minha querida sobrinha Noa Garrillo, que durante sua curta visita ao Amazonas, também contribuiu para a realização do trabalho.

A meus Pastores, Francisco Carlos Brito e Blanca Sánchez, assim como a todos os irmãos da igreja, pelas palavras de conforto e as orações por mim pela minha família. Especialmente ao Pastor Aaron Epps pela disposição e apoio na tradução de inglês e ao irmão Paulo Ariel Soares Leão Júnior por me acompanhar na defesa da tese e também pelo apoio na revisão do trabalho.

A minha querida irmã Joana Helena Alexandrino por suas orações, palavras de conforto, carinho e todo o apoio para a logística na defesa da tese.

À Bióloga Climéia Corrêa Soares, pesquisadora do INPA, pelo carinho e acompanhamento na defesa da tese.

À "Universidad del Zulia", especialmente no Vice-Reitorado Acadêmico à Vice-Reitora Dra. Judith Aular e à Mg. Maillara Arrieta; e no Vice-Reitorado Administrativo à Vice-Reitora Dra. Guadalupe Nuñez e à Lic. Marisela Moncada, por toda a compreensão e apoio para os diversos trâmites ante o Conselho Universitário. Ao Decano Mg. Mario Herrera, ao Diretor da Escola de Engenharia Industrial Mg. Jesus Puig e a todo o pessoal do Departamento de Produção, especialmente meus queridos colegas que sempre compreenderam minha situação e sempre apoiaram-me durante todos estes anos de estudo.

À Universidade Federal do Amazonas, por me acolher e dar a oportunidade de ingressar ao interessante mundo da Biotecnologia. Especificamente aos docentes, ao coordenador prof. Edmar Vaz de Andrade e à querida secretária do PPGBIOTEC, Nubianne Freitas, que sempre me apoiaram e estiveram à disposição para me ajudar.

Aos professores José Odair Pereira e Spartaco Astolfi Filho, pelos ensinamentos e sugestões para o desenvolvimento do projeto, e sobretudo pela confiança em mim depositada, pelo carinho, compreensão e paciência comigo.

Aos professores Daniel Saito e Rudy Procopio, por sua atenção, disposição para ajudar, e sobretudo, pela compreensão da minha situação.

À doutora Ieda Hortêncio Batista (UEA) por sua receptividade, carinho e muita paciência na orientação e conselhos durante todos estes anos de trabalho.

Aos professores Carlos Edward Freitas (Engenharia de Pesca da UFAM), Carina Coelho Lyra e James Dean Oliveira dos Santos Júnior (Departamento de Estatística da UFAM), pela receptividade, compreensão e disposição do seu tempo para me ajudar na parte estatística.

À doutora Patrícia Orlandi da Fiocruz, por me orientar no aprendizado sobre Microbiologia. Mas especialmente a Diogo Castro e Paula Taquita Serra, que além de me ensinar com muita

paciência o referente a microbiologia, me apoiaram com muito entusiasmo e carinho na coleta e processamento de amostras.

Aos meus prezados colegas de doutorado, Elen Carvalho, Rogério Neves, Ferdyanne Saboia e Lorena Nacif, pela paciência, orientação, o grande apoio para o desenvolvimento do trabalho e sobretudo pelo carinho demonstrado.

À técnica de Laboratório de DNA, Mg. Enedina Assunção (Prezada Dina) pelo grande apoio, paciência e compreensão comigo, durante as diversas experimentações realizadas.

A minhas lindas e queridas colegas de laboratório, Mg. Mirna Miyamoto e Mg. Anita Souza, que com muita paciência e carinho me ajudaram nas experimentações.

À empresa Petrobrás, especialmente ao Eng. Bruno Ladeira - Gerente Segurança, Meio Ambiente e Saúde SMS, à Eng. Ruth Martins Supervisora de Ambiente, ao Supervisor da OPM Eng. Paulo Alexandrino, por toda a compreensão e apoio incondicional, graças aos quais foi possível a realização este trabalho.

Ao pessoal SMS da Província Petrolífera de Urucu, os supervisores José Nazareno, Leonardo Ramos, Frederico Miguel Reffert, e ao animado e receptivo grupo de campo Sr. José Roberto Ribero da Silva, Francisco Helio Ferreira Santiago, Vanderley Alves de Lima e José Sidomar, por toda a disposição e apoio nas inúmeras visitas realizada ao campo para coletar amostras. Especialmente, agradeço ao Sup. Leonardo que foi quem me levou ao igarapé natural (Paraíso perdido), o qual apresentou uma grande riqueza e diversidade de microrganismos.

Ao Instituto de pesquisas petrolíferas da "Universidad del Zulia" INPELUZ pelo apoio para realizar a cromatografia, especialmente ao Sr. Magno Guzmán da empresa SISCHROM, quem fez um grande esforço para a execução das análises.

Ao Consultor científico da empresa GenOne (Rio de Janeiro-RJ), Dr. Daniel Carvalho por todo seu apoio, compreensão e paciência na interpretação dos dados gerados no pirosequenciamento e no programa Mothur, especialmente na elaboração das árvores filogenéticas.

À prezada Lic. Jussinara Araujo pela compreensão e apoio para a revisão de português de todo o trabalho no tempo que eu precisava.

À minha querida amiga Mg. Michelle Pedroza pela amizade de tantos anos e especialmente pela compreensão e grande apoio dado para encapar e entregar a tese.

A todas as pessoas que de algum modo ou outro, contribuíram para conseguir acabar o trabalho na data requerida.

A todos... Muito Obrigada, sempre estarei agradecida.

Que Deus abençoe grandemente suas vidas.

RESUMO

Na região Amazônica, a Província Petrolífera de Urucu (Petrobras) realiza o despejo de efluentes de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos ao redor, desde o início de suas operações. O objetivo deste trabalho foi analisar a biodiversidade bacteriana presente no dique de efluentes e no igarapé antes e depois do despejo de efluentes. Foi realizado um estudo em duas etapas, aplicando técnicas moleculares independentes de cultivo. O DNA genômico total das amostras de sedimento e água foi extraído e usado como molde em uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos do gene 16S rRNA para o domínio Bactéria. O produto de PCR foi amplificado e pirosequenciado, e as sequências geradas foram analisadas pelo programa livre Mothur. As medidas dos parâmetros físico-químicos e cromatográficos estão dentro dos valores estabelecidos para os tipos de corpos de água analisados. Na primeira etapa do estudo, os perfis taxonômicos das amostras mostraram que o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante com a classe *Deltaproteobacteria* e gênero conhecido o *Candidatus Solibacter*. Assim mesmo, na segunda etapa do estudo, o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante; porém, com a classe *Alphaproteobacteria* e o gênero *Geobacter* como predominante. Ambos gêneros são catalogados como biorremediadores de ambientes contaminados, assim como 14% dos gêneros totais. Uma grande parte de microrganismos foram considerados “Não Classificados” (até 30%). Na primeira etapa do estudo a riqueza e diversidade de espécies no Igarapé da Onça, é maior depois do despejo de efluentes de hidrocarboneto, e na segunda etapa do estudo a riqueza e diversidade de espécies no igarapé natural (sem nome na região), é maior com relação a este mesmo igarapé depois da mistura com efluentes. Não existe diferença estatística significativa entre a comunidade do igarapé natural e entre este igarapé misturado com efluentes; e não existe diferença na estrutura genética entre as amostras de cada comunidade analisada, indicando que a descarga de efluentes neste corpo de água não tem impacto significativo na biodiversidade microbiana deste ambiente aquático. Este trabalho, pioneiro em análise taxonômica de amostras de um dique de efluentes e os igarapés com despejo de efluentes na área petrolífera de Urucu, representa uma oportunidade para a compreensão da relação entre a composição, abundância e diversidade dos microrganismos neste ambiente, e uma fonte rica para descoberta de novos grupos taxonômicos, assim como um enorme potencial para exploração biotecnológica desta diversidade.

Palavras chave: Amazônia, Atividade Petrolífera, Índices de Riqueza, Diversidade Pirosequenciamento, gene 16S rRNA.

ABSTRACT

In the Amazon region, the Urucu Oil Province (Petrobras) has been disposing of hydrocarbon effluents into the surrounding aquatic environments since the beginning of its operations. The goal of this work was to analyze the bacterial biodiversity present in the dike of the effluents and in the stream before and after the disposal of hydrocarbon effluents. A study was conducted in two stages were carried out with the use of culture independent molecular techniques. The full genomic DNA of the sediment and water samples were extracted and used as templates in a PCR reaction with the use of specific oligonucleotides of the 16S rRNA gene bacteria domain. The PCR product was amplified and pyrosequenced, and the generated sequences were analyzed by the free software Mothur. The measurements of the physical-chemical and chromatographical parameters are within the measures established for these types of analyzed water bodies. In the first stage of the study, the taxonomic profiles of the samples have shown that the *Proteobacteria* phylum proved to be the most abundant together with the *Deltaproteobacteria* class and the gen known as *Candidatus Solibacter*. Similarly, in the second stage of the study, the *Proteobacteria* phylum proved to be the most abundant together with the *Alphaproteobacteria* class and the *Geobacter* gen predominant. Both genes are catalogued as bioremediators in contaminated environments, as well as 14% of the total genes. A large proportion of microorganisms were considered “Unclassified” (up to 30%). In first stage of the study the richness and the diversity of species in the Onça stream is greater following the disposal of hydrocarbon effluents, in second stage of the study the abundance and diversity of species in the natural stream (without a name in the region), is greater as compared to the same stream after the mixing of effluents. There is no significant statistical difference between the sample of the community in the natural stream and this effluent-mixed stream; and there is no difference in genetic structure among samples of each community analyzed, suggesting that the discharge of effluents in this body of water has no significant impact on the microbial biodiversity in this aquatic environment. This work, a pioneer in the taxonomic analysis of samples in dikes of effluents and streams with the disposal of effluents in the Urucu oil area, represents a challenge for understanding the relationship between the composition, abundance and diversity of microorganisms in this environment, and a rich source for the discovery of new taxonomic groups, as well as the huge potential for biotechnological exploration of such diversity.

Keywords: Amazon Region, Oil Activities, Wealth Index, Diversity, Pyrosequencing, 16S rRNA gene.

Lista de figuras

Figura 1.	Vista do Rio Urucu	18
Figura 2.	Região Hidrográfica Amazônica	19
Figura 3.	Província Petrolífera de Urucu Base Geólogo Pedro Moura	29
Figura 4.	Intersecção do despejo de efluentes com igarapé da onça.....	30
Figura 5.	Igarapé depois do despejo de efluentes	30
Figura 6.	Dique de efluentes da Província	30
Figura 7.	Coleta de sedimento no igarapé com tubo vertical	30
Figura 8.	Coleta de água no dique de efluentes com garrafa de Van Dorn	31
Figura 9.	Igarapé Natural (Sem nome)	31
Figura 10.	Visualização geográfica de comunidades amostradas	32
Figura 11.	Corrida cromatográfica para as três comunidades	41
Figura 12.	Resultado da corrida cromatográfica comunidade 1 aplicando técnica de purga e trapeamento	42
Figura 13.	Proporção de Filos primeira etapa do estudo	44
Figura 14.	Proporção de Filos predominantes na segunda etapa do estudo	45
Figura 15.	Proporção de classes primeira etapa do estudo	45
Figura 16.	Classes predominantes na segunda etapa do estudo	46
Figura 17.	Proporção de Gêneros predominantes na primeira etapa do estudo	47
Figura 18.	Proporção de gêneros predominantes na segunda etapa do estudo (Exceto os "Não Classificados")	48
Figura 19.	Proporção de gêneros "Não Classificados" na segunda etapa do estudo.....	49
Figura 20.	Árvore filogenética Comunidade 1 da segunda etapa do estudo	51
Figura 21.	Árvore filogenética Comunidade 2 da segunda etapa do estudo	52
Figura 22.	Árvore filogenética Comunidade 3 da segunda etapa do estudo	53
Figura 23.	Diagrama de Venn primeira etapa do estudo (97% similaridade)	59
Figura 24.	Diagrama de Venn comunidade 1 (Dique de Efluentes) segunda etapa do estudo	59

Figura 25.	Diagrama de Venn comunidade 2 (Igarapé Natural) segunda etapa do estudo .	60
Figura 26.	Diagrama de Venn comunidade 3 (Igarapé com efluentes) segunda etapa do estudo	61
Figura 27.	Diagrama de Venn global das três comunidades da segunda etapa do estudo	61
Figura 28.	Diagrama de Venn grupos de gêneros "Não Classificadas" na segunda etapa do estudo	62
Figura 29.	Curvas de Rarefação para a primeira etapa do estudo (97% Similaridade)..	63
Figura 30.	Curvas de rarefação para dois níveis de similaridade das três comunidades da segunda etapa do estudo	63
Figura 31.	Índices de riqueza Chao e Ace para segunda etapa do estudo	65
Figura 32.	Índice de Diversidade de Shannon segunda etapa do estudo	66
Figura 33.	Índice de Diversidade de Simpson segunda etapa do estudo	66

Lista de tabelas

Tabela 1.	Localização de pontos de coleta da primeira etapa do estudo	32
Tabela 2.	Localização de pontos de coleta da segunda etapa do estudo	33
Tabela 3.	Resultados parâmetros da primeira etapa do estudo	40
Tabela 4.	Resultados parâmetros da segunda etapa do estudo	40
Tabela 5.	Sequências geradas na primeira etapa do estudo	42
Tabela 6.	Sequências geradas na segunda etapa do estudo	43
Tabela 7.	Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Primeira etapa do estudo)	55
Tabela 8.	Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Segunda etapa do estudo)	55
Tabela 9.	Distribuição de OTU's primeira etapa do estudo	57
Tabela 10.	Distribuição de OTU's segunda etapa do estudo	58
Tabela 11.	Índices de Riqueza e Diversidade primeira etapa do estudo (97% Similaridade)	64
Tabela 12.	Índices de Riqueza e Diversidade segunda etapa do estudo (97% Similaridade)	65
Tabela 13.	Resultado Análise AMOVA (Programa Mothur)	67
Tabela 14.	Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 1 (Programa Mothur)	68
Tabela 15.	Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 2 (Programa Mothur)	69
Tabela 16.	Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 2 (Programa Mothur)	69

Lista de Apêndices

Apêndice 1. Filos identificados na primeira etapa do estudo	90
Apêndice 2. Filos identificados na segunda etapa do estudo.....	91
Apêndice 3. Classes identificados na primeira etapa do estudo	92
Apêndice 4. Classes identificadas na segunda etapa do estudo.....	94
Apêndice 5. Gêneros identificados na primeira etapa do estudo	96
Apêndice 6. Gêneros identificados na segunda etapa de estudo.....	100
Apêndice 7. Descrição de codificação das árvores filogenéticas	108

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1. BIODIVERSIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS AMAZÔNICOS ...	18
1.2. ATIVIDADE PETROLÍFERA NO AMAZONAS	20
1.3. DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES DE HIDROCARBONETOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS	22
1.4. PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDOS NA BIORREMEDIAÇÃO	23
1.5. TÉCNICAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA E BIOINFORMÁTICA.	25
1.6. ESTIMATIVA DE RIQUEZA E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. GERAL	28
2.2. ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. ÁREA DE ESTUDO	28
3.2. COLETA DE AMOSTRAS	29
3.3. MEDIÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CROMATOGRAFIA	33
3.4. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	34
3.5. ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA E ESTATÍSTICA	37
3.5.1. Bioinformática	37
3.5.2. Estatística	38
4. RESULTADOS E ANÁLISE DE DADOS	39
4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	39
4.2. CROMATOGRAFIA	41
4.3. COMUNIDADES BACTERIANAS E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	42
4.3.1. Números de sequências	42
4.3.2. Filos	44
4.3.3. Classes	45
4.3.4. Gêneros	47
4.3.5. Árvore Filogenética	50
4.3.6. Microrganismos Biorremediadores	54
4.4. RIQUEZA E DIVERSIDADE. ESTATÍSTICA	57
4.4.1. Distribuição de OTU's entre as amostras	57
4.4.2. Diagramas de Venn	58
4.4.3. Curvas de rarefação	62
4.4.4. Índices de riqueza e diversidade	64
4.4.5. Estatística	67
5. DISCUSSÃO	70
5.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CROMATOGRÁFICOS	70

5.2.	FILOGENÉTICA	71
5.3.	ÍNDICES DE RIQUEZA E DIVERSIDADE. ESTATÍSTICA	71
	CONCLUSÕES	79
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	APÊNDICES	89

INTRODUÇÃO

Uma grande parte da biodiversidade dos ecossistemas amazônicos está representada por fungos e bactérias. Nas amostras ambientais, a estrutura das comunidades microbianas é altamente complexa e diversa (TORSVIK, et al., 1990); e esta complexidade apresenta um desafio para a biotecnologia. Estimativas indicam que aproximadamente 99% dos microrganismos presentes em muitos ambientes naturais não são cultiváveis utilizando técnicas tradicionais de cultivo (STALEY E KONOPKA, 1985; AMMAN et al., 1995), ficando uma grande parte da diversidade microbiana de ambientes naturais desconhecida, devido às dificuldades de enriquecimento e isolamento desses microrganismos (HANDELSMAN, 2004).

Um dos aspectos da biodiversidade, ainda carente de pesquisas, que evidenciem sua imensa potencialidade é a prospecção de microrganismos com capacidade de atuar em processos de interesse nos variados setores da atividade humana. Entre os microrganismos existentes, poucos estão relacionados a doenças; em sua grande maioria, os microrganismos desempenham algum benefício, direto ou indireto, nos mais diferentes aspectos de interesse ambiental e/ou biotecnológico (BATISTA, 2009).

Na região amazônica, a Província Petrolífera de Urucu constitui o único Ativo de Produção de petróleo e gás da empresa Petrobras que pertence à Unidade de Exploração e Produção da Amazônia (UN-AM). Esta base operacional possui uma infra-estrutura conformada por diversas instalações industriais, aeroporto, portos, estradas, alojamentos, refeitórios, escola, áreas de lazer, esporte e telecomunicações (PETROBRÁS, 2008). A água requerida para o processo industrial, assim como para o consumo humano, é extraída de aquíferos subterrâneos locais, através de poços artesianos (LEYEN, 2008). Desde o início de suas operações no ano 1988, os efluentes industriais da Província petrolífera de Urucu, são despejados em sistemas aquáticos ao redor da área operacional, desde o dique contenedor de efluentes.

A biodegradação de compostos orgânicos representa o mais importante mecanismo de eliminação de petróleo e de hidrocarbonetos poluentes do ambiente (LEAHY; COLWELL, 1990). Devido à diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica e sua capacidade de adaptação aos mais variados ambientes e as mais variadas condições do meio os microrganismos constituem os organismos mais eficientes para degradação (KATAOKA, 2001).

Os microrganismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos. Comunidades desses microrganismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando os hidrocarbonetos estão presentes, essas comunidades aumentam em 10% da comunidade (ATLAS, 1995). Segundo Handelsman (2004), a caracterização da microbiota pela abordagem Metagenômica é possível, com o acesso a um conjunto de genomas de microrganismos, como um todo.

Diante do exposto, este trabalho apresenta uma análise da biodiversidade bacteriana presente no dique de efluentes e em igarapé antes e depois do despejo de efluentes de hidrocarbonetos, na área operacional da Província Petrolífera de Urucu. Realizou-se o estudo em duas etapas, aplicando técnicas moleculares independentes de cultivo. O DNA genômico total das amostras de sedimento e água foi extraído e usado como molde em uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos do gene rRNA 16S para o domínio Bactéria. O produto de PCR foi amplificado e pirosequenciado (Roche 454) e as sequências geradas foram analisadas pelo programa livre Mothur.

Identificou-se na análise filogenética, os microrganismos mais predominantes, com a respectiva classificação de filo, classe e gênero. Além disso, obteve-se a estimativa de riqueza, mediante índices de Chao e Ace, assim como a estimativa da diversidade, mediante os diagramas de Venn, e os índices de Shannon e Simpson. Estatisticamente, na segunda etapa do estudo confirmou-se que não existe uma diferença significativa entre o igarapé natural e este igarapé misturado com efluentes, também revelou-se que as amostras das três comunidades analisadas, possuem a mesma estrutura genética na comunidade bacteriana.

Este trabalho pioneiro no estudo de ambientes aquáticos ao redor da Província Petrolífera de Urucu com despejo de efluentes de hidrocarbonetos, representa um grande desafio para a para exploração biotecnológica e compreensão da relação entre a composição, abundância e diversidade dos microrganismos em este meio ambiente.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 BIODIVERSIDADE EM AMBIENTES AQUÁTICOS AMAZÔNICOS

A Bacia Amazônica, com seus sete milhões de quilômetros quadrados, detém uma das maiores biodiversidades do planeta e a sua fauna é considerada uma das maiores reservas de biomassa viva do mundo (PETROBRÁS, 2008). É bem conhecido que aproximadamente só 1% dos microrganismos na natureza é cultivável pelo uso de técnicas convencionais (STALEY E KONOPKA, 1985; AMMAN *et al.*, 1995), ficando uma grande parte da diversidade microbiana de ambientes naturais desconhecida, devido às dificuldades de enriquecimento e isolamento desses microrganismos (HANDELSMAN, 2004).

A bacia do Rio Urucu pertence à Região Hidrográfica Amazônica, que detém 74% dos recursos hídricos superficiais do país. Esta rede hidrográfica é formada por uma infinidade de rios, igarapés, córregos e nascentes, e apresenta um ciclo sazonal de distribuição da precipitação bem característico, alternando uma estação seca de junho a novembro com uma estação chuvosa de dezembro a maio (PETROBRÁS, 2008). Na figura 1 pode visualizar-se toda a região hidrográfica Amazônica.

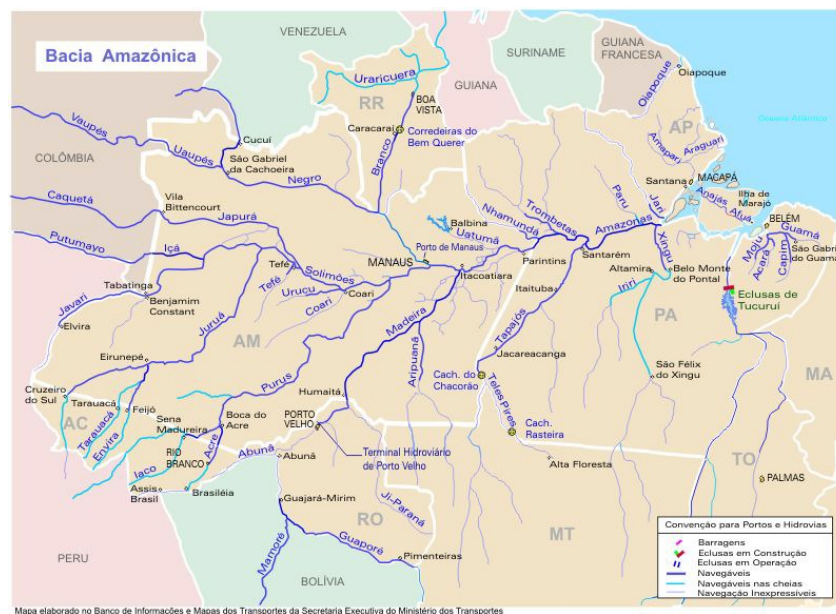


Figura 1. Região Hidrográfica Amazônica

FONTE: Caderno da Região Hidrográfica Amazônica, 2006 (SOUSA, 2008).

O Rio Urucu é um pequeno rio cujo percurso final de seu leito forma um lago de rias que se comunica com o lago de rias Coari, o qual desemboca na margem direita do rio Solimões. A nascente do rio Urucu localiza-se no divisor de água do sistema

Tefé/Urucu/Coari/Juruá com percurso de 430 km em direção sudoeste/nordeste, até o encontro com o lago de ria Coari (SOUSA, 2008) (Figura 2).



Figura 2. Vista do Rio Urucu

Fonte: Sousa (2008) (Arquivo pessoal de Dr. Assad José Darwich)

Desde os anos 50, os rios da Amazônia têm sido objetos de muitas investigações químicas e geoquímicas, através de estudos de cientistas como Sioli (1950), Stallard e Edmond (1983), Kückler *et al.* (2000), entre outros. De acordo com Sioli (1957), Fittkau (1964) e Katzer (1903) a pureza química e a pobreza de quase todas as águas Amazônicas podem ser comparadas com “água destilada um pouco contaminada” (SOUSA, 2008). Águas negras e claras possuem baixo conteúdo de íons e de bicarbonatos, mas são caracterizadas pelas altas percentagens de metais alcalinos, principalmente sódio e potássio, e altas percentagens de outros metais, tais como Fe, Mg, Cu, Zn e Al (SIOLI, 1968; GIBBS, 1972).

Muitos fatores ecológicos são responsáveis pela composição de comunidades bacterianas em ambientes aquáticos de água doce. Entre os fatores considerados importantes encontram-se: pH, temperatura da água, concentração de matéria orgânica e intensidade de radiação ultravioleta (HADER *et al.*, 1998). Fong *et al.* (1993) concluíram que além da temperatura e pH, os parâmetros de salinidade, concentração de material orgânico e a disponibilidade de elementos traços, determinam a estrutura de uma comunidade bacteriana aquática.

Dentre alguns dos trabalhos que analisam rios, igarapés e lagoas no estado do Amazonas, encontra-se a análise das características físico-químicas das águas dos rios Solimões, Purus e seus afluentes, cujo resultado demonstra que as águas dos rios e igarapés da região central da Amazônia são quimicamente distintas entre si; as águas brancas do Solimões são cálcicas-bicarbonatadas e as do Purus bicarbonatadas, os respectivos afluentes são sódico-potássico-bicarbonatados e sódico-potássico-sulfatados. Isso acarreta águas brancas

fracamente ácidas a neutras e mais condutivas, enquanto as pretas são menos mineralizadas, mais ácidas, especialmente as do rio Purus (QUEIROZ et al, 2009).

Também foi estudada a variação sazonal e espacial de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido nos rios Urucu, Solimões e Negro; além de medição de metais pesados na camada sub-superficial dos mesmos, durante ciclos hidrológicos de enchente, cheia, vazante e seca. Os dados obtidos devem ser vistos como os de um ecossistema equatorial praticamente inalterado, podendo tornarem-se parte de um banco básico de dados para comparações posteriores (SOUSA, 2008).

Com relação à biodiversidade em ambientes aquáticos Amazônicos, têm sido desenvolvidos diversos trabalhos para analisar as comunidades bacterianas nestes ambientes. Dentre os estudos realizados recentemente, encontram-se o autor Peixoto (2011), que realizou uma análise comparativa das comunidades microbianas que compõem os rios Solimões e Negro, demonstrando que o rio Solimões apresenta maior riqueza e diversidade microbiana que o rio Negro, segundo os diferentes índices calculados. Os rios apresentaram bactérias pertencentes às classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* (presente somente no Solimões), e *Actinobacteria*, e especificamente o rio Negro apresentou uma enorme abundância de bactérias pertencentes ao gênero *Polynucleobacter*.

Por outra parte, Toyama (2012) realizou recentemente uma análise da diversidade microbiana em rios e lagos da região Amazônica, identificando que, mais de 50% da comunidade total, era representada pelo filo *Proteobacteria*, sendo a classe *Betaproteobacteria* a mais predominante representada pelo gênero *Polinucleobacter*. Assim mesmo, Neves (2013) realizou a caracterização da microbiota do rio Negro em relação a um ciclo sazonal (Abordagem Metagenômica), determinando a presença do gênero *Polynucleobacter* no período da vazante e o gênero *Gp3* dominante no período da cheia.

1.2 ATIVIDADE PETROLÍFERA NO AMAZONAS

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (alifáticos ou aromáticos) e, em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos, alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel (CRAPEZ et al. 2002; VAN HAMME et al. 2003). Os hidrocarbonetos são compostos que se constituem exclusivamente de carbono e hidrogênio. Por não exibirem grupos funcionais são extremadamente apolares e exibem baixa reatividade química à temperatura ambiente (WIDDEL e RABUS, 2001).

Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser divididos em quatro classes: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas) (LEAHY e COLWELL, 1990). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são contaminantes ambientais ubíquos, de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica (WIDDEL e RABUS, 2001; FOGHT 2008; SEO *et al.* 2009). Sendo estes:

- Petrogênica: compostos introduzidos por derrames acidentais de petróleo ou derivados, operações de carga/descarga e de limpeza dos tanques dos petroleiros, extração, transporte e refino de óleo, infiltrações naturais através de fendas nos fundos oceânicos e escape de reservatórios naturais;
- Pirogênica: compostos originados pela combustão incompleta da matéria orgânica, podendo ter origem natural, devido aos incêndios acidentais de florestas e erupções vulcânicas; ou antrópica, devido à combustão incompleta de óleo ou combustíveis fósseis, incineração de resíduos, emissões dos veículos e queima de florestas (MCVEETY e HITES, 1988);
- Biogênica: compostos sintetizados por organismos como bactérias, plantas e fungos, em ação na degradação da matéria orgânica natural (LAW, BISCAYA, 1994).

Na região amazônica, a Província Petrolífera de Urucu constitui o único Ativo de Produção de petróleo e gás da empresa Petrobrás que pertence à Unidade de Exploração e Produção da Amazônia (UN-AM). Esta província situa-se numa área isolada, a 680km a sudoeste de Manaus, no município de Coari (AM), e compreende mais de 60 poços produtores. A produção média de petróleo em Urucu é de 56,5 mil barris por dia, enquanto a de gás natural é de 9,7 milhões de metros cúbicos por dia. O petróleo de Urucu é de alta qualidade, resultando em seu aproveitamento especialmente para a produção de gasolina, nafta petroquímica, óleo diesel e GLP (gás de cozinha). A base operacional de Urucu possui uma infraestrutura formada por instalações industriais, aeroporto, portos, estradas, alojamentos, refeitórios, escola, áreas de lazer, esporte e telecomunicações (PETROBRÁS, 2008). A água requerida para o processo industrial, assim como para o consumo humano, é extraída de aquíferos subterrâneos locais, através de poços artesianos (LEYEN, 2008).

1.3 DEGRADAÇÃO DE EFLUENTES DE HIDROCARBONETOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

De acordo com a Norma Brasileira - NBR 9800/87, denomina-se efluente industrial todo e qualquer despejo líquido proveniente do estabelecimento industrial, compreendendo emanções do processo industrial, as águas de refrigeração poluídas, as águas pluviais poluídas e o esgotamento doméstico. Os efluentes da indústria petroquímica apresentam os mesmos constituintes tóxicos e de difícil degradação (recalcitrantes) que o petróleo e seus derivados. São caracterizados pela presença de altas concentrações de compostos orgânicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos alifáticos, compostos organoclorados, surfactantes, metais tóxicos. Apresentam alta variação da demanda química de oxigênio (DQO), da alcalinidade, do potencial hidrogeniônico (pH) (HARTMANN, 2004).

Os compostos também estão presentes em diferentes formas no compartimento do ecossistema aquático. Por exemplo, na água os hidrocarbonetos podem estar presentes na forma dissolvida (associados à matéria orgânica dissolvida) ou adsorvidos às partículas ou colóides em suspensão. No sedimento, podem estar adsorvidos sobre partículas ou dissolvidos na água intersticial. Na atmosfera, podem estar na forma gasosa e/ou adsorvido sobre o material particulado atmosférico. As características do ambiente e o tempo de contato entre os compostos e os compartimentos (sedimento, por exemplo) também influenciam na distribuição individual dos hidrocarbonetos no meio ambiente (MENICONI, 2007).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA'office) define o termo atenuação natural como “o processo que envolve a biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização e/ou estabilização química e bioquímica do contaminante para reduzir efetivamente sua toxicidade, mobilidade ou volume a níveis que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema” (KAO, WANG, 2000; NYER *et al*, 1998). Esta definição engloba tanto os processos bióticos quanto os abióticos para reduzir os níveis do contaminante. No entanto, a biodegradação é o mecanismo primário para atenuar os contaminantes que são biodegradáveis. De acordo com Nyer et al. (1998), o termo Biorremediação se refere, portanto, a todas as reações bioquímicas da atenuação natural.

A biodegradação de compostos orgânicos representa o mais importante mecanismo de eliminação de petróleo e de hidrocarbonetos poluentes do ambiente (LEAHY; COLWELL, 1990). Segundo Kataoka (2001), devido à diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica e sua capacidade de adaptação aos mais variados ambientes e as mais variadas condições do meio, os microorganismos constituem os organismos mais eficientes para degradação. A biodegradação do petróleo envolve todos os fenômenos de quebra de seus

componentes para componentes de menor peso molecular ou mais polares. A degradação completa do petróleo por comunidades naturais de microorganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente e resulta como membros finais o dióxido de carbono e a água (BAIRD, 2002).

Com relação à contaminação nos rios Amazônicos por despejo de efluentes de hidrocarbonetos de petróleo, entre os estudos desenvolvidos se encontra a análise das fontes e de níveis de hidrocarbonetos em sedimento, no rio Solimões e em oito lagos entre os municípios de Coari e Manaus, assim como, no igarapé do Quarenta na região do Pólo Industrial de Manaus (OLIVEIRA, 2007). Os resultados deste trabalho no trecho Coari-Manaus, determinaram concentrações muito baixas, para a distribuição de hidrocarbonetos individuais, porém foi observado presença de hidrocarbonetos de petróleo nas amostras da área do Pólo Industrial de Manaus (PIM), apresentando níveis mais elevados para todos os compostos analisados, sendo os HPA típicos de óleo degradado.

Neste mesmo contexto, Costa (2009) realizou medições de hidrocarbonetos ao longo de um trecho do rio Urucu, para avaliar o possível impacto proveniente das áreas portuárias da Província petrolífera de Urucu, sobre as assembleias de peixes encontradas no rio Urucu, determinando que não se obtiveram níveis de hidrocarbonetos significativos, que evidenciassem alguma modificação na comunidade de peixes como consequência do despejo de efluentes da atividade petrolífera na área.

Outro estudo, realizado por Lopes (2010), comprova que os sedimentos do rio Negro estão sendo influenciados pelas atividades antrópicas das principais bacias da cidade de Manaus, detectando-se metais pesados em concentrações elevadas, segundo agências ambientais. A estes resultados deve-se, principalmente, a influência do carreamento dos contaminantes provenientes das microbacias do São Raimundo e do Educandos, as quais drenam maior potencial de poluição urbana de Manaus.

1.4 PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA BIORREMEDIAÇÃO

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo vêm sendo isoladas (TONINI et al., 2010). Dentre as bactérias, os principais gêneros que possuem aparato enzimático capaz de degradar aerobicamente hidrocarbonetos, estão: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Beijemickia*, *Bosea*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cupriavidus*, *Cycloclasticus*, *Flaviomonas*, *Flavobacterium*, *Gordonia*,

Microbacterium, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Parvibaculum*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thermomonas*, *Variovax* e *Vibrio* (ALVAREDO, 2009; CRAPEZ et al. 2002; JACQUES et al. 2007; MANDRI & LIN 2007; SEO et al. 2009; VAN HAMME et al., 2003).

Outras bactérias que podem degradar hidrocarbonetos sob condições anaeróbicas, são as seguintes: *Blastochloris sulfovirdes*, *Azoarcus sp.*, *Dechloromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Thauera aromática*, *Vibrio sp.*, *Geobacter grbciae*, *Geobacter metallireducens*, *Desulfobacula toluolica* e *Desulfobacterium cetonicum* (VAN HAMME et al., 2003).

Segundo Atlas (1995), os microrganismos que degradam hidrocarbonetos estão amplamente distribuídos no solo e em ambientes aquáticos. Comunidades desses microrganismos normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando os hidrocarbonetos estão presentes, essas comunidades aumentam atingindo 10% da comunidade. Além do Atlas (1995), Rittmann (1992) e Kataoka (2001) relataram que a degradação somente ocorrerá se existirem algumas interações, como: o contaminante deve estar próximo e disponível ao microrganismo e este deve ser capaz de participar de alguma parte do processo de degradação ou transformação (HOEPEL e HINCHEE, 1994). Contudo, o simples desaparecimento do material não implica que ele foi totalmente biodegradado (LANDIS e YU, 1995).

A biodegradação do petróleo, em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo (CRAPEZ et al. 2002, TIBURTIUS et al. 2004, JACQUES et al. 2007).

Focht (1993) recomenda o emprego de culturas consorciadas para que o metabolismo microbiano possa biodegradar compostos bifenílicos. Muitos estudos têm revelado maior eficiência de biodegradação de hidrocarbonetos por culturas mistas (DAVE et al, 1994; AL-HADHRAMI et al, 1995; VENKATESWARAN, et al, 1995; GRADY, 1985). Estes trabalhos comprovam que a capacidade degradativa e a resistência às substâncias tóxicas de uma comunidade são maiores que de uma cultura pura, pois a mineralização de um composto xenobiótico, com frequência, requer a união da atividade de múltiplas enzimas e fatores físico-químicos.

Por outro lado, Batista (2009) desenvolveu um trabalho para estudar a comunidade bacteriana associada à macrófita aquática *Eichornia crassipes*, na saída de efluentes da refinaria Reman da Petrobrás, e avaliar seu potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Entre os diferentes microrganismos isolados que demonstraram maior potencial de biodegradação se encontram: *Eichornia crassipes*, *Enterobacter sp.*, e *Methilobacterium radiotolerans*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter baumannii*.

1.5 TÉCNICAS DE SEQUENCIAMENTO DE DNA E BIOINFORMÁTICA

Uma maneira de explorar a diversidade genética de vários ambientes é o isolamento do DNA total de amostras ambientais sem o cultivo dos microrganismos presentes (HANDELSMAN, 2004). Nessa abordagem denominada de Metagenômica, tem-se acesso ao conjunto de genomas de microrganismos como um todo, permitindo isolar genes como o rRNA 16S, utilizado no estudo da estrutura de comunidades e diversidade genética de microrganismos procariotos de ambientes naturais (HANDELSMAN, 2005).

As abordagens Metagenômicas modernas aplicam distintas técnicas de sequenciamento, chamadas de segunda geração (NGS-Next Generation Sequencing), lançadas por três grandes empresas multinacionais: Roche (454-pirosequenciamento), Illumina (Solexa Genome Analyzer) e Applied Biosystem (SOLiD), que tem permitido estudar genomas microbianos completos a partir de amostras ambientais, bem como identificar e pesquisar clusters gênicos funcionais codificando enzimas microbianas de interesse tecnológico, como lipases, despolimerases ou hidrolases para polímeros complexos (KUNIN et al., 2008). Para a análise dos dados gerados nas técnicas de pirosequenciamento, o software *Mothur* (SCHLOSS, 2009) é o mais utilizado comumente, entre outros.

1.6 ESTIMATIVA DE RIQUEZA E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES

A forma mais direta e comum de se medir diversidade é usar a riqueza de espécies, que consiste simplesmente no número de espécies que existe numa determinada comunidade ou área de interesse (WILSEY et al. 2005). Para ter certeza da riqueza de espécies numa área, deveria-se identificar todos os indivíduos, o que se torna impossível em comunidades preservadas com grande quantidade de microrganismos e invertebrados. Um outro problema é que comunidades não são unidades fechadas, mas abertas ao fluxo de entrada e saída de

migrantes. Isto faz com que, mesmo após anos de estudos intensivos, inventários revelem a existência de espécies não encontradas anteriormente (MELO, 2008).

Conhecer a diversidade de espécies em uma área é fundamental para a compreensão da natureza e, por extensão, para otimizar o gerenciamento da área em relação a atividades de exploração de baixo impacto, conservação de recursos naturais ou recuperação de ecossistemas degradados (MELO, 2008). Na literatura existem muitos índices de diversidade, que são pouco dependentes do esforço amostral, ou seja, com amostras relativamente pequenas pode-se obter um valor de diversidade que mudará pouco conforme se aumenta o esforço amostral (MAGURRAN 2004). Entre algumas das técnicas para estimar a riqueza e diversidade, se encontram as seguintes (RODRIGUES, 2011):

- Curvas de Rarefação: consistem em calcular o número esperado de espécies (Diversidade) em cada amostra para um tamanho de amostra padrão. As curvas de rarefação permitem extrapolar a relação de OTU's em função do número de sequências; e indicam o efeito do esforço realizado no sequenciamento para estimar o valor máximo de OTU's em um nível filogenético (FERREIRA, 2011). A obtenção de uma curva desse tipo permite a comparação de amostras, mesmo que com intensidades amostrais diferentes. O número esperado de espécies é obtido pela equação:

$$E(S_n) = \sum_{i=1}^s \left[1 - \frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right]$$

Legenda:

- $E(S_n)$: número esperado de espécies em uma amostragem aleatória;
- S é o número total de espécies registradas;
- N é o número total de indivíduos registrados;
- N_i é o número de indivíduos da espécie i ;
- n é o tamanho padronizado da amostra escolhido.

- Estimador de riqueza Chao 1 (não paramétrico): é baseado na abundância de OTU's únicas (singletons) e raras (doubletons) para estimar a diversidade de uma população de tamanho desconhecido. O cálculo é realizado de acordo com a equação:

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

Legenda:

- S_{Chao1} : estimativa de riqueza;
- S_{obs} : número de espécies observadas;
- n_1 : número de OTU representada por apenas um indivíduo;
- n_2 : número de OTU representadas por apenas dois indivíduos.

- Índice de Shannon: mede a diversidade e é utilizado em situações em que uma comunidade inteira não pode ser inventariada. Seu cálculo leva em consideração que as espécies apresentam abundâncias diferentes. O índice é calculado de acordo com a equação:

$$H_{\text{Shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{S_i}{N} \ln \frac{S_i}{N}$$

Legenda:

- S_{obs} : número de espécies observadas;
- S_i : número de sequências da OTU i ;
- N : número de sequências amostradas.

- Índice de Simpson (ÑIQUE, 2010): mede também a diversidade e quantifica a probabilidade de dois indivíduos, selecionados aleatoriamente numa comunidade infinita, pertencerem a uma mesma espécie. Se pi é a probabilidade que tem um indivíduo de pertencer à espécie i ($i=1, 2, 3, 4, \dots, S$) e a extração de cada indivíduo é um elemento independente, a probabilidade de dois indivíduos de uma mesma espécie serem eleitos ao acaso será $pi \times pi$ ou pi^2 . Já a probabilidade média de que isso ocorra será igual à soma das probabilidades individuais de cada espécie. O índice de Simpson pode ser calculado mediante a equação seguinte:

$$D = \sum_{i=1}^s (pi^2) \quad \text{onde } pi = \frac{ni}{N}$$

Legenda:

- ni : representa a abundância da espécie i ;
- N : é o número total de indivíduos em toda a comunidade.

Como Simpson mede a dominância, ou seja, atribui valores de dominância dentro de uma comunidade, deverá subtrair de 1 para estimar a diversidade (comumente é usado o recíproco e o inverso do índice de Simpson). Ou seja:

$$\text{invD}=1-D \quad \implies \quad D = 1 - \sum_{i=1}^s pi^2$$

Uma característica de Simpson é a sua sensibilidade às mudanças nas espécies abundantes. É útil para o monitoramento ambiental, que mede a variação das espécies mais abundantes por alguma perturbação. Os valores da diversidade, segundo Simpson, se encontram dentro de uma escala de 0 a 1; sendo maior quando se aproxima de um e menor ao aproximarse de zero, o que indicará maior dominância (ÑIQUE, 2010).

Assim, medidas de riqueza de espécies que permitam estimar a riqueza a partir dos dados obtidos, ou comparar inventários entre diferentes áreas com diferentes unidades amostrais, são bastante úteis para comparar comunidades microbianas. Entretanto, frequentemente a comparação de comunidades é baseada em diferentes tamanhos amostrais (RODRIGUES, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a biodiversidade bacteriana presente no dique de efluentes e no igarapé antes e depois do despejo de efluentes de hidrocarbonetos, na área operacional da Província Petrolífera de Urucu (Petrobrás).

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros físico-químicos e cromatográficos nos corpos de água;
- Extrair o DNA total de amostras do dique de efluentes e do igarapé antes e depois do despejo de efluentes de hidrocarbonetos;
- Sequenciar o gen rRNA 16S para analisar as diversas comunidades bacterianas presentes nas amostras, mediante análise taxonômica da biodiversidade identificada;
- Identificar os microrganismos presentes nos diferentes ambientes analisados;
- Comparar os índices de riqueza de Chao e ACE e da diversidade bacteriana mediante índices de Shannon e Simpson, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na Base Operacional da Petrobrás denominada Geólogo Pedro de Moura (BOGPM), comumente chamada de Província Petrolífera de Urucu (referência geográfica: 4°30'S/64°30'W), que fica a 653km em linha reta de Manaus, localizada na bacia do Rio Urucu, afluente da margem direita do Rio Solimões, no município de Coari, no estado do Amazonas (Figura 3). A bacia do Rio Urucu está encaixada no

interflúvio dos rios Juruá e Purus (Figura 1), em uma grande área de baixada, com muitas áreas alagadas intercaladas por trechos de terra firme (PETROBRÁS, 2008).



Figura 3. Província Petrolífera de Urucu Base Geólogo Pedro Moura
Fonte: Petrobrás (2008).

Dentro das instalações operacionais da Província Petrolífera de Urucu, encontra-se uma estação de tratamento de efluentes (ETE), na qual é realizado o tratamento e controle de parâmetros físico-químicos, para garantir que o despejo contínuo dos efluentes aos corpos de água esteja dentro das especificações estabelecidas na normativa ambiental do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), especificamente a norma N° 357, de 17 de março de 2005. Este despejo de efluentes, é realizado desde o início das operações desta província no ano 1988 (LEYEN, 2008).

3.2 COLETA DE AMOSTRAS

A coleta inicial das amostras, para começar a primeira etapa do estudo, foi realizada em julho de 2011, durante o período hidrológico de seca, que segundo Petrobrás (2008), a Província Petrolífera de Urucu, apresenta a estação de seca, no período junho-novembro e uma estação chuvosa de dezembro-maio. Neste caso, somente coletou-se água sem sedimento no igarapé da onça, utilizando garrafas pet novas de 2 litros conservadas com 5 ml de álcool 70%. Foram selecionados dois pontos de coleta, o primeiro foi antes do despejo de efluentes no igarapé da onça (Aa), aproximadamente a 100 metros antes, e o segundo ponto foi aproximadamente a 100 metros depois da intersecção do percorrido do despejo de efluentes

desde o dique de contenção, com o igarapé da onça (Ad). O igarapé da onça faz desembocadura no rio Urucu aproximadamente a 5 km em linha reta.

Como não se obteve um mínimo de material sólido para a experimentação, fez-se uma nova coleta em campo em outubro de 2011 (segunda etapa do estudo). Desta vez foi coletado a maior parte de sedimento do leito do igarapé, para o qual foi utilizada uma pequena pá de plástico e uma garrafa de vidro com tampa, para guardar o material; ambos acessórios foram totalmente esterilizados durante 30 minutos em autoclave. Nas figuras 4 e 5 podem visualizar-se os locais de coleta das amostras da primeira etapa do estudo.



Figura 4. Intersecção do despejo de da onça



Figura 5. Igarapé depois do despejo efluentes com igarapé de efluentes

Afim de corroborar os dados da biodiversidade microbiana identificada na primeira etapa do estudo, posteriormente no mês de julho de 2013, foi realizada uma terceira coleta utilizando, desta vez, um instrumento específico para coletar somente material sólido de sedimento, denominado tubo tipo Core Vertical, colocando o material em jarra de plástico esterilizada para descargar uma quantidade menor em tubos Falcon. As comunidades de estudo consideradas foram: dique de efluentes, igarapé da onça antes do despejo de efluentes (Aa) e o igarapé depois da mistura com efluente (Ad). As figuras 6 e 7 apresentam as comunidades e coleta de amostras.



Figura 6. Dique de efluentes da Província



Figura 7. Coleta de sedimento no igarapé com tubo vertical

Na experimentação para extração do DNA do material sólido coletado, não foi possível visualizar o material de DNA com qualidade mínima desejada. Por esta razão, procedeu-se a realizar outra visita em campo, em setembro de 2013 (ainda no período hidrológico de seca), coletando, desta vez, dois litros de água para cada ponto considerado, para obter o sedimento mínimo depois do processo de centrifugação a temperatura ambiente, com o qual se extrai o material de DNA com a qualidade mínima para o estudo.

Para esta nova etapa, buscaram-se outros locais para coletar o material (área geográfica diferente à primeira etapa do estudo), achando uma nascente de um igarapé natural sem contato com o despejo de efluentes, inclusive sem estar considerado em mapas ou planos, nem possuir nome específico. As comunidades consideradas foram: dique de efluentes, igarapé natural (sem nome) e igarapé natural depois de misturado com despejo de efluentes. As distâncias entre os pontos de coleta foram as seguintes: Igarapé natural 50m e 80m antes da mistura com efluentes. Igarapé misturado com efluentes a 50m e 80m depois da mistura.

Nesta nova etapa do estudo, utilizou-se uma garrafa de Van Dor para coletar água do fundo do dique de efluentes e água a 50 cm de profundidade no meio do dique; para os outros pontos de coleta de amostras, utilizou-se garrafas pet esterilizadas. Foram coletadas quatro amostras diferentes em cada uma das três comunidades (totalizando 24 litros de água nas 12 amostras). Nas figuras 8 e 9 pode-se observar os novos pontos de coleta das amostras.



Figura 8. Coleta de água no dique de efluentes com garrafa de Van Dorn



Figura 9. Igarapé Natural (sem nome)

Na figura 10 pode observar-se geograficamente os diferentes pontos de coleta para as duas etapas do estudo.

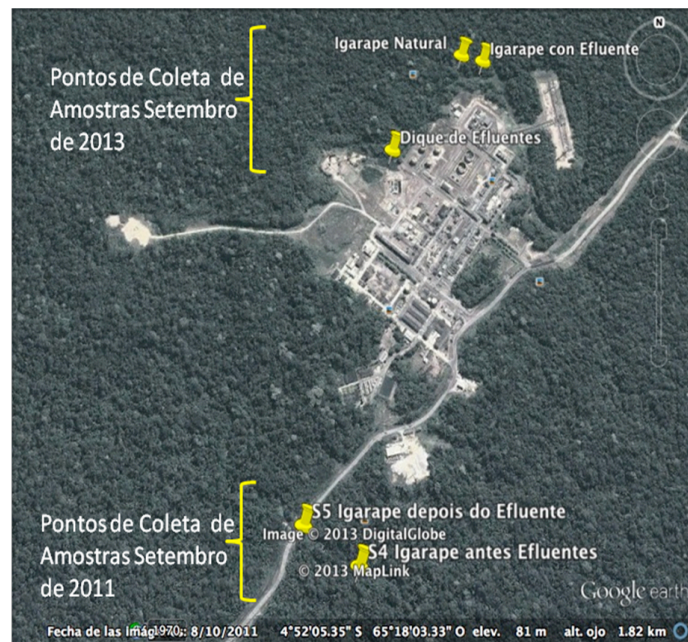


Figura 10. Visualização geográfica de comunidades amostradas.
Fonte: Google Earth (2013).

As tabelas 1 e 2 apresentam os diferentes pontos de coleta, a codificação realizada e suas correspondentes coordenadas geográficas para as duas etapas do estudo.

Tabela 1

Localização de pontos de coleta da primeira etapa do estudo

Nº	Lugar de coleta de sedimento	Cód.	Coordenadas Geográficas	Profundidade do igarapé m
1	Igarapé antes do despejo de efluentes	Aa	S 04° 52' 26.2" W 065° 18' 03.0"	0.4
2	Igarapé depois do despejo de efluentes	Ad	S 04° 52' 25.3" W 065° 18' 03.3"	0.3

Tabela 2

Localização de pontos de coleta da segunda etapa do estudo

Nº	Lugar de coleta de Amostra	Cód.	Coordenadas Geográficas	Profundidade da coleta (m)
1	Beira Dique (Escada)	A1	S 04° 51' 50.4" W 065° 18' 00.3"	0.3
2	Beira Dique	A2	S 04° 51' 49.7" W 065° 18' 00.4"	0.3

Tabela 2

Localização de pontos de coleta da segunda etapa do estudo

Continuação...

Nº	Lugar de coleta de Amostra	Cód.	Coordenadas Geográficas	Profundidade da coleta (m)
3	Centro do Dique a 50 cm da Superfície	A3	S 04° 51' 50.2" W 065° 18' 00.1"	0.5
4	Fundo do centro do Dique	A4	S 04° 51' 50.2" W 065° 18' 00.1"	2.0
5	Igarapé Natural a 50 m antes efluente	A5	S 04° 51' 40.4" W 065° 17' 52.7"	0.2
6	Igarapé Natural beira 50 m antes efluente	A6	S 04° 51' 40.4" W 065° 17' 52.7"	0.2
7	Igarapé Natural a 80 m antes efluente	A7	S 04° 51' 40.3" W 065° 17' 52.8"	0.3
8	Igarapé Natural beira 80 m antes efluente	A8	S 04° 51' 40.3" W 065° 17' 52.8"	0.2
9	Igarapé 50 m depois do efluente	A9	S 04° 51' 40.8" W 065° 17' 50.8"	0.3
10	Igarapé beira 50 m depois do efluente	A10	S 04° 51' 40.8" W 065° 17' 50.8"	0.2
11	Igarapé 80 m depois do efluente	A11	S 04° 51' 40.9" W 065° 17' 50.4"	0.2
12	Igarapé beira 80 m depois do efluente	A12	S 04° 51' 40.9" W 065° 17' 50.3"	0.2

3.3 MEDIÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CROMATOGRAFIA

Em ambas etapas do estudo realizado, foram medidas as variáveis de alcalinidade (pH), condutividade elétrica (CE) e temperatura °C (T), com o detector múltiplo marca Hanna modelo HI 98130.

Outro aspecto considerado, somente na segunda etapa do estudo, foi a detecção de traços de petróleo ou seus derivados nos diversos corpos de água estudados, para o qual foi coletado 100 ml de água nas três comunidades, envasados a temperatura ambiente em frascos de vidro esterilizados, lacrados e enviados por transporte aéreo, para posterior análise no laboratório de cromatografia do Instituto de Pesquisa Petrolífera da Universidade do estado Zulia (INPELUZ), Maracaibo-Zulia, Venezuela, em conjunto com a empresa Serviços Técnicos em Cromatografia SISCHROM.

Para a realização de análise cromatográfico, aplicaram-se as técnicas de extração líquido-líquido com N-Hexano usando a centrifugação e logo a evaporação do solvente até a mínima quantidade possível, e técnica de purga e trapeamento (Purge and trap, PT-GC/MS), que é uma técnica para extração dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), cujo método oficial está estabelecido pela norma internacional EPA 524.2 (GEBARA, 2013).

Para a detecção de hidrocarbonetos totais (Aromáticos e Alifáticos), o equipamento utilizado foi um cromatógrafo de detecção de massas marca Clarus 600 de Perkin-Elmer, com tecnologia quadrupolo e software Turbomassas. A coluna do cromatógrafo é de fase líquida de 30m de comprimento por 0.25µm (micron) de diâmetro interno e uma grossura de película de líquido dentro da coluna de 0.5µm.

3.4 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Na primeira etapa do estudo, o primeiro passo foi a centrifugação do sedimento das amostras coletadas, utilizando uma centrífuga marca *Eppendorf* modelo Mini Spin, em tubos de 2 ml, a uma rotação de 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente, afim de se obter só material sólido. Para a extração do DNA, seguiu-se o procedimento recomendado pelo fabricante do kit *PowerSoil*TM DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc. USA), o qual requer inicialmente 0.25 gr da amostra sólida para cada extração de DNA. A experimentação foi realizada em duplicata das amostras Aa (amostra antes do despejo de efluentes) e Ad (amostra posterior com efluente).

A concentração e a pureza do DNA obtido foi estimado por medição da absorbância a 260 nm num espectrofotômetro (NanoDrop ® ND-1000 Technologies). O produto do DNA foi avaliado mediante um perfil eletroforético com padrão de massa de 30 ng de DNA padrão e gel de agarose com concentração de 0,8%, foi corrido em cuba contendo 100 ml tampão TBE 1X, voltagem de 70V, com tempo de corrida de aproximadamente 1 hr. As amostras foram preparadas adicionando 5 µl de corante de aplicação ao volume total da reação e aplicadas no gel. Para determinar a dimensão das bandas obtidas, usou-se o marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder Promega, Madison W. USA).

Posteriormente, para a reação da PCR, adicionou-se a 1 µl DNA de cada amostra, uma mistura pré-mix que contém água pura, 1 µl do Primer iniciador (*Forward Multiplex Identifier MID*) e 1 µl do Primer Reverso (*Reverse*), enzima taq DNA polimerase, nas quantidades

requeridas para completar uma solução final de 25 μ l. A PCR foi realizada em quintuplicada para as duas amostras. Para a primeira etapa do estudo, foram utilizados os primers MID1 e MID3.

Toda esta mistura foi colocada num termociclador (AB Applied Biosystems veriti 96 well Thermol cycler), programado para realizar o seguinte ciclo de PCR: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, seguida de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Estes primers foram desenhados por grupo de pesquisa da Universidade Federal do Amazonas UFAM (Genética de Microrganismos e Biotecnologia) para as regiões variáveis do rDNA da bactéria *E.coli* com degeneração no *forward*. Os quais se ligam às regiões variáveis V3 e V4 que amplificam fragmentos de DNA de 465 pb do gene rRNA 16S (NEVES, 2013).

Para a segunda etapa do estudo, centrifugaram-se à temperatura ambiente, os 24 litros de água coletados, afim de obter a máxima concentração de microrganismos do corpo de água, no mínimo de material de sedimento. A centrifugação foi realizada em tubos Falcon de 50 ml, descartando a água do sobrenadante até obter somente material sólido (mínimo de 0.25 gr requeridos para cada extração de DNA). Para este processo, utilizou-se uma centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R, a uma rotação de 4000 rpm durante 10 minutos. Para a extração do DNA total, seguiu-se o procedimento recomendado pelo fabricante do kit *PowerSoil*TM DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc. USA).

A preparação da reação da PCR na segunda etapa do estudo, foi composta por 5 μ l DNA de cada amostra, 1 μ l do Primer iniciador e 1 μ l do Primer Reverso, enzima taq DNA polimerase e água ultrapura Milli-Q (água deionizada) para completar uma solução final de 25 μ l. A PCR foi realizada em quintuplicada para as doze amostras.

Para esta etapa foi utilizado o mesmo termociclador e ciclo de PCR da primeira etapa do estudo, e foram utilizados quatro tipos de primers MID1, MID2, MID3 e MID4, combinando todas as amostras com cada um dos quatro primers, para ser corridas em três plataformas diferentes na técnica de pirosequenciamento (454 Roche). A combinação dos primers com as diferentes amostras ou bibliotecas, foi a seguinte:

- Amostra 1: A1 com MID1
- Amostra 2: A2 com MID2
- Amostra 3: A3 com MID3
- Amostra 4: A4 com MID4
- Amostra 5: A5 com MID1
- Amostra 6: A6 com MID2

- Amostra 7: A7 com MID3
- Amostra 8: A8 com MID4
- Amostra 9: A9 com MID1
- Amostra 10: A10 com MID2
- Amostra 11: A11 com MID3
- Amostra 12: A12 com MID4

A especificação dos primers é a seguinte:

Primer Reverse:

Lib-L B	Key	16S R
CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	TCAG	GGGACTACCAGGGTATCTAAT

Primers iniciadores:

16S-LibL-F-MID1

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGACGACTACTCCTACGGRAGG
CAGCAG

16S-LibL-F-MID2

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGTAGTATACTCCTACGGRAGG
CAGCAG

16S-LibL-F-MID3

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACTACTCGTACTCCTACGGRAGGC
AGCAG

16S-LibL-F-MID4

CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACACGTATACTCCTACGGRAGG
CAGCAG

A purificação de todo material de DNA foi realizada utilizando o GFX™ PCR DNA *and gel band purification kit* (GE Healthcare), seguindo o procedimento indicado pelo fabricante (corte das bandas na faixa dos 500 pb). Com o objetivo de validar a purificação das amostras, realizou-se eletroforese em gel de agarose 0,8% e 1kb para padrão, 5 µl da cada amostra purificada, aproximadamente por uma hora a 70 volts.

Finalmente, os produtos resultantes das reações da PCR em cada tratamento foram armazenados a temperatura criogênica de -20°C até serem enviados para a respectiva análise

mediante a técnica de Pirosequenciamento (plataforma 454 da Roche). As amostras da primeira etapa do estudo foram analisadas pela empresa Helixxa-Genomics Service Providerem (Campinas-SP, Brasil), e as amostras da segunda etapa do estudo foram analisadas pela empresa GenOne (Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

Por sua parte, a empresa GenOne, para garantir realizar a técnica de pirosequenciamento (454), com material de qualidade, realizou uma quantificação fluorométrica das 12 amostras (bibliotecas) enviadas, utilizando o Kit de Ensaio QubitdsDNA HS Assay (*Life Technologies*). A integridade das 12 bibliotecas foi verificada em um gel de agarose a 1,2% corrido a 100V por uma hora. As bibliotecas foram reunidas em três comunidades separadas com base em um volume equivalente a 40ng de DNA.

As três comunidades foram purificadas três vezes usando o kit AxyPrep Mag PCR Clean-up (*Axygen Biosciences*) para remover completamente as impurezas dos primers, e depois foram quantificados fluorometricamente usando o kit QubitdsDNA HS Assay Kit. A qualidade do ADN foi verificada através do Kit *Agilent High Sensitivity DNA (Agilent Technologies)*.

3.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA E ESTATÍSTICA

3.5.1 Bioinformática

Os dados gerados da técnica do pirosequenciamento baseada na plataforma 454 foram submetidos a análise mediante aplicação do software *Mothur* (SCHLOSS, 2009), descrito no site http://www.mothur.org/wiki/454_SOP. Os arquivos requeridos para esta análise, incluindo Lookup data for use with shhh.flows, SILVA-based bacterial reference alignment, e mothur-formatted version of the RDP training set(v.9), foram também baixados de http://www.mothur.org/wiki/454_SOP. O programa de microsoft Excel foi utilizado para elaboração de gráficos e o programa FigTree para ejecutar os arquivos tree para visualizar as árvores filogenéticas.

Para começar a corrida no software mothur, os arquivos de extensão "sff" gerados da técnica de pirosequenciamento (454) foram a base para extrair os arquivos fasta, qual e flow. Os passos seguintes foram: 1) a redução de erros de sequenciação usando os flowgrams; 2) processamento de seqüências melhoradas; 3) remoção de quimeras e 4) remoção de "contaminantes". A saída dessas etapas foram 4 tipos de arquivos: "final.fasta", "final.names",

"final.groups" e "final.taxonomy". Todas as seguintes análises foram baseadas nestes 4 arquivos importantes.

As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram construídas usando os comandos "dist.seqs" e "cluster", e as tabelas foram criadas pelo comando "make.shared". A taxonomia foi gerada por comando "classify.otu" e importada para o Excel. Os dados para as curvas de Rarefação, foram gerados por "rarefaction.single" e importados para o Excel para traçar as curvas. Os índices de riqueza Ace e Chao, e os índices de diversidade Shannon e Simpson, foram gerados por "summary.single" e importados para o Excel.

Os diagramas de Venn foram gerados pelo comando "Venn". Para os diagramas de Venn de organismos não classificados, os nomes de sequência associados com organismos não classificados foram extraídos da taxonomia para construir categorias OTUs. Em seguida, um diagrama de Venn foi gerado com base nas OTUs não classificados. As árvores filogenéticas foram geradas por "tree.shared" e estes arquivos foram visualizados pelo programa FIGTREE. O formato gráfico (extensão .png) da árvore filogenética foi exportado do programa FIGTREE.

3.5.2 Estatística

A análise estatística de todos os dados de sequências das 12 bibliotecas, gerada do programa Mothur, será realizada mediante as seguintes técnicas:

- Análise de Variância (ANOVA): segundo programa Mothur é chamada AMOVA, a qual permite determinar várias questões simultaneamente, considerando problemas onde é necessário decidir se diferenças observadas entre mais do que duas médias amostrais podem ser atribuídas ao acaso, ou se são indicativas de diferenças reais entre as médias das populações amostradas (FREUND, 2006). Na comparação de tratamentos, faz-se uma análise de variância que, embora exija o cálculo de variância, na realidade compara médias de tratamentos (VIEIRA, 2006).

Uma análise de variância expressa uma medida da variação total em um conjunto de dados como uma soma de termos e cada um é atribuído a uma fonte ou a uma causa específica de variação. Quando há somente uma fonte de variação além do acaso, refere-se à análise como uma *análise de variância de um critério* (FREUND, 2006), ou One-way. O primeiro termo, a quantidade que mede a variação entre as médias mostrais, é designado como a *soma de quadrados de tratamentos*, $SQ (Tr)$, e o segundo termo, que mede a variação dentro das

amostras individuais, é designado como a *soma de quadrados de erros (ou resíduos)*, $SQ(E)$:
 $F = QM(Tr) / QM(E)$.

Onde a palavra “tratamento” refere-se ao que está em teste, e “erro” refere-se ao erro experimental, a distribuição amostral F é utilizada para comparar duas variâncias, e se refere a esta estatística F como a *razão de variâncias*. Como a hipótese nula só será rejeitada quando F for grande (isto é, quando a variação entre as médias é demasiadamente grande para ser atribuída ao acaso), a decisão de rejeição fica a critério do teste baseado na distribuição F , para $\alpha = 0,05$ ou $0,01$. Os valores de F tabelados (valores críticos de F) para os graus de liberdade do numerador e do denominador indicam se haverá ou não rejeição da hipótese nula (FREUND, 2006).

- Análise Libshuff: procura avaliar se duas comunidades (bibliotecas) possuem a mesma estrutura, aplicando o teste estatístico de Cramer-Von Mises (SINGLETON et al., 2001). A coluna intitulada "dCXYScore" mostra o resultado do teste estatístico para cada comparação realizada e a coluna a direita o quão significativo é este valor, indicando a probabilidade da comunidade possuir a mesma estrutura devido ao acaso. Entretanto, a comparação de cada par de amostras requer a realização de dois testes de significância, sendo assim, uma correção para múltiplos testes de significância se faz necessário para minimizar o Erro Tipo I (probabilidade de detectar incorretamente uma diferença significativa) (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2006). É bem documentado que o teste de Bonferroni controla somente a probabilidade de falsos positivos (erro Tipo I, rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira) (PISA, 2010).

4 RESULTADOS E ANÁLISE DE DADOS

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os dados das coletas de amostras e os resultados dos parâmetros analisados se encontram na tabela 3 para a primeira etapa do estudo, e na tabela 4 para a segunda etapa do estudo.

Tabela 3

Resultados parâmetros da primeira etapa do estudo

Nº	Comunidade	Cód.	T (°C)	pH	Condutividade Elétrica CE $\mu\text{S/cm}$
1	Igarapé antes do despejo de efluentes (100m antes)	Aa	26	7.1	0.2
2	Igarapé depois do despejo de efluentes (100m depois)	Ad	26	7.1	0.2

Tabela 4

Resultados parâmetros da segunda etapa do estudo

Nº	Comunidade	Cód.	T (°C)	pH	Condut. Elétrica (CE) $\mu\text{S/cm}$
1	Beira Dique (Escada)	A1	31.2	5.94	0.29
2	Beira Dique	A2	31.3	6.0	0.25
3	Centro do Dique a 50 cm da Superfície	A3	32.1	6.09	0.25
4	Fundo do centro do Dique	A4	31.4	6.09	0.30
5	Igarapé Natural a 50 m antes efluente	A5	26.9	5.1	0
6	Igarapé Natural beira 50 m antes efluente	A6	26.8	5.0	0
7	Igarapé Natural a 80 m antes efluente	A7	25.1	4.8	0
8	Igarapé Natural beira 80 m antes efluente	A8	25.2	5.0	0
9	Igarapé 50 m depois do efluente	A9	26.9	5.76	0.21
10	Igarapé beira 50 m depois do efluente	A10	27.0	5.6	0.2
11	Igarapé 80 m depois do efluente	A11	27.1	5.4	0.2
12	Igarapé beira 80 m depois do efluente	A12	27.2	5.61	0.21

Os resultados dos parâmetros, medidos na primeira etapa do estudo, foram exatamente iguais, no entanto, na segunda etapa do estudo, obtiveram-se as seguintes variações nos valores dos parâmetros:

- T: 25 - 31.3 °C
- pH: 5 - 6
- CE: 0 - 0.3

No igarapé natural, na segunda etapa do estudo, os valores da condutividade elétrica foram zero, indicando a inexistência de sal neste corpo de água.

4.2. CROMATOGRAFIA

A água das amostras das comunidades 2 e 3 (Igarapé natural e igarapé com efluentes) eram claras, ou seja, não apresentavam turvação. No entanto, a amostra de água da comunidade 1 (dique de efluentes), apresentava turvação, razão pela qual foi aplicada a técnica de extração líquido-líquido com N-Hexano e a técnica de purga e trapeamento, porém, não foi detectado nenhum composto de hidrocarboneto, portanto não foi preciso aplicar esta técnica para as outras duas amostras de igarapés. Os resultados gerados da cromatografia, podem ser visualizados nas figuras 11 e 12.

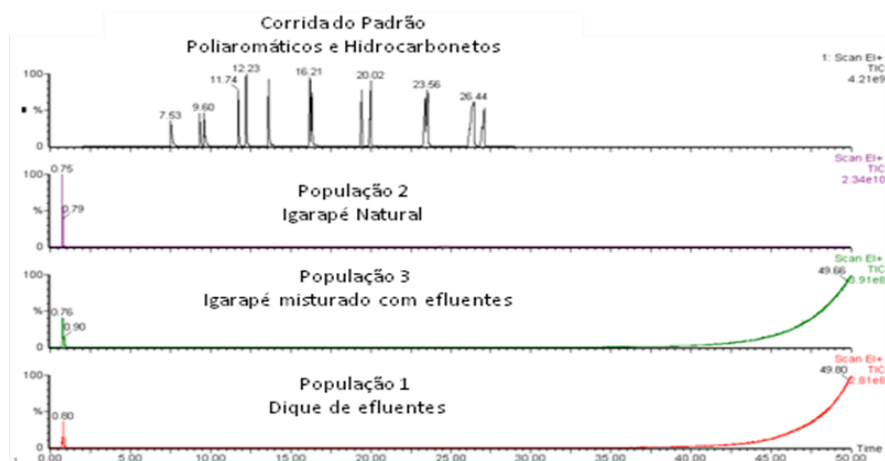


Figura 11. Corrida cromatográfica para as três comunidades

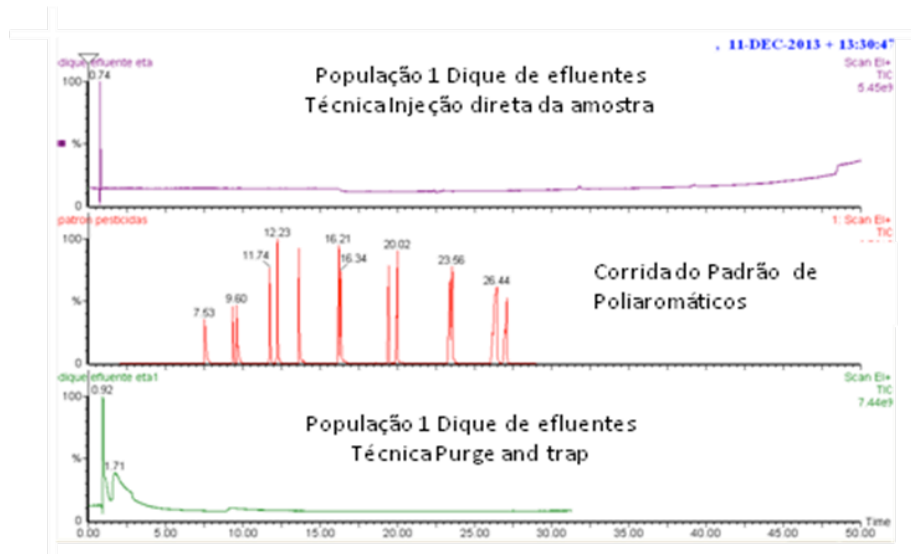


Figura 12. Resultado da corrida cromatográfica comunidade 1 aplicando técnica de purga e trapeamento

Não foi detectado nenhum valor de concentração de algum tipo de hidrocarboneto, que indique a presença de traços de petróleo ou seus derivados, nos pontos amostrados no dia de coleta.

4.3 COMUNIDADES BACTERIANAS E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

4.3.1 Número de sequências

Na tabela 5, pode-se ver o resultado das sequências obtidas na primeira etapa do estudo, especificadas da seguinte maneira:

- Amostra 1: Igarapé da onça antes do despejo de efluente, código da amostra Aa.
- Amostra 2: Igarapé da onça depois do despejo de efluente, código da amostra Ad.

Tabela 5

Sequências geradas na primeira etapa do estudo

Nº	Nome da Amostra	Código Amostra	Nº Seq. Inicial	Nº Seq. Final	Nº Seq. "Não Classificadas" (Espécies desconhecidas)
1	Igarapé antes efluente	Aa	28104	4418	2032
2	Igarapé depois efluente	Ad	43803	8123	3492

Os resultados da primeira etapa do estudo, foram gerados pela empresa Helixxa Genomics Service Providerem. Pode observar-se, as sequências totais obtidas na amostra Aa (Igarapé natural), são diminuídas em 84%, como resultado de aplicação de comandos de filtros e limpeza do software Mothur, resultando um número de 4418 sequências finais, com aproximadamente 46% consideradas “Não Classificadas”. As sequências do igarapé depois do despejo de efluentes, diminuiu para 8123 (Ad), correspondendo aproximadamente 43% a sequências “Não Classificadas”.

O resultado do pirosequenciamento na segunda etapa do estudo, gerado pela empresa GenOne, encontram-se na tabela 6. As amostras foram agrupadas em comunidades para facilitar a posterior análise, ficando agrupadas da seguinte maneira:

- Comunidade 1: Dique de Efluentes confirmado pelas amostras A1, A2, A3 e A4;
- Comunidade 2: Igarapé Natural confirmado pelas amostras A5, A6, A7 e A8;
- Comunidade 3: Igarapé Natural misturado com despejo de efluentes, confirmado pelas amostras A9, A10, A11 e A12.

Tabela 6

Sequências geradas na segunda etapa do estudo

Nº Comunidade	Nome da Comunidade	Código Amostra (Bibliotecas)	Nº. Seq. Inicial	Nº. Seq. Final	Nº Seq. Não Classificadas
1	Dique Efluentes	A1	15819	12000	2122
		A2	22633	16000	3185
		A3	16548	13000	2096
		A4	26641	16000	4580
2	Igarapé Natural	A5	15762	10000	6682
		A6	6969	4000	2691
		A7	18652	13000	4163
		A8	36392	25000	9729
3	Igarapé c/ Efluentes	A9	28664	22000	3758
		A10	23056	15000	4692
		A11	27311	21000	6153
		A12	16796	12000	4041

Diferentemente da primeira etapa do estudo, todas as sequências iniciais apenas são diminuídas entre 19% - 43% nas sequências finais, depois de aplicação de comandos de filtros do software Mothur, nesta segunda etapa do estudo. A comunidade 3 apresenta a maior quantidade de sequências, tanto iniciais como finais, seguida da comunidade 1, e em último lugar fica a comunidade 2. Cabe destacar, que o igarapé natural (comunidade 2) possui a

maior quantidade de seqüências de microrganismos não classificados, apesar de apresentar o menor número de seqüências, tanto iniciais como finais.

4.3.2 Filos

Na primeira etapa do estudo, foi possível identificar 51 filos totais. Na figura 13 pode observar-se a proporção dos filos com maior frequência.

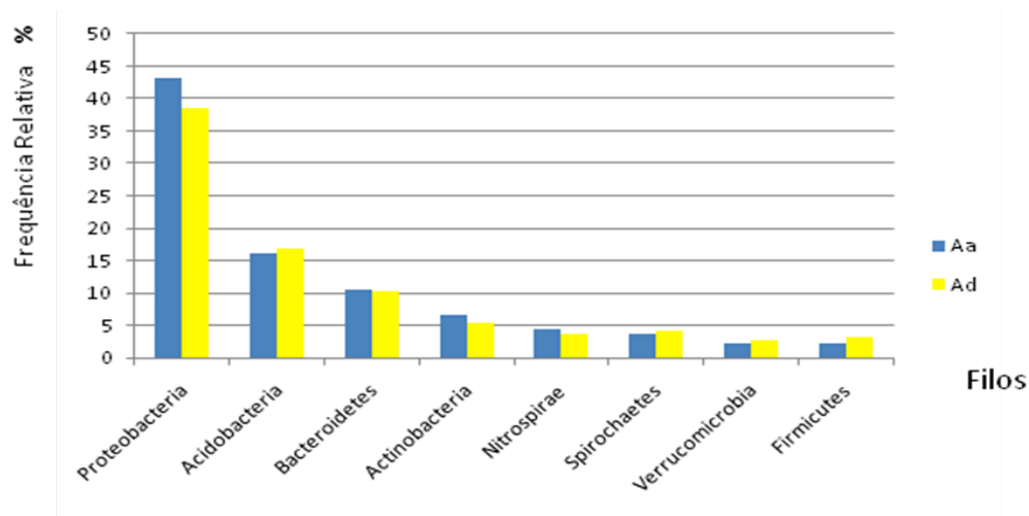


Figura 13. Proporção de Filos primeira etapa do estudo

Os filos que apresentaram maior proporção, na primeira etapa do estudo, foram os seguintes: *Proteobacteria* (>35%), *Acidobacteria* (>15%), *Bacteroidetes* (>10%) e *Actinobacteria* (>5%). Dentre os filos que apresentaram proporção menor de 5%, encontram-se: *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* e *Firmicutes*, entre outros. Todos os filos apresentaram uma proporção equivalente nas duas amostras, somente os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Nitrospirae* têm uma pequena diminuição na proporção (<5%), no igarapé misturado com efluentes. No apêndice 1 podem-se visualizar todos os filos identificados na primeira etapa do estudo.

Na segunda etapa do estudo, identificaram-se 28 filos em total. Na figura 14 pode-se visualizar a proporção de filos na segunda etapa do estudo.

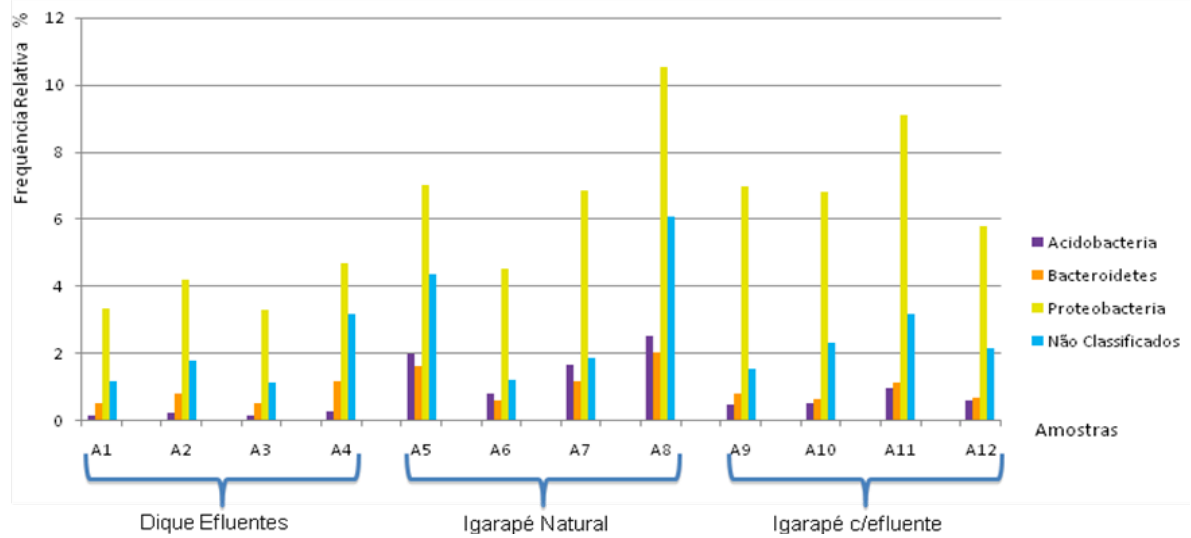


Figura 14. Proporção de Filos predominantes na segunda etapa do estudo

O filo mais predominante em todas as comunidades da segunda etapa do estudo, é o filo *Proteobacteria*, seguidamente se encontram os filos não classificados. A comunidade 2 (igarapé natural) apresenta a maior proporção de filos predominantes, em segundo lugar está a comunidade 3 (igarapé com efluentes), e por último se encontra a comunidade 1 (dique de efluentes) com filos em menor frequência relativa. No apêndice 2 podem-se visualizar todos os filos identificados na segunda etapa do estudo.

4.3.3 Classes

Dentro da proporção de filos na primeira etapa do estudo, encontram-se 89 classes identificadas. Na figura 15 pode observar-se a proporção das classes com maior frequência relativa.

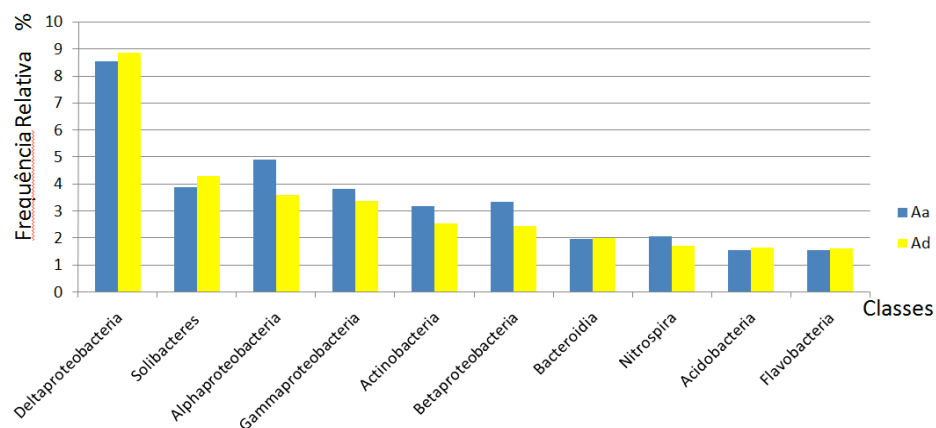


Figura 15. Proporção de classes primeira etapa do estudo

A classe que apresenta maior proporção é a *Deltaproteobacteria* com aproximadamente 8.5% nas duas amostras, seguida das classes *solibacteres*, *alphaproteobacteria*, *gammaproteobacteria*, *actinobacteria* e *betaproteobacteria*, com frequência entre 2-5%, depois encontram-se as classes *bacteroidia*, *nitrospira*, *acidobacteri e*, *flavobacteria*, entre outras, com frequência menor de 2%. Observa-se que a proporção entre as duas amostras é quase proporcional, apresentando uma pequena variação menor de 2%. No apêndice 3 podem-se visualizar todas as classes identificadas na primeira etapa do estudo.

Na segunda etapa do estudo, foram identificadas 60 classes conhecidas e as não classificadas ainda (espécies desconhecidas). Na figura 16 se apresenta a distribuição das diferentes classes nas três comunidades de estudo.

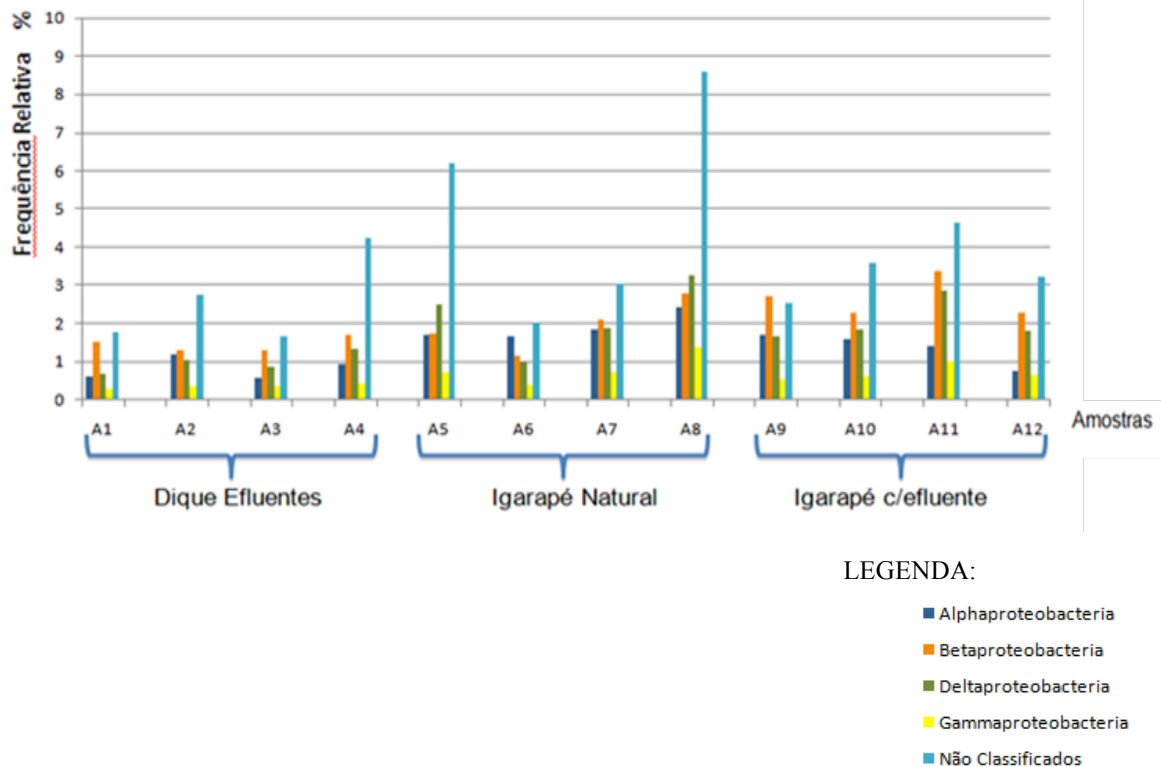


Figura 16. Classes predominantes na segunda etapa do estudo

A classe com maior frequência relativa em todas as comunidades, é a "Não Classificada", seguida das classes *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria*. A comunidade com classes de maior frequência relativa, é o igarapé natural (Comunidade 2), em segundo lugar, encontra-se o igarapé misturado com efluente (comunidade 3), e por último está a comunidade do dique de efluentes, com a menor proporção de classes. No apêndice 4 se encontram todas as classes identificadas na segunda etapa do estudo.

4.3.4 Gêneros

Com relação aos gêneros, foram identificados 306 totais na primeira etapa do estudo. Na figura 17, pode observar-se os tipos de gêneros mais predominantes.

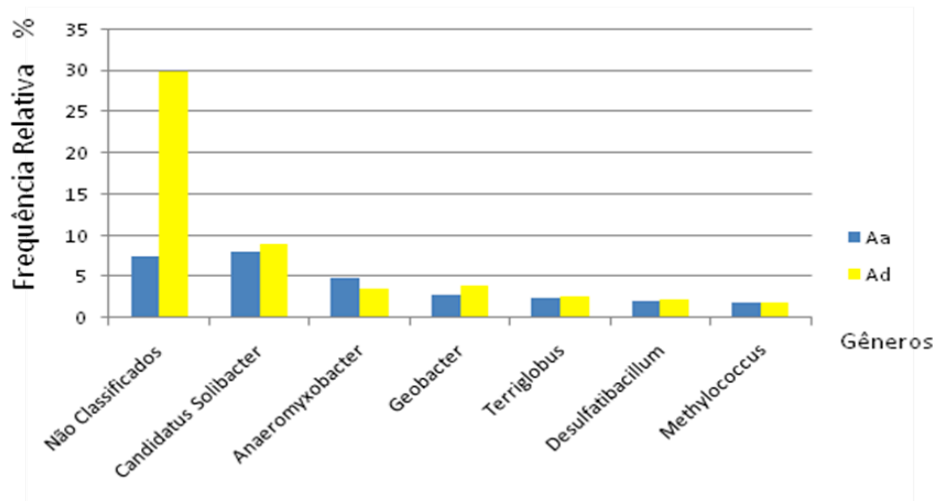


Figura 17. Proporção de Gêneros predominantes na primeira etapa do estudo

Os gêneros com maior proporção ocorreram na amostra do igarapé depois da mistura com efluente (primeira etapa do estudo), foram os "Não classificados" sendo os mais representativos com 30% na frequência relativa, com diferença de aproximadamente 23% neste mesmo tipo de gênero na amostra do igarapé antes da mistura com efluente. Entre os outros gêneros identificados (frequência < 8%), com suas correspondentes espécies (além das espécies não classificadas), encontram-se os seguintes:

- *Candidatus Solibacter*: Espécie *Candidatus solibacter usitatu*;
- *Anaeromyxobacter*: Espécie *Anaeromyxobacter sp.Sw109*;
- *Geobacter*: Espécie *Geobacter metallireducen*, *Geobacter uranireducen*, *Geobacter sulfurireducen*, *Geobacter sp.M2*, *Geobacter psychrophilu*;
- *Terriglobus*: Espécie *Terriglobus roseus*;
- *Desulfatibacillum*: Espécie *Desulfatibacillum umalkenivoran*;
- *Methylococcus*: Espécie *Methylococcus capsulatu*.

Todos estes gêneros apresentam uma frequência relativa menor de 8% e uma mínima diferença aproximada de 1% entre as duas amostras. No apêndice 3 podem-se visualizar todos os gêneros identificados na primeira etapa do estudo.

Na segunda etapa do estudo, foram identificados 321 gêneros caracterizados, além dos "Não Classificados". Na figura 18 pode observar-se os tipos de gêneros mais predominantes, sem considerar os não classificados, os quais representam uma proporção muito grande em todas as amostras, porém o gráfico não mostra os demais gêneros presentes nas amostras.

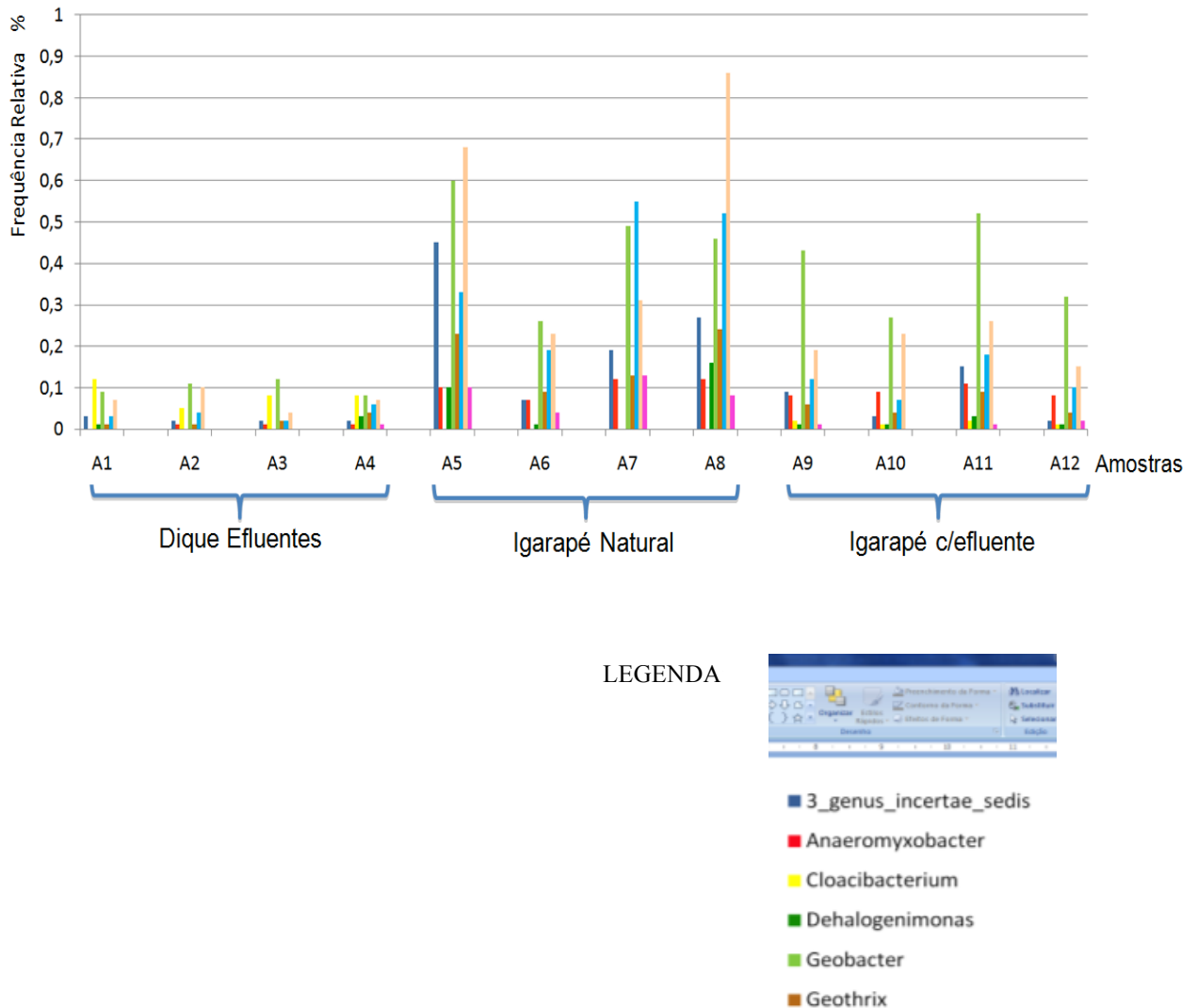


Figura 18. Proporção de gêneros predominantes na segunda etapa do estudo (Exceto os "Não Classificados")
Pode-se observar que o igarapé natural (comunidade 2) é o que possui o maior número

Pode-se observar que o igarapé natural (comunidade 2) é o que possui o maior número na diversidade de gêneros de maior proporção, resultando os gêneros mais predominantes *Gp3* (até 0.85%), *Geobacter* (até 0.6%), *Gp1* (até 0.55%) e *3_genus_incertae_cedis* (até 0.45%), seguidos, em menor proporção (<0.3%), pelos gêneros *Geothrix*, *Dehalogenimonas*, *Anaeromixobacter* e *Holophaga*. Nesta segunda etapa do estudo, não são consideradas as espécies que apresentam % de similaridade baixo.

Na comunidade 3 (igarapé misturado com efluentes), os gêneros *Geobacter* (até 0.52%), Gp3 (até 0.26%) e Gp1 (até 0.18%) são os mais predominantes, seguidos de *3_genus_incertae_sedis* (até 0.15%), *Anaeromyxobacter* (até 0.11%), *Geothrix* (até 0.09%), *Dehalogenimonas* (até 0.06%) e por último *Holophaga* (até 0.02%) e *Cloacibacterium* (até 0.02%).

A comunidade 1 (dique de efluentes) apesar de apresentar os gêneros em menor proporção, apresenta a diversidade de gêneros das outras duas comunidades, especificamente na amostra A4 (fundo do dique de efluentes). Cabe destacar, que é neste dique onde se realiza diretamente o despejo de todas as águas de processo com os efluentes industriais da Província petrolífera de Urucu (não incluindo as águas de esgotos), é por esta razão a baixa frequência dos gêneros nesta comunidade.

Os gêneros mais predominantes na comunidade 1 (dique de efluentes) são *Geobacter* e *Cloacibacterium*, apresentando ambos frequências menores de 0.12%, seguidos dos gêneros *Geothrix* (até 0.04%), Gp3 (até 0.07%), Gp1 (até 0.06%), *Dehalogenimonas* (até 0.03%), *Anaeromyxobacter* (0.01%) e *Holophaga* (0.01%). Cabe destacar, que o gênero *Holophaga* somente está presente na amostra A4 (fundo do dique) na comunidade 1 (dique efluentes).

Por outra parte, o gênero *Cloacibacterium*, não aparece na comunidade 2 (igarapé natural), somente identificou-se no dique de efluentes com frequência relativa menor 0.12%, e também aparece no igarapé com efluente, com frequência menor de 0.02%. Os gêneros catalogados como "Não Classificados", podem ser visualizados na figura 19.

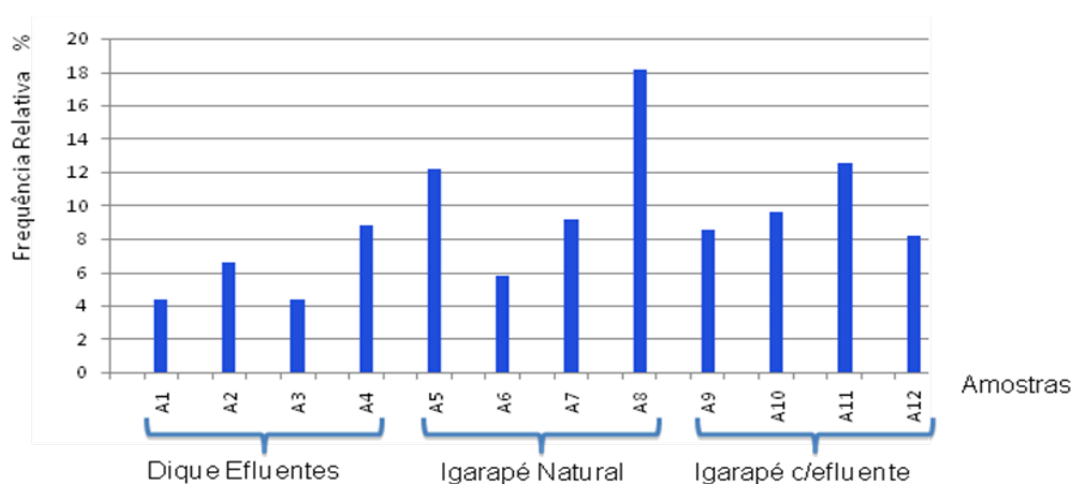


Figura 19. Proporção de gêneros "Não Classificados" na segunda etapa do estudo.

Como pode observar-se, a maior proporção de gêneros ainda não classificados, encontram-se na comunidade do igarapé natural, seguida da comunidade 3, e por último se encontra a comunidade 1 (dique de efluentes) com a menor proporção de gêneros não classificados. A lista completa de todos os gêneros identificados na segunda etapa do estudo, incluindo os "Não Classificados", com os números de sequências em cada amostra, se encontra no apêndice 6.

4.3.5. Árvore filogenética

Considerando que foram geradas milhares de sequências através do software Mothur, e para evitar que a árvore filogenética ficasse lotada de informação, impedindo visualizar algum dado, a elaboração das árvores para cada comunidade foi realizada considerando um ponto de corte mínimo para a matriz distancia, para ter a maior quantidade de filiações na árvore. Posteriormente, se utilizou a plataforma online: [//www.evolugenius.info/evolview](http://www.evolugenius.info/evolview) para gerar uma árvore colorida.

As árvores filogenéticas foram geradas por "tree.shared" e estes arquivos foram visualizadas pelo programa FIGTREE; e o formato gráfico (extensão .png) da árvore foi exportado do programa FIGTREE. O método utilizado para a construção da árvore filogenética foi neighbor joining, que une as filiações que apresentam as sequências mais próximas, a partir da matriz de distância; este procedimento é repetido até que todos os ramos são encontrados.

As figuras 20, 21 e 22 mostram as árvores filogenéticas dos genes 16S rRNA de cada uma das três comunidades analisadas, apresentando uma codificação alfanumérica para os diferentes gêneros presentes em cada comunidade, e um tipo de cor específico para identificar o filo e a classe correspondente ao gênero.

No apêndice 7 pode visualizar-se o detalhe do código alfanumérico e o código de cor que identifica a hierarquia da classificação taxonômica para cada comunidade estudada (Reino, filo, classe, ordem, família e gênero).

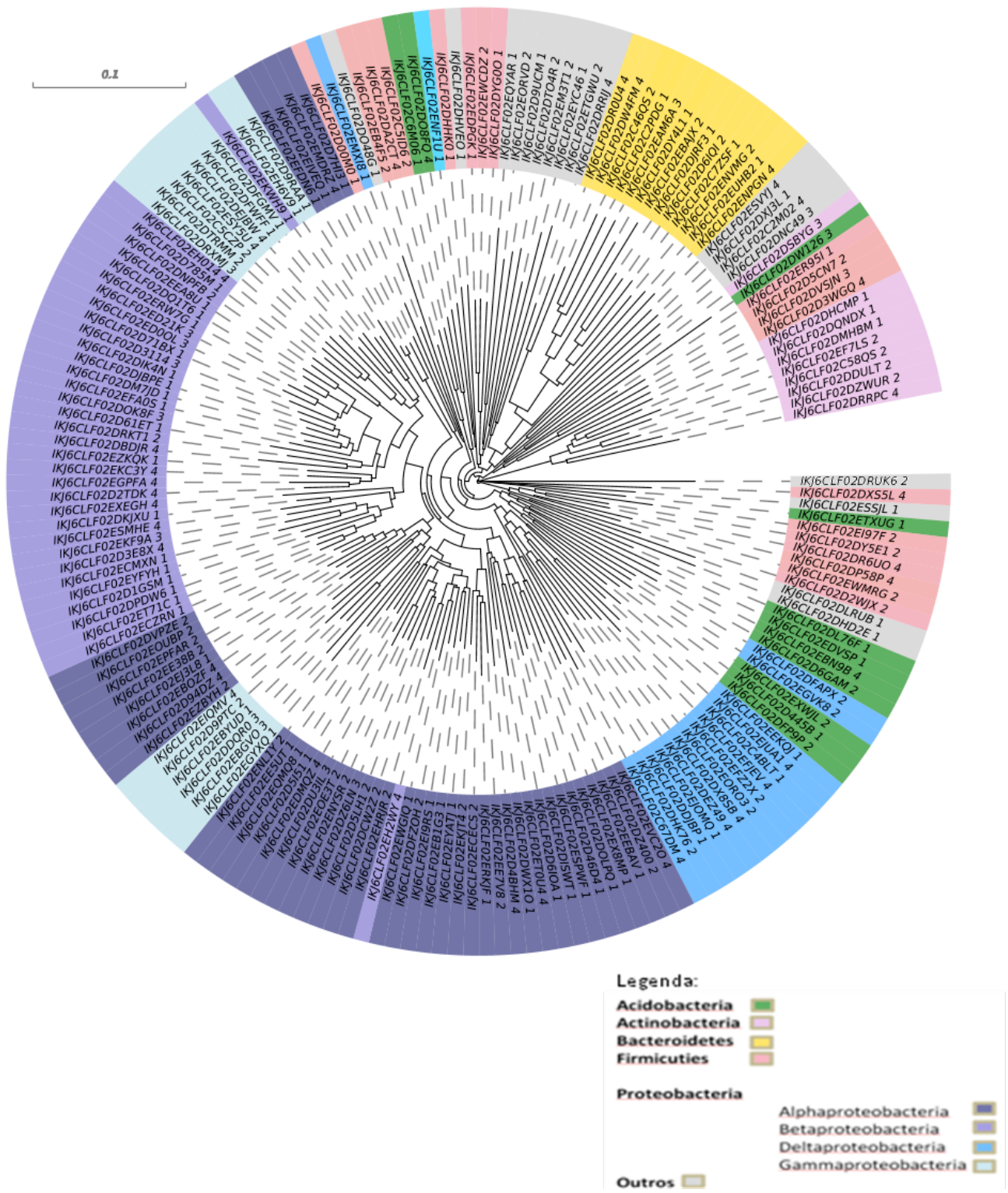


Figura 20. Árvore filogenética dos genes 16S rRNA da comunidade 1 (Dique efluentes) Segunda etapa do estudo, baseado no método *Neighbor-Joining* (Árvore gerada por "tree.shared" visualizada pelo programa FIGTREE).

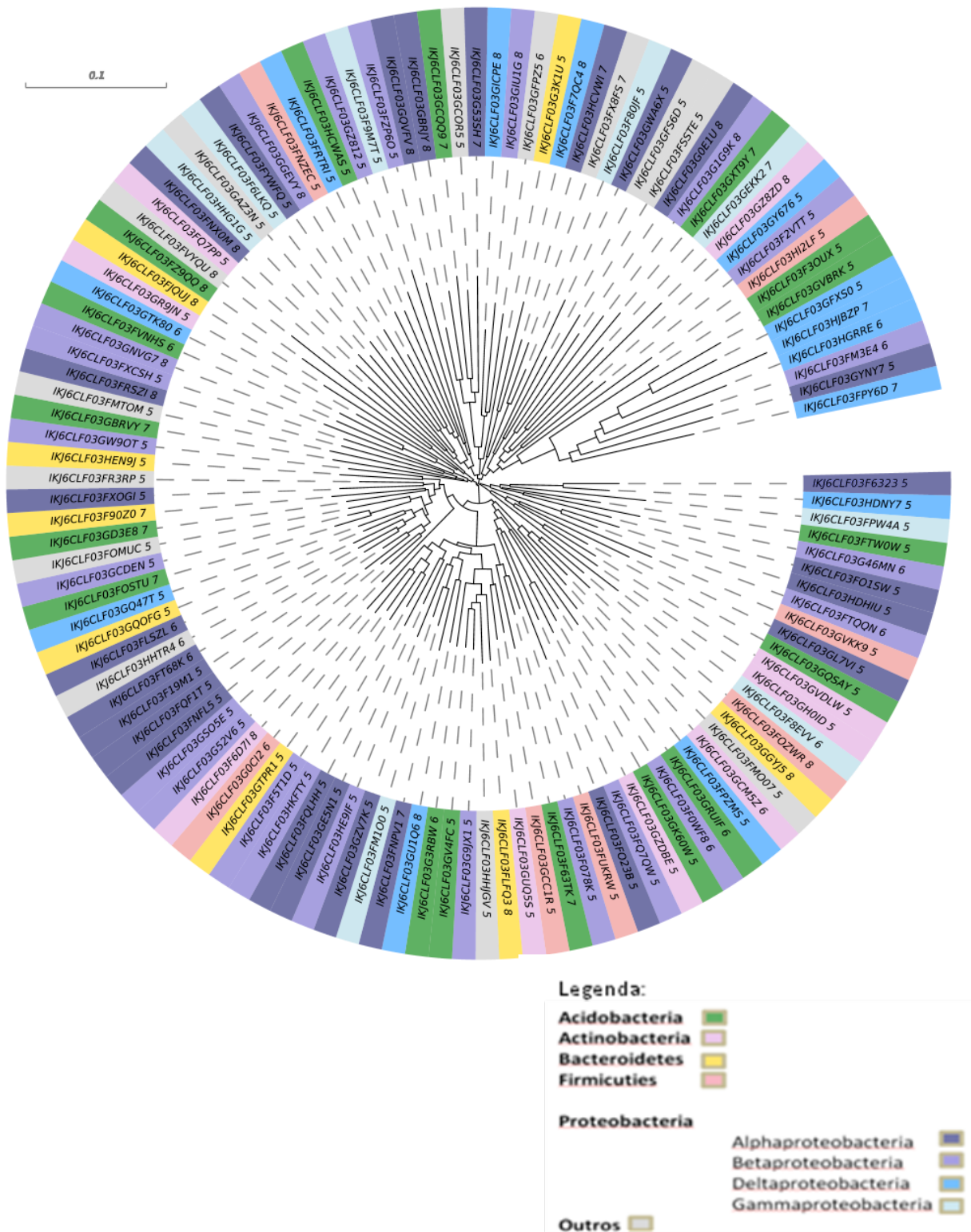


Figura 21. Árvore filogenética dos genes 16S rRNA da Comunidade 2 (Igarapé natural sem nome) Segunda etapa do estudo, baseado no método *Neighbor-Joining* (Árvore gerada por "tree.shared" visualizada pelo programa FIGTREE).

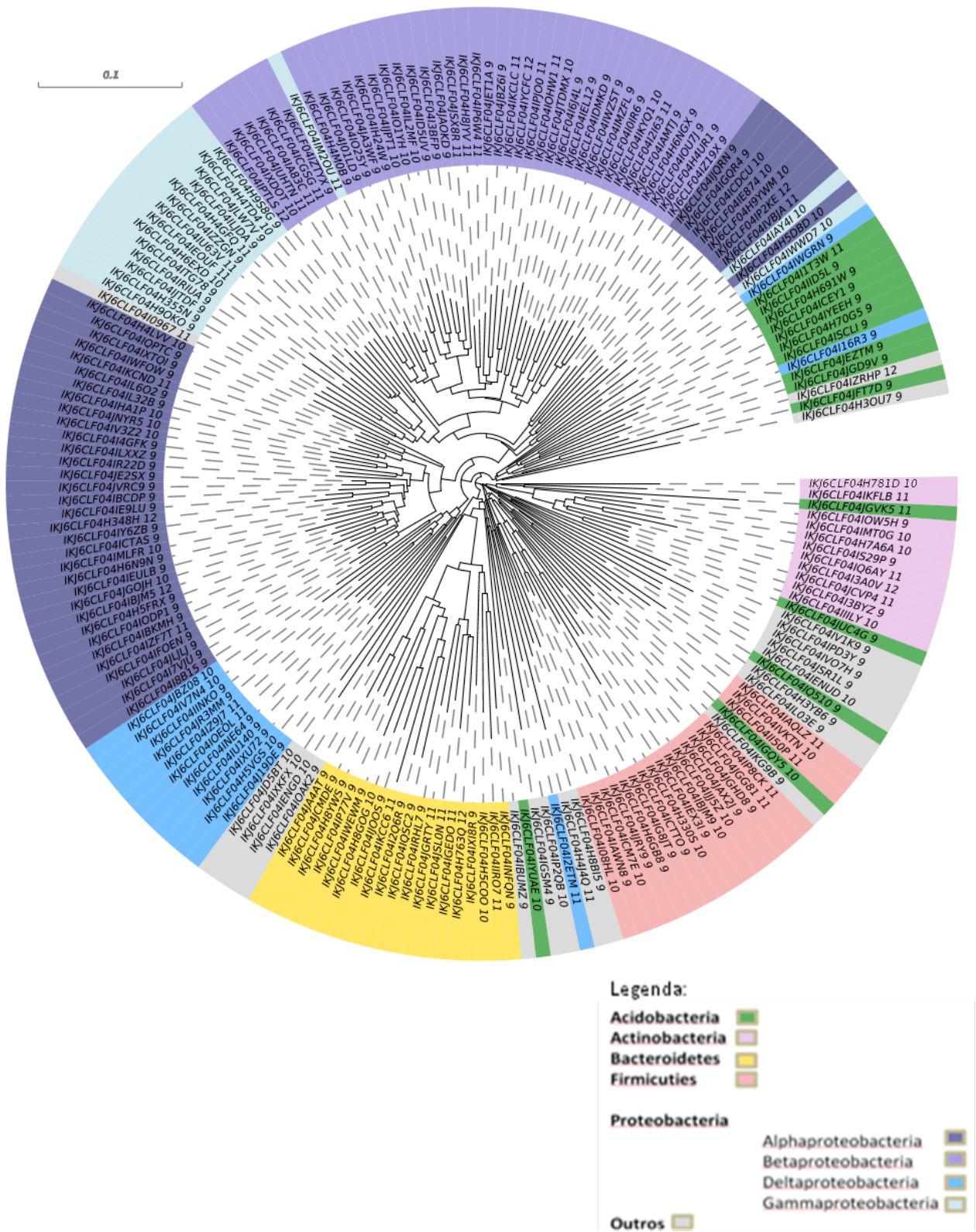


Figura 22. Árvore filogenética dos genes 16S rRNA da Comunidade 3 (Igarapé Natural misturado com efluentes) Segunda etapa do estudo, baseado no método *Neighbor-Joining* (Árvore gerada por "tree.shared" visualizada pelo programa FIGTREE).

Na árvore filogenética da comunidade 1, pode-se visualizar que a maior variedade de gêneros identificados no dique de efluentes, pertencem ao filo *proteobacteria* de classes *alphaproteobacteria* e *betaproteobacteria*, representadas na cor azul e lilás, respectivamente. No entanto, na árvore filogenética da comunidade 2, pode-se visualizar uma diversa variedade de gêneros identificados no igarapé natural, representados por diversas cores, pertencentes aos diversos filios e classes identificadas nesta comunidade. Mais, por outra parte, na árvore filogenética da comunidade 3, pode observar-se que a maior variedade de gêneros identificados no igarapé misturado com efluentes, pertencem ao filo *proteobacteria* de classes *betaproteobacteria* e *alphaproteobacteria*, representadas pelas cores lilás e azul, respectivamente. Assim mesmo, também visualizam-se os filios *bateroidetes* e *firmicutes* representados pela cor a amarelo e rosa obscuro.

4.3.6. Microrganismos biorremediadores

Em todas as etapas deste estudo, foram identificados vários microrganismos catalogados como biorremediadores de ambientes contaminados, relatado por vários autores (ALVAREDO, 2009; CRAPEZ *et al.* 2002; JACQUES *et al.* 2007; MANDRI & LIN 2007; SEO *et al.* 2009; VAN HAMME *et al.*, 2003; ROSSETI ET AL., 2003, XIE *et al.*, 2013; MOE *et al.*, 2009; ALLEM *et al.*, 2006; MOLLER *et al.*, 2013; REICHENBACH e DWORKIN, 1992; KIRCHMAN, 2002).

Do total de gêneros identificados na primeira etapa do estudo, aproximadamente o 13% está caracterizado como degradador de compostos químicos tóxicos, e na segunda etapa do estudo, aproximadamente o 14% dos microrganismos foi relatado como biorremediador. As tabelas 7 e 8 apresentam os principais gêneros relatados como biorremediadores, com as correspondentes sequências antes e depois do despejo de efluentes, as quais tem incremento quando entram em contato com efluentes.

Tabela 7

Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Primeira etapa do estudo)

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências		Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad			Aa	Ad
1	Achromobacter	0	1	23	Geothrix	13	22
2	Acinetobacter	3	4	24	Gordonia	0	2
3	Agrobacterium	3	3	25	Lactobacillus	0	3
4	Alicyclobacillus	2	3	26	Microbacterium	0	1
5	Alistipes	21	52	27	Moraxella	0	1
6	Anaeromyxobacter	96	160	28	Mycobacterium	0	2
7	Azospirillum	8	19	29	Nocardia	11	20
8	Bacillus	1	4	30	Oxalobacter	0	1
9	Bradyrhizobium	3	8	31	Parvibaculum	0	1
10	Burkholderia	1	6	32	Pelobacter	2	5
11	Caulobacter	5	6	33	Pelotomaculum	0	5
12	Chlorobium	2	4	34	Pseudomonas	2	4
13	Clostridium	8	18	35	Ralstonia	2	4
14	Comamonas	1	2	36	Rhizobium	2	3
15	Cupriavidus	5	8	37	Rhodococcus	2	6
16	Dechloromonas	3	4	38	Rhodoferax	0	1
17	Dehalococcoides	6	20	39	Sphingobium	2	2
18	Desulfobacterium	5	21	40	Sphingomonas	0	1
19	Desulfovibrio	3	11	41	Streptomyces	5	9
20	Desulfuromonas	14	32	42	Syntrophus	15	37
21	Flavobacterium	3	3	43	Thermomonas	1	2
22	Geobacter	54	173				

7

Tabela 8

Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Segunda etapa do estudo)

N°	Nome de Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	Achromobacter	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	Acinetobacter	2	1	2	6	0	0	0	0	2	0	2	1
3	Anaeromyxobacter	0	2	2	1	16	12	20	19	13	14	18	13
4	Bacillus	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
5	Beijerinckia	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
6	Brachymonas	1	1	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1
7	Bradyrhizobium	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
8	Brevundimonas	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0

Tabela 8

Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Segunda etapa do estudo)
Continuação...

N°	Nome de Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
9	Burkholderia	1	1	1	1	0	0	0	4	6	2	4	1
10	Clostridium III	1	2	0	5	1	0	1	2	0	0	2	2
11	Comamonas	1	2	1	2	0	1	0	0	2	3	3	2
12	Corynebacterium	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13	Curvibacter	1	0	0	0	2	2	2	2	2	1	2	4
14	Dechloromonas	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	5
15	Dehalogenimonas	1	0	0	5	16	1	0	26	2	2	5	2
16	Desulfobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
17	Desulfomicrobium	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
18	Desulfovibrio	3	9	5	10	0	4	5	3	9	3	6	3
19	Desulfovirga	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
20	Desulfuromonas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
21	Flavobacterium	1	5	2	5	0	0	0	0	8	3	10	2
22	Geobacter	14	18	19	13	98	42	80	76	71	44	86	53
23	Geothrix	1	2	3	6	37	15	21	40	10	6	14	6
24	Gordonia	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Holophaga	0	0	0	1	17	6	21	13	2	0	2	3
26	Magnetospirillum	3	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	1
27	Mycobacterium	2	5	4	6	1	2	0	1	2	5	2	1
28	Ochrobactrum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
29	Paracoccus	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
30	Pelobacter	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Polaromonas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Pseudomonas	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1
33	Ralstonia	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
34	Rhizobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
35	Rhodopseudomonas	2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	2
36	Sarcina	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
37	Sediminibacterium	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0	2	1
38	Sphingobium	0	3	4	2	0	0	0	0	2	1	0	1
39	Sphingomonas	0	2	1	2	0	0	1	1	1	2	2	0
40	Spirillum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
41	Stenotrophomonas	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0

Tabela 8

Microrganismos catalogados como Biorremediadores (Segunda etapa do estudo)
Continuação...

N°	Nome de Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
42	Streptomyces	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
43	Syntrophomonas	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0
44	Syntrophus	3	2	2	4	3	0	2	4	0	2	3	3
45	Thauera	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2	2	3
46	Thermomonas	1	3	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0
47	Variovorax	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

4.4. RIQUEZA E DIVERSIDADE. ESTATÍSTICA

4.4.1. Distribuição de OTU's entre as amostras

Depois de aplicar todos os critérios estabelecidos no software Mothur (SCHLOSS, 2009) para a filtragem por baixa qualidade e remoção de contaminantes das sequências totais obtidas no pirosequenciamento, um dos resultados obtidos é o agrupamento de conjuntos de espécies ou gêneros semelhantes, denominadas unidades taxonômicas operacionais (UTO's). Na tabela 9 encontram-se a distribuição de OTU's entre as amostras da primeira etapa do estudo.

Tabela 9

Distribuição de OTU's primeira etapa do estudo

N°	Nome da Amostra	Código Amostra	N° Seq. Inicial	N° Seq. Final	No. OTU's
1	Igarapé antes efluente	Aa	28104	4418	2050
2	Igarapé depois efluente	Ad	43803	8123	3613

Pode-se observar que o número de agrupamento de gêneros (OTU's) na primeira etapa do estudo, é maior para o igarapé misturado com efluente (Ad), ou seja, que além de maior

quantidade de sequências, também existe uma quantidade maior de tipos diferentes de gêneros nesta amostra.

Na tabela 10 encontram-se a distribuição de OTU's entre as amostras da segunda etapa do estudo.

Tabela 10

Distribuição de OTU's segunda etapa do estudo

Nº Comunidade	Nome da Comunidade	Código Amostra	Nº. Seq. Inicial	Nº. Seq. Final	Nº OTU's
1	Dique Efluentes	A1	15819	12000	906
		A2	22633	16000	1322
		A3	16548	13000	923
		A4	26641	16000	1788
2	Igarapé Natural	A5	15762	10000	2578
		A6	6969	4000	1109
		A7	18652	13000	1980
		A8	36392	25000	3709
3	Igarapé c/ Efluentes	A9	28664	22000	1778
		A10	23056	15000	1895
		A11	27311	21000	2626
		A12	16796	12000	1634

Em geral, o número de agrupamento de gêneros (OTU's) é maior para a comunidade 2 (Igarapé natural), apesar de apresentar o menor número de sequências, seguido da comunidade 3 (Igarapé misturado com efluente), ficando a comunidade 1 (Dique de efluentes) com o menor número de OTU's.

4.4.2. Diagramas de Venn

Outro dos resultados obtidos depois de aplicar todos os critérios do software Mothur (SCHLOSS, 2009), é o diagrama de Venn que representa graficamente o agrupamento dos conjuntos de espécies ou gêneros semelhantes (UTO's) para cada amostra e as comuns compartilhadas em ambos casos. Para esta análise é considerado o nível de 97% de similaridade para observar o comportamento das OTU's. Na figura 23, pode-se observar o diagrama de Venn para a primeira etapa do estudo (97% de similaridade).

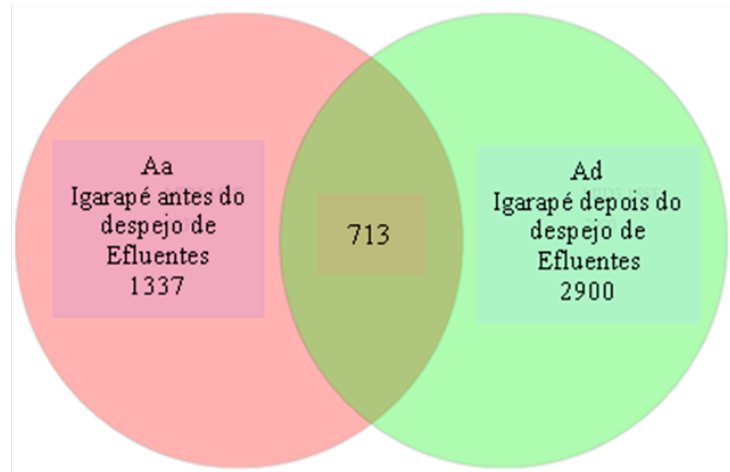


Figura 23. Diagramas de Venn primeira etapa do estudo (97% similaridade).

Na primeira etapa do estudo obteve-se um total de 4950 OTU's, distribuídas da seguinte forma: 2050 OTU's totais na Amostra Aa (antes do despejo de efluentes) e 3613 totais na Amostra Ad (depois do efluente), compartilhando 14.4% das OTU's.

Para visualizar os resultados da distribuição das OTU's na segunda etapa do estudo, na figura 24 pode-se observar o diagrama de Venn para a comunidade 1, considerando a interrelação entre as quatro amostras analisadas (Dique de efluentes).

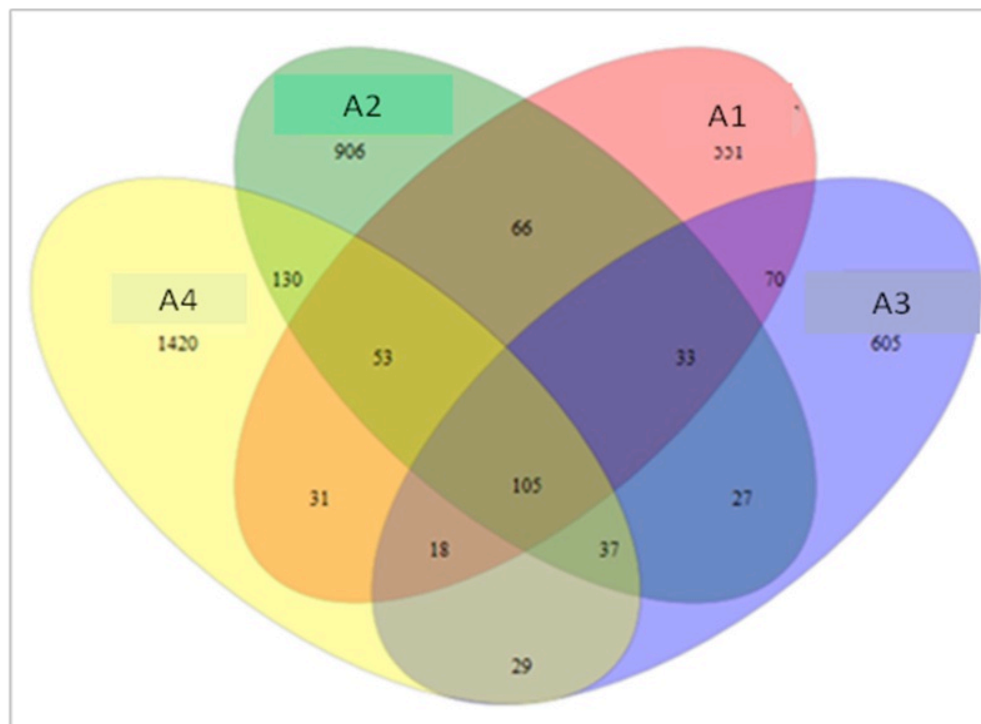


Figura 24. Diagrama de Venn comunidade 1 (Dique de Efluentes) segunda etapa do estudo.

Cabe ressaltar que na amostra A4 (Fundo do dique de efluentes) obtive-se o maior número nas unidades taxonômicas operacionais (1420) e que, a pesar de ser uma mesma comunidade, nos quatro pontos de coleta de amostras, se tem gêneros diferentes em cada amostra, além dos comuns entre elas.

A figura 25 apresenta o diagrama de Venn da comunidade 2 (Igarapé Natural) segunda etapa.

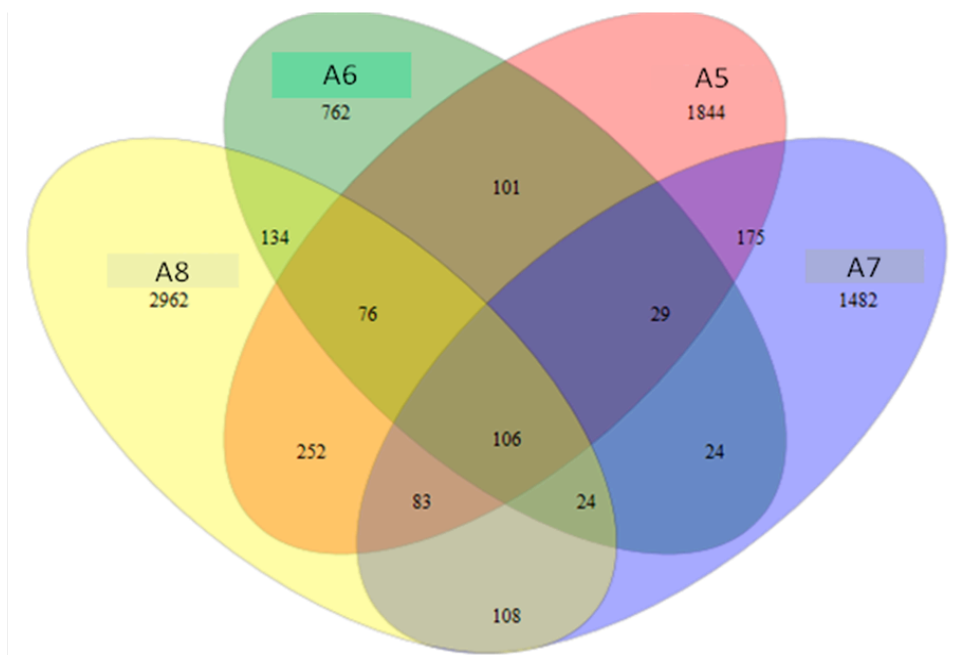


Figura 25. Diagrama de Venn comunidade 2 (Igarapé Natural) segunda etapa do estudo.

A amostra A8 apresenta o maior número nas unidades taxonômicas operacionais (2962) seguida da amostra A5 (1844), a pesar de ser a mesma comunidade do igarapé natural, os quatro pontos amostrados têm gêneros diferentes em cada amostra, além dos comuns entre elas. Entre as quatro amostras obteve-se 106 OTU's comuns.

A visualização dos resultados da distribuição das OTU's no diagrama de Venn para a comunidade 3 (Igarapé com efluentes), pode-se observar na figura 26.



Figura 26. Diagrama de Venn comunidade 3 (Igarapé com efluentes) segunda etapa do estudo.

No caso do igarapé natural, a amostra A11 é a que apresentou maior número de OTU's, seguida da amostra A10, e entre a interseção das quatro amostras obteve-se 202 OTU's.

A figura 27 representa o diagrama de Venn com a visualização global das três comunidades.

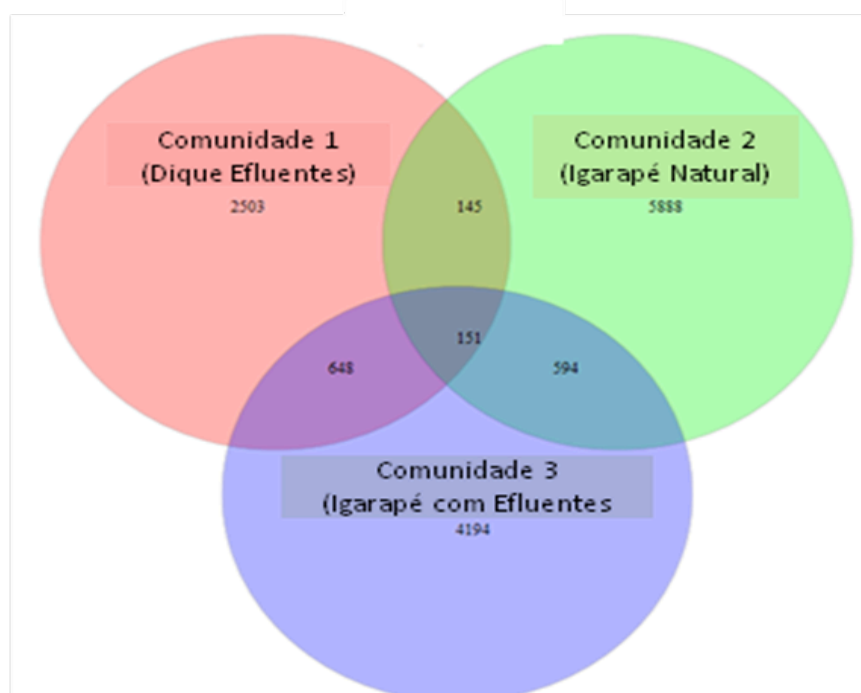


Figura 27. Diagrama de Venn global das três comunidades da segunda etapa do estudo.

A comunidade 2 (igarapé natural) a que possui maior número de unidades taxonômicas operacionais (6911), seguida do igarapé misturado com efluentes, que sofre uma diminuição de aproximadamente 33% neste número (4607), porém este valor é maior em 63% com relação à comunidade 1 do dique de efluentes. O número de OTU's compartilhada entre as três comunidades é de 256.

Outro aspecto que cabe ressaltar, são as OTU's dos grupos de gêneros "Não Classificados", os quais podem-se visualizar na figura 28.

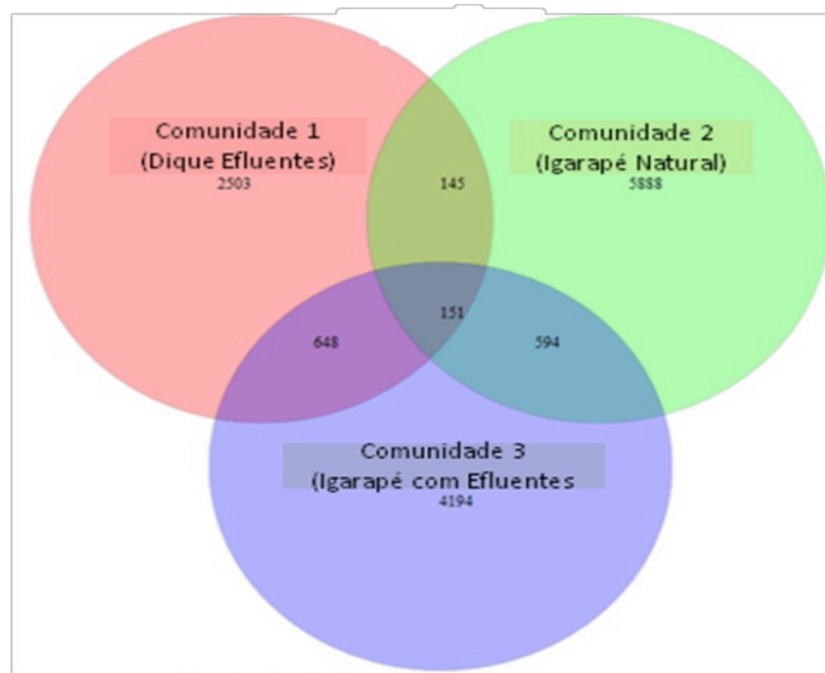


Figura 28. Diagrama de Venn grupos de gêneros "Não Classificadas" na segunda etapa do estudo.

A comunidade do igarapé natural possui o maior número OTU's (5888) de gêneros "Não Classificados", seguido do igarapé misturado com efluentes (4194), por último se encontra o dique de efluentes com a menor quantidade de gêneros "Não Classificados" (2503), possuindo também o maior número de gêneros em comum com a comunidade 3 (648), com relação às OTU's compartilhadas entre as três comunidades obteve-se um total de 151.

4.4.3. Curvas de rarefação

Na figura 29 pode-se visualizar os resultados gerados pelo software Mothur, das curvas de rarefação para a primeira etapa do estudo, considerando os níveis de similaridade de 100% e 97%.

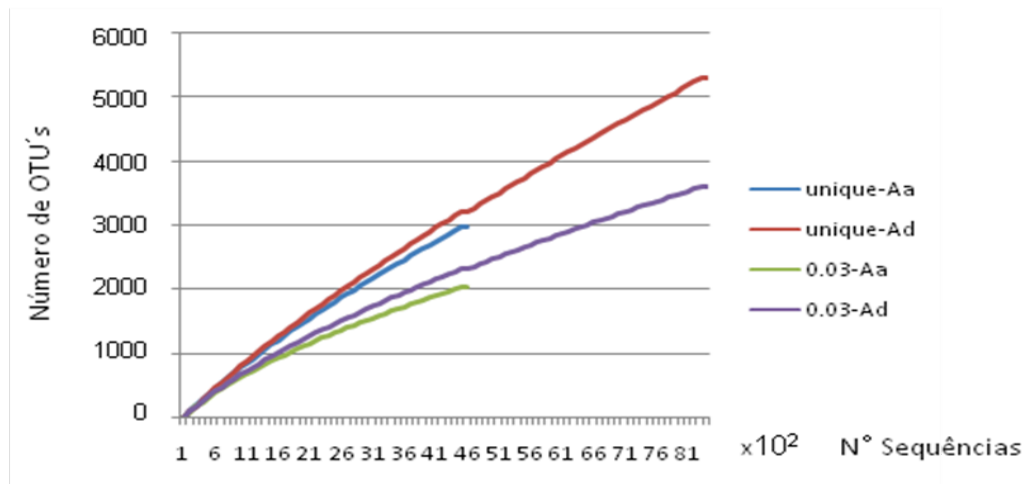


Figura 29. Curvas de Rarefação para a primeira etapa do estudo (97% Similaridade).

Na figura 30 pode observar-se as curvas de rarefação para os níveis de 100% e 97% de similaridade nas três comunidades analisadas na segunda etapa do estudo.

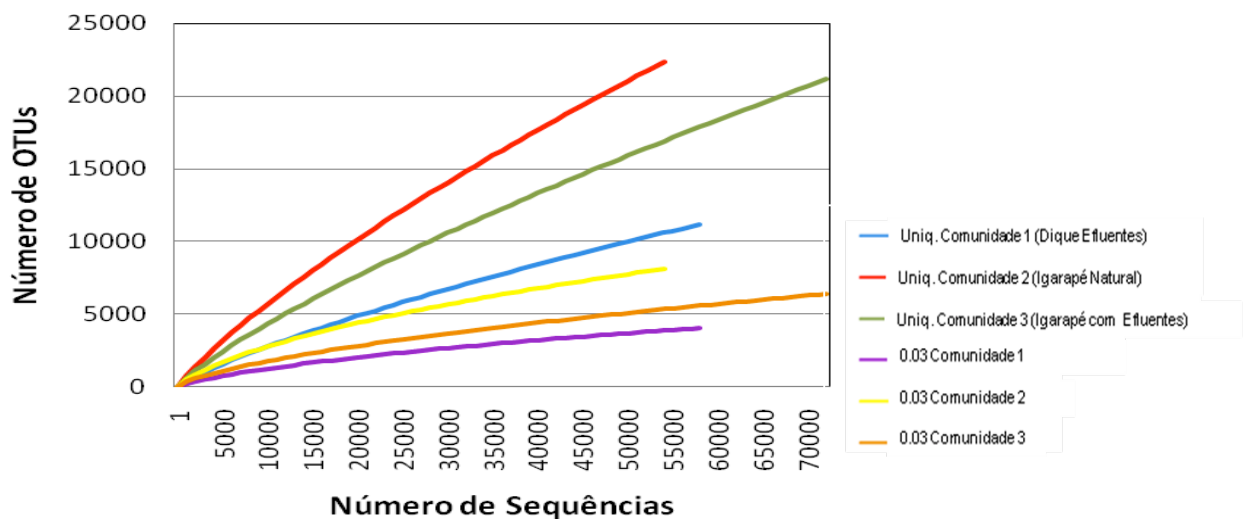


Figura 30. Curvas de rarefação para dois níveis de similaridade nas três comunidades da segunda etapa do estudo

No caso da primeira etapa do estudo, pode observar-se que as tendências das curvas não indicam estabilização nas sequências em nenhum dos níveis considerados de similaridade (100% e 97%). Porém, a amostra Ad (Depois da mistura com efluente), apresenta um número maior de OTUs em ambos níveis de similaridade especificados, indicando uma maior riqueza de espécies para esta área.

Na segunda etapa do estudo, as curvas ao 97% de similaridade, apresentam tendência de estabilização próxima, indicando uma boa amostragem realizada. Especificamente a

comunidade 2 (Igarapé natural), é a que tem o valor maior de OTU's, indicando uma maior riqueza de espécies nesta comunidade, seguida da comunidade 3 (Igarapé com efluentes).

4.4.4. Índices de riqueza e diversidade

A estimativa da riqueza e da diversidade foram analisadas mediante aplicação do software Mothur (SCHLOSS, 2009), que considera os índices de Chao e Ace para a estimativa de riqueza, e para estimar a diversidade, utiliza os índices de Shanon e Simpson. Na tabela 11, apresentam-se os índices de riqueza e diversidade para a primeira etapa do estudo, considerando um 97% de similaridade.

Tabela 11

Índices de Riqueza e Diversidade primeira etapa do estudo (97% Similaridade)

Nº	Nome da Comunidade	Código Amostra	No. UTO's	Índices de Riqueza		Índices de Diversidade	
				Chao	Ace	Shannon	Simpson
1	Igarapé natural	Aa	2050	5807	9909	7.03	0.002
2	Igarapé c/efluente	Ad	3613	10329	18208	7.51	0.001

Para a amostra Ad (depois do despejo de efluentes), o índice de riqueza Chao, gerou o valor de 10329, o qual é maior com relação ao mesmo índice da amostra Aa (antes do despejo de efluentes), que resultou no valor de 5807(56% de Ad). Por outra parte, o índice Ace, também de estimativa de riqueza, tem o mesmo comportamento, para o tratamento Ad resultou o valor de 18208, e para o tratamento Aa, resultou 9909 (54% de Ad). Segundo este resultado a riqueza de gêneros na primeira etapa do estudo, é maior na comunidade do igarapé depois da mistura com efluentes.

A diversidade na primeira etapa do estudo, segundo o índice de Shanon (7.51) obtido na amostra Ad (depois do despejo de efluentes), é maior com relação ao mesmo índice (7.03) no tratamento Aa (antes do despejo de efluentes), o que indica que existe uma maior diversidade no igarapé depois do despejo de efluentes. Porém, o índice Simpson, é maior na amostra Aa (0.002) e menor na Ad (0.001) aproximandose a zero, o que indica uma maior dominância de espécies no igarapé depois do despejo de efluentes.

Para a segunda etapa do estudo, os dados sobre os índices de riqueza e diversidade, encontram-se na tabela 12.

Tabela 12

Índices de Riqueza e Diversidade segunda etapa do estudo (97% Similaridade)

Nº	Nome da Comunidade	Código Amostra	Nº Seq. Finais	No. UTO's	Índices de Riqueza		Índices de Diversidade	
					Chao	Ace	Shannon	Simpson
1	Dique Efluentes	A1	12000	906	2364	3743	2,88	0,242
		A2	16000	1322	3354	5149	3,25	0,247
		A3	13000	923	1884	3145	3,10	0,174
		A4	16000	1788	3799	5494	4,56	0,051
2	Igarapé Natural	A5	10000	2578	6169	9829	6,62	0,005
		A6	4000	1109	3051	4823	5,52	0,025
		A7	13000	1980	4353	6636	5,67	0,016
		A8	25000	3709	7996	12083	6,01	0,012
3	Igarapé c/ Efluentes	A9	22000	1778	4390	7991	3,02	0,363
		A10	15000	1895	4760	7654	5,44	0,020
		A11	21000	2626	5975	9407	5,20	0,057
		A12	12000	1634	3790	6293	4,83	0,083

Com a finalidade de observar o comportamento dos diferentes índices de riqueza e diversidade na segunda etapa do estudo, na figura 31 podem-se visualizar os índices de riqueza Chao e Ace nas amostras das três comunidades de estudo.

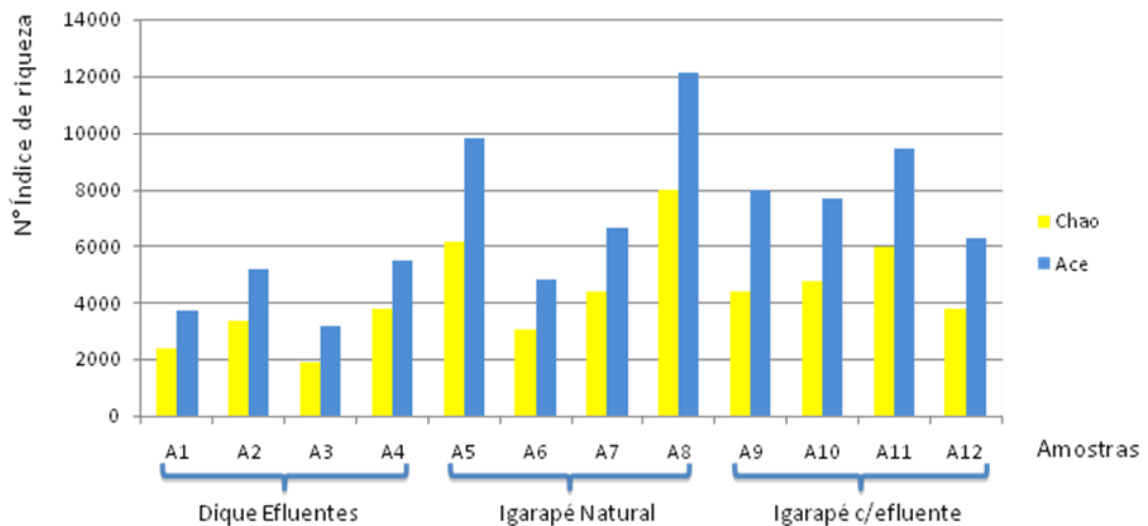


Figura 31. Índices de riqueza Chao e Ace para segunda etapa do estudo.

Com relação aos índices de riqueza de Chao e Ace, alguns valores apresentam diminuição, entanto outros apresentam incremento entre as comunidades 2 e 3. Mas a comunidade que apresenta menores valores nos índices de riqueza é o dique de efluentes.

Nas figuras 32 e 33 pode-se observar o comportamento dos índices de diversidade Shannon e Simpson nas amostras das três comunidades de estudo.

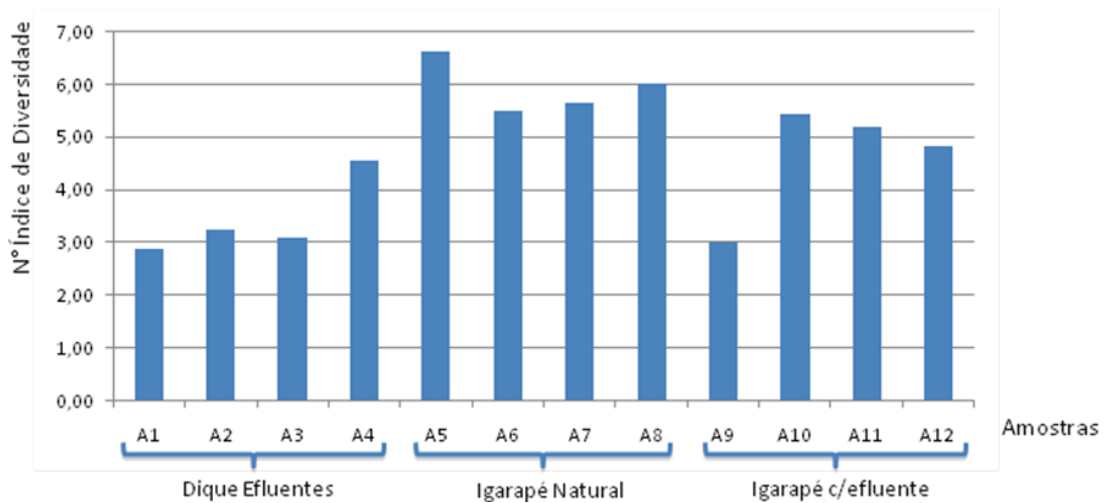


Figura 32. Índice de Diversidade de Shannon segunda etapa do estudo

A diversidade considerando o índice de Shannon, indica que o igarapé natural possui uma maior diversidade, seguida da comunidade do igarapé misturado com efluente com uma diminuição de 18% nas amostras de maior número no índice.

Com relação ao índice de Simpson, os resultados obtidos na segunda etapa do estudo podem-se observar na figura 33.

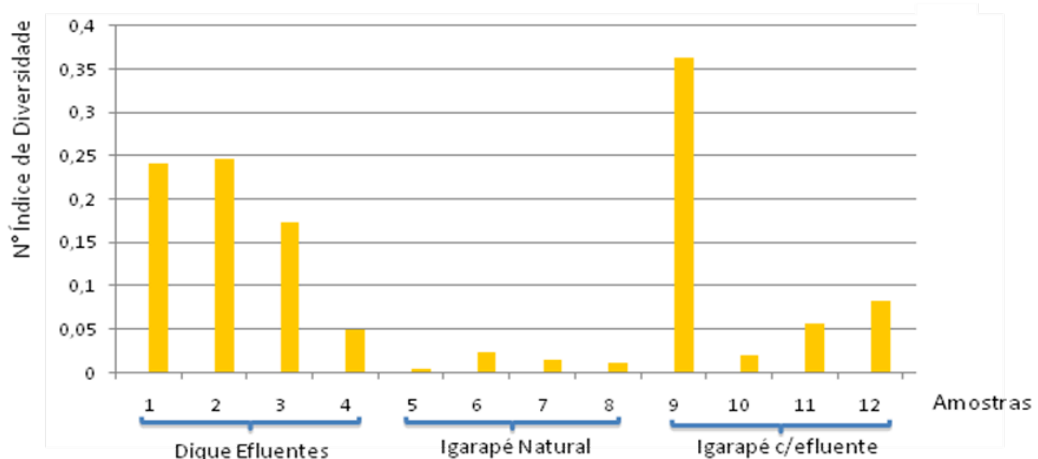


Figura 33. Índice de Diversidade de Simpson segunda etapa do estudo

O índice de Simpson mede a Dominância dentro de uma Comunidade. Uma característica de Simpson é a sua sensibilidade às mudanças nas espécies abundantes; mede a variação das espécies mais abundantes por alguma perturbação. Os valores da diversidade são maiores na comunidade 1(Dique de Efluentes), seguido da comunidade 3 (Igarapé com efluentes), e os

valores menores que mas se aproximam a zero, indicam maior dominância de espécies no igarapé natural (ÑIQUE, 2010).

4.4.5. Estatística

O resultado da análise AMOVA gerada do programa Mothur, encontra-se na tabela 13.

Tabela 13

Resultado Análise AMOVA (Programa Mothur)

Variação	AMOVA		
	Entre os grupos	Dentro dos grupos	Total
Comunidade 1 vs. Comunidade 2 vs. Comunidade 3			
SS	27.423	181.087	455.317
df	2	9	11
MS	137.115	0.201208	
Fs:	681.459		
p-value: <0.001*			
Comunidade 1 vs. Comunidade 2			
SS	12.894	141.726	270.666
df	1	6	7
MS	12.894	0.236209	
Fs:	545.873		
p-value: 0.016*			
Comunidade 1 vs. Comunidade 3			
SS	154.836	0.819473	236.783
df	1	6	7
MS	154.836	0.136579	
Fs:	113.368		
p-value: 0.029			
Comunidade 2 vs. Comunidade 3			
SS	127.569	138.502	26.607
df	1	6	7
MS	127.569	0.230836	
Fs:	552.637		
p-value: 0.023			

LEGENDA:

- SS: Soma dos quadrados entre as comunidades
- df: Graus de liberdade
- MS: Quadrado médio entre as comunidades
- Fs: Valor de F para $\alpha=0.01$
- P_{value} : Probabilidade

Como pode observar-se na comparação global das três comunidades, o resultado reflete que pelo menos uma das três comunidades apresenta uma diferença significativa, com relação às demais (p-value: $<0.001^*$). E na comparação entre uma comunidade e outra, o resultado apresenta que não existe diferença significativa entre a comunidade 2 (Igarapé natural) e a comunidade 3 (Igarapé misturado com efluente). Somente existe uma diferença significativa entre a comunidade 1 (Dique de efluentes) e entre a comunidade 2 (Igarapé natural) (p-value: 0.016^*).

Por outra parte, a análise de Libshuff (Mothur) procura avaliar se as comunidades (bibliotecas) analisadas possuem a mesma estrutura genética (SCHLOSS, 2009). Os resultados gerados do software Mothur na segunda etapa do estudo, se obtiveram os resultados mostrados nas tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14

Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 1 (Programa Mothur)

Comparação entre Amostras (dCXYScore)	Probabilidade P (Significancia 10%)
A1-A2	0.037
A2-A1	0.037
A1-A3	0.045
A3-A1	0.045
A1-A4	0.759
A4-A1	0.759
A2-A3	0.114
A3-A2	0.114
A2-A4	0.827
A4-A2	0.827
A3-A4	0.651
A4-A3	0.651

Tabela 15

Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 2 (Programa Mothur)

Comparação entre Amostras (dCXYScore)	Probabilidade P (Significancia 10%)
A5-A6	0.712
A6-A5	0.712
A5-A7	0.849
A7-A5	0.849
A5-A8	0.790
A8-A5	0.790
A6-A7	0.888
A7-A6	0.888
A6-A8	0.768
A8-A6	0.768
A7-A8	0.854
A8-A7	0.854

Tabela 16

Resultado Análise LIBSHUFF Comunidade 2 (Programa Mothur)

Comparação entre Amostras (dCXYScore)	Probabilidade P (Significancia 10%)
A9-A10	0.798
A10-A9	0.798
A9-A11	0.520
A11-A9	0.520
A9-A12	0.390
A12-A9	0.390
A10-A11	0.437
A11-A10	0.437
A10-A12	0.551
A12-A10	0.551
A11-A12	0.130
A12-A11	0.130

Nenhuma das bibliotecas foram significativamente diferentes entre si nas duas comparações, mostrando valores de $P > 0,008$ (Valor de P calculado após a correção de Bonferroni, $P = \text{Significancia}/\text{número de comparações}$, $P = 0,1/12$).

5 DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CROMATOGRAFIA

Na primeira etapa do estudo, todos os valores dos parâmetros foram os mesmos para as duas amostras analisadas, este fato pode indicar que o despejo de efluentes não influencia a qualidade do corpo de água, com relação aos parâmetros considerados.

A temperatura medida nas duas etapas do estudo varia entre 25-31°C, e segundo Sousa (2008) a temperatura no rio Urucu tem um menor valor (26,0 °C) registrado no período de enchente, e o maior valor (32,4 °C) foi registrado no período de seca. O fato de obter 26°C num período de seca, é devido ao fato que este igarapé é de largura pequena (máximo 2 metros) e está coberto em grande parte pela floresta, o qual impede a entrada direta da luz solar.

Segundo Lapinskas (1989), o pH afeta principalmente a microbiota, valores fora da faixa entre 5-8 podem inativar certas enzimas essenciais à sobrevivência das bactérias. O pH medido na primeira etapa do estudo foi de 7.1, e na segunda etapa variou entre 5-6, este resultado se encontra dentro do valor obtido por Sousa (2008), que foi de pH=7.05, medido no rio Urucu num período hidrológico de seca, quem considera que a pesar de que a matéria orgânica tende a acidificar a água, a geologia e os sedimentos em suspensão contribuem para manter o pH próximo a neutralidade.

Por outra parte, Costa (2009) mediu uma média do pH=6.4 durante o período hidrológico de seca no rio Urucu. De igual modo, no estudo da hidroquímica do rio Solimões realizada por Queiroz *et al* (2009), o pH dos afluentes do Solimões encontra-se no intervalo de 5,9-7,2, assemelhando-se ao de águas brancas (O rio Urucu é afluente do rio Solimões). A maior parte das áreas de pontos amostrados, é coberta por floresta, o qual propicia a abundância de material suspenso na água, favorecendo o processo de reciclagem de nutrientes no corpo de água (BRANCO, 1986; MATHEUS *et al.*, 1995).

Com relação à condutividade elétrica, o valor obtido em ambas etapas variou entre 0-0.3 µS/cm, este valor é baixo em comparação com os valores obtidos na medição nas águas pretas dos afluentes dos rios Solimões (35.3µS/cm), realizada por Queiroz *et al* (2009). Porém, nesse mesmo estudo, igarapés de águas pretas afluentes do rio Purus, foram menos condutivas (<0.02 µS/cm). Este fato pode indicar que menos sólidos dissolvidos são adicionados nos corpos de água analisados, e que estes tipos de igarapés possuem características mínimas de corrosividade na água (CETESB, 2007). Cabe destacar, que o

igarapé natural na segunda etapa apresentou $CE=0$, indicando a inexistência de sal neste corpo de água.

Com relação à avaliação da cromatografia, não foi detectado algum tipo de hidrocarboneto nas amostras coletadas na segunda etapa do estudo. Costa (2009), concluiu que não foram encontrados níveis significativos de hidrocarbonetos alifáticos que indiquem contaminação de fonte petrogênica, no estudo desenvolvido para determinar hidrocarbonetos alifáticos presentes no rio Urucu (desembocadura do igarapé da onça que arrasta o despejo de efluentes da Província petrolífera de Urucu), a fim de avaliar o possível impacto proveniente das áreas portuárias da BOGPM sobre as assembléias de peixes encontradas no rio Urucu.

Por outra parte, no trabalho desenvolvido por Oliveira (2007), para analisar as fontes e níveis de hidrocarbonetos em sedimentos, no rio Solimões (desembocadura do rio Urucu) e lagos entre os municípios de Coari e Manaus, obtiveram-se concentrações muito baixas, para a distribuição de hidrocarbonetos individuais. Assim mesmo, foi realizada uma caracterização de hidrocarbonetos em sedimentos na Amazônia de Brasil (BERD, et al., 2013), determinando que os valores dos hidrocarbonetos alifáticos totais (HAT) e a distribuição dos n-alcenos, indicaram uma forte contribuição biogênica que confirmam a contribuição bacteriana para a matéria orgânica.

5.2. FILOGENÉTICA

Os 33.3% dos filos identificados na primeira etapa do estudo, foram identificados no Rio Negro, e o 41% dos filos identificados na segunda etapa do estudo, foram classificados também no rio Negro (NEVES, 2013). O filo de maior proporção identificado tanto na primeira etapa do estudo, como na segunda etapa do estudo, foi o filo *Proteobacteria* (<35% e <10% respectivamente). Este filo é característico da água (Griego *Proteus*, Deus do mar) e representa o grupo filogenético mais extenso e com maior diversidade fisiológica do domínio Bactéria (GARRITY et al., 2005). Este filo se divide em cinco grupos com intervalo de classes: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*.

Na primeira etapa do estudo, o filo *Proteobacteria* está representado pela classe *Deltaproteobacteria* em maior proporção, seguida das classes *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria*. Na segunda etapa do estudo, a classe predominante é "Não classificada", depois segue a classe *Deltaproteobacteria* com a maior

proporção em todas as comunidades, seguida das classes *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, respectivamente.

Em recente estudo realizado por Neves (2013), analisando a diversidade microbiana presente no Rio Negro (Períodos seca e vazante), mediante técnica de pirosequenciamento 454, identificou como filo mais predominante (81%) o filo *Proteobacteria*, seguido dos filios *Bacteroidetes* (10%) e *Actinobacteria* (7%). Igualmente no estudo da diversidade microbiana aquática em rios e lagos da região amazônica (Pirosequenciamento 454), realizado por Toyama (2012), o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante, representado pelas classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, devido à sua abundância nos ambientes; além da presença predominante do filo *Actinobacteria* (18%) em todas as amostras de rios e lagos da Amazônia, o qual é característico de água doce (ZWART et al., 2002).

Por outro lado, Lucena (2012) no estudo da biodiversidade marinha da costa da cidade de Valência, Espanha (microrganismos cultiváveis), obteve o 91% dos filios classificados como *Proteobacteria* (Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA), com as classes *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* como as mais predominantes. Neste mesmo contexto, Rodrigues (2011), estudou a diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestre e marinhos em vários países de América Latina, incluindo o estuário do rio Amazonas e a Bahia Guanabara no Brasil (Pirosequenciamento 454), no qual obteve o filo *Proteobacteria* em maior proporção, especificamente na classe *Gammaproteobacteria* (Bahia Guanabara) e *Alphaproteobacteria* (Estuário rio Amazonas).

Outro estudo, realizado por Peixoto (2011), para analisar a diversidade bacteriana nos rios Negro e Solimões (abordagem metagenômica), obteve o filo *Proteobacteria* como mais abundante nos dois ambientes estudados, sendo a classe *Betaproteobacteria* a mais predominante no rio Negro e a classe *Betaproteobacteria* foi a mais predominante no rio Solimões, seguida da classe *Gammaproteobacteria* respectivamente.

Na segunda etapa do estudo e na primeira etapa do estudo, além do filo *Proteobacteria* (<11%), com suas correspondentes classes, o filo *Acidobacteria* também apresenta uma média (<3%). Este último filo é abundante em amostras de solo e parece ser pouco estudado em ambientes de água doce (ZWART et al., 2002), provavelmente este resultado esteja influenciado pelo fato de ter coletado somente sedimento dos igarapés para a primeira etapa do estudo, e por ser o garapé natural de uma área muito maior na segunda etapa do estudo, que implica enriquecimento de nutrientes por microrganismos de solo durante o período de cheia. Por esta razão, Cannavan (2007), obteve como filo predominante o *Acidobacteria*

(32%) na análise das comunidades bacterianas em solos da região Amazônica Central e Oriental (Brasil); e os estudos realizados por Neves (2013) e Toyama (2012), obtiveram uma proporção mínima do filo *Acidobacteria*.

Com relação ao filo *Bacteroidetes*, também predominantes nas duas etapas deste estudo, foram identificadas em segundo lugar de predominância (10%) no rio Negro (NEVES, 2012), e na análise da diversidade marinha realizada por Lucena (2012) em proporção de 21%. Assim mesmo, Toyama (2012), identificou este filo em proporção significativa (Até 12%) na comunidade aquática amazônica; e Xing et al. (2009) teve uma grande predominância do filo *Bacteroidetes*, na análise de lagos oligotróficos de água doce e salgada.

O filo *Spirochaetes*, foi identificado em mínima proporção em ambas etapas deste estudo (< 4% na primeira etapa do estudo e <1% na segunda etapa do estudo). Este filo é de vida livre, encontrado em ambientes aquáticos, com metabolismo anaeróbico e aeróbico facultativo (CANHOS et al., 1997). No rio Negro foi identificado com uma proporção menor de 0.007% (NEVES, 2013).

O filo *Nitrospira* identificado na primeira etapa do estudo em frequência menor de 4%, representa um grupo de bactérias atuantes no ciclo de nitrogênio em ambientes aquáticos (Também em solos), através da oxidação de nitrato (GU et al., 2004; DUNBAR et al., 1999). Este filo foi identificado no rio Negro em proporção menor de 0.04% (NEVES, 2013), e em solos da Amazônia (<3%) (CANNAVAN, 2007).

Por outra parte, na segunda etapa do estudo, depois do filo *Proteobacteria* (<0.6%), seguem os filios "não classificados", que estão em segundo lugar de proporção em todas as comunidades analisadas, especialmente na comunidade 2 (Igarapé natural), o que indica que existe uma grande diversidade de novos táxons presentes nas áreas das comunidades de estudo à espera de ser formalmente descritos.

Na primeira etapa do estudo, o 30% dos gêneros identificados, foram caracterizados também no rio Negro (NEVES, 2013). Entre os gêneros identificados na primeira etapa do estudo com maior proporção são os "Não Classificados" (30%), especificamente na comunidade do igarapé misturado com efluentes (Ad), seguido do gênero *Candidatus Solibacter* (Espécie *Candidatus Solibacter usitatus*). A categoria *Candidatus* é uma nova categoria para determinar possíveis grupos bacterianos (BRADFORD et al., 1998). O gênero *Candidatus Solibacter* pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Solibacteres* e é caracterizado como degradador do composto organofosforado chamado Malation (XIE et al, 2013). Foi identificado como espécie predominante o *Candidatus Solibacter usitatus* (2750 sequências),

na análise metagenômica de solos de Mata Atlântica e Caatinga (RN, Brasil) (PACCHIONI, 2010).

Seguidamente está o gênero *Anaeromyxobacter* (Espécie *Anaeromyxobacter* Fw109-5) em maior frequência relativa (<8%), para a primeira etapa do estudo. Este gênero pertence ao filo *Proteobacteria* e classe *Deltaproteobacteria* e apresentou uma frequência de 0.2% na comunidade bacteriana no Rio Negro (NEVES, 2013).

O gênero *Aneoromyxobacter* é definido como um microrganismo estritamente anaeróbico e capaz de degradar substratos orgânicos (COLLINS et al., 1994; SUN et al., 2012). Estes microrganismos foram observados em ambientes com alta carga orgânica e costumam participar das reações de hidrólise dos compostos orgânicos complexos (HATOMONO et al., 2007; PEREYRA et al., 2010). Ramos (2013), identificou este gênero, especificamente a espécie *Anaeromyxobacter* spp, na avaliação de águas subterrâneas contaminadas com mistura de diesel e biodiesel, com frequência relativa de aproximadamente 18%. Igualmente, Silva (2007) identificou o gênero *Aneoromyxobacter* em amostra de mangue de bacia petrolífera (5%).

O gênero que segue em ordem de frequência relativa na primeira etapa do estudo (<4%), é o *Geobacter* (Espécie *Pelobacter propionicu*) que corresponde ao filo *Proteobacteria* e classe *Deltaproteobacteria*. Este gênero é estritamente anaeróbico e capaz de degradar diversos compostos orgânicos e aromáticos (KLEINSTEUBER et al., 2012).

No estudo realizado por Neves (2013) no rio Negro, este gênero foi identificado com uma frequência de 0.07%; e por outra parte em comunidade microbiana de um reator de leito granular expandido com presença de surfactante, apresentou uma predominância (9%) (DELFORNO, 2011).

Assim mesmo, o gênero *Terriglobus* (Espécie *Terriglobusroseus*), com frequência de 2.7%, pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Acidobacteria*, foi obtido de material vegetal de uma planta carnívora, mediante técnica de pirosequenciamento (FERREIRA, 2011), com frequência de 5%. Assim mesmo, este gênero foi isolado a partir de solo para agricultura nunca plantado nos Estados Unidos (KOCH et al., 2008), e de solo antes do tratamento com sedimento de esgoto de estação de tratamento (Barueri, SP) (VAL-MORAES, 2008).

Entre outros gêneros menores de 2%, se encontra o *Desulfatibacillum* (Espécie *Desulfatibacillum alkenivoran*, 46%) com proporção de 2.3%, corresponde também ao filo *Proteobacteria* e classe *Deltaproteobacteria*; o gênero *Methylococcus* (Espécie *Methylococcus capsulatus*), pertencente ao filo *Proteobacteria* e classe

Gammaproteobacteria, é aeróbica obrigatória capaz de viver em diversos ambientes, resistindo e crescendo melhor em altas temperaturas (45°C) (WALTER et al., 1999).

O gênero *Methylococcus* possui a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, além de poder realizar desnitrificação e nitrificação, convertendo o nitrogênio consideravelmente (WARD et al., 2004). Este gênero foi identificado em material vegetal de uma planta carnívora, mediante técnica de pirosequenciamento (Frequência 10%) (FERREIRA, 2011), porque existe interrelação entre a planta e o ambiente aquático onde se desenvolve. Por outro lado, Linhares (2012), identificou este gênero no estudo da comunidade metanotrófica em amostras de solo de manguezal contaminado com hidrocarbonetos de petróleo (Técnica de pirosequenciamento), e Neves (2013) identificou o gênero *Methylococcus* no rio Negro (Frequência 4%).

O 55% dos gêneros identificados na segunda etapa do estudo, foram identificados na análise da comunidade bacteriana no rio Negro (NEVES, 2013). Além dos gêneros *Anaeromixobacter* e *Geobacter*, já identificados e especificados na primeira etapa do estudo, se encontram os gêneros *3_genus_incertainae_sedis*, *Geothrix*, *Dehalogenimonas*, *Gp1*, *Gp3*, *Holophaga* e *Cloacibacterium*. Nesta segunda etapa do estudo, as espécies não são especificadas por apresentar um % de similaridade baixo.

O termo *incertainae_sedis* é uma expressão latina para indicar o não estabelecimento da posição certa de um táxon (DELFORNO, 2011). O gênero *3_genus_incertainae_sedis* pertence ao filo *Verrucomicrobia* e classe *subdivision3*. O filo *Verrucomicrobia* representa uma fração significativa das comunidades de água doce (NISHIMURA e NAGATA, 2007), porém, também representa entre 2-8% da comunidade bacteriana observada na rizosfera (KIELAK et al., 2008).

O gênero *Geothrix* pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Holophagae*, é um organismo estritamente anaeróbico com capacidade de redução do ferro (COATES et al., 1999; NEVIN e LOVLEY, 2002). No trabalho desenvolvido por Cannavan (2007) para analisar a diversidade bacteriana em solos da região amazônica (técnica de pirosequenciamento), mas as sequências apresentam valores baixos de % de similaridade (<31%).

O gênero *Dehalogenimonas* pertence ao filo *Chloroflexi* e classe *Dehalococcoidetes*. Estes microrganismos são capazes de reduzir alcanos alifáticos policlorados, especificamente a espécie *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* (MOE et al., 2009). Este gênero foi identificado em amostras de sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos de

petróleo (LINHARES, 2011). Assim mesmo, Etto (2011) identificou este gênero na análise da biodiversidade procariótica das turfeiras em campos paranaenses.

O gênero *Gp1* pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Acidobacteria_Gp1*. Este gênero foi identificado por Neves (2013) no rio Negro (Frequência 0.24%), por Etto (2011) em comunidade de turfeiras e também por Ferreira (2011) como o gênero predominante no ambiente aquático onde se desenvolve uma planta carnívora. Assim mesmo, o gênero *Gp3* pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Acidobacteria_Gp3*, e também foi identificado por Neves (2013) no rio Negro (Frequência 10.4%).

O gênero *Holophaga* pertence ao filo *Acidobacteria* e classe *Holophagae*, é um organismo fermentador de compostos aromáticos (CANHOS et al., 1997), e foi identificado em baixa frequência no rio Negro (0.05%) (NEVES, 2013); assim como também foi identificado em tratamentos de solos sem adição e com adição de lodo de esgoto, as bactérias do gênero *Holophaga* apresentaram uma diminuição de 12.5% 67 dias após o tratamento com lodo de esgoto (VAL MORAES, 2008).

O gênero *Cloacibacterium* pertence ao filo *Bacteroidetes* e classe *Flavobacteria*. As bactérias do filo *Bacteroidetes* são microrganismos encontrados em diversos habitats e também são conhecidos por apresentar características quimiorganotróficas capazes de degradar vários polímeros, tais como: celulose, quitina, pectina (REICHENBACH, 1992; KIRCHMAN, 2002).

Cabe ressaltar, que o gênero *Cloacibacterium* foi descrito em 2006, sendo isolado a partir de águas residuais na cidade de Norman (Oklahoma) e caracterizada a espécie *Cloacibacterium normanense* (ALLEN et al, 2006). Neste mesmo contexto, o departamento de Ciências ambientais da Universidade de Aarhus na Dinamarca, realizou um estudo da comunidade bacteriana na neve da alta antártica e na água doce (Técnica de pirosequenciamento), identificando uma proporção do filo *Bacteroidetes* (Frequência de 9-13%) na comunidade de água doce e uma predominância do gênero *Flavobacterium* (13%) e na amostra da camada superior da neve, identificou-se o gênero *Cloacibacterium* com frequência de 5.5% e na camada intermédia da neve 1.2% (MOLLER et al., 2013). O gênero *Cloacibacterium* também foi identificado na caracterização microbiana em reator anaeróbico de leite fluidificado (OLIVEIRA, 2010) com frequência relativa de 2%. Assim mesmo um clone identificado com similaridade de 99% com gênero *Cloacibacterium* em comunidade microbiana de um reator de leite granular expandido (DELFORNO, 2011).

Outro aspecto a destacar, é com relação aos microrganismos biorremediadores, os quais, segundo o Atlas (1995) estão amplamente distribuídos no solo e ambientes aquáticos,

cujas comunidades normalmente constituem menos que 1% da comunidade microbiana total, mas quando os hidrocarbonetos estão presentes, estas comunidades aumentam em 10% da comunidade. Este comportamento se observa no resultado deste trabalho, aproximadamente 14% dos microrganismos identificados, são catalogados como "Biorremediadores" de ambientes contaminados, e eles tem um incremento, até triplicar o número de sequências, em alguns casos.

5.3 ÍNDICES DE RIQUEZA E DIVERSIDADE. ESTATÍSTICA

Como resultado de aplicação do programa Mothur, obteve-se uma maior riqueza (Índices de Chao e Ace) na amostra Ad (depois do efluente), para a primeira etapa do estudo. E na estimativa da diversidade, segundo índice de Shannon, a riqueza é maior na amostra Ad (depois do efluente), e com relação ao índice de Simpson, apresenta um valor menor próximo a zero na amostra Ad (depois do efluente), isto representa uma maior dominância. O índice de Simpson mede a Dominância, ou seja, os valores de dominância dentro de uma Comunidade. Uma característica de Simpson é a sua sensibilidade às mudanças nas espécies abundantes; mede a variação das espécies mais abundantes por alguma perturbação (ÑIQUE, 2010).

Este mesmo comportamento pode observar-se no estudo da comunidade metanotrófica em amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos (LINHARES, 2011), onde a riqueza e a diversidade é maior no local "impactado", segundo os diversos índices analisados. Este resultado sugere que a contaminação com hidrocarbonetos pode ter favorecido o desenvolvimento dos microrganismos identificados.

Considerando as curvas de rarefação como perfis de diversidade, pode-se se afirmar que existe uma maior diversidade na amostra Ad (igarapé depois com efluente), porque para o mesmo esforço de um número de sequências específicas, se obtém um número maior de grupos de gêneros (OTU's), nos dois níveis de similaridade considerados.

Na segunda etapa do estudo, o índice de riqueza de Chao, não apresenta muita diferença nos valores das amostras das comunidades 2 e 3 (igarapé natural e igarapé com efluente), entanto que o índice Ace, reflete uma pequena diminuição na comunidade 3 com relação à comunidade 2. Por outra parte, a comunidade 1 (Dique efluentes) apresenta uma diferença com relação à comunidade 2 e 3. Este resultado pode corroborar-se com os resultados da estatística gerada pelo Mothur, Amova que indica que existe uma diferença significativa ($p=0.016^*$) entre as comunidades 1 e 2 (Dique de efluentes e o igarapé natural).

Por outro lado, as curvas de rarefação na segunda etapa do estudo, especificamente com 100% de similaridade, comprovam que a riqueza é maior na comunidade 2, seguida da comunidade 3, sendo a comunidade 1, a que possui a menor riqueza de espécies. Para o nível de 97% o platô foi atingido, indicando que a amostragem realizada foi boa. Com relação ao índice de Shannon, a diversidade é maior na comunidade 2 (Igarapé Natural), e a comunidade 1 (Dique de efluentes) é a que possui o menor índice de diversidade. De igual maneira, o índice Simpson, reflete uma maior dominância de espécies na comunidade 2 ou igarapé natural (ÑIQUE, 2010).

Entretanto, o teste de Libshuff revelou que entre cada uma das amostras das três comunidades analisadas, não existe diferença na estrutura genética, ou seja que possuem a mesma estrutura genética na comunidade bacteriana.

CONCLUSÕES

Baseado nos diferentes resultados gerados pelo software Mothur, pode-se concluir o seguinte:

- Os valores medidos dos parâmetros físico-químicos encontram-se dentro das medidas estabelecidas na Resolução Conama nº 357 (2005) para os tipos de corpos de água analisados. Os parâmetros cromatográficos, não apresentaram valores significativos que indiquem a presença de algum tipo de hidrocarboneto nos locais amostrados.
- O filo Proteobacteria foi o mais abundante nas duas etapas do estudo, com as classes *Deltaproteobacteria* e *Alphaproteobacteria* mais predominante na primeira etapa do estudo e na segunda etapa do estudo, respectivamente.
- O gênero mais predominante no igarapé da onça (Primeira etapa do estudo), foi o *Candidatus Solibacter*, e o gênero *Geobacter* no igarapé natural sem nome (Segunda etapa do estudo). Ambos catalogados como biorremediadores, apresentando grande incremento nas comunidades depois da mistura com efluentes, em alguns casos.
- Uma grande parcela de microrganismos são considerados “Não Classificados” (Até 30%), e aproximadamente 14% dos gêneros identificados nas duas etapas do estudo, são catalogados como Biorremediadores de ambientes contaminados.
- A riqueza e diversidade de espécies no Igarapé da Onça, é maior depois do despejo de efluentes de hidrocarboneto (Primeira etapa do estudo). Indicando que o efluente contribui no incremento da quantidade e variedade nas comunidades de microrganismos. A abundância e diversidade de espécies no igarapé natural (sem nome nem contacto com efluente), é maior com relação a este igarapé depois da mistura com efluentes (Segunda etapa de estudo).
- Estatisticamente não existe diferença significativa entre as comunidades do igarapé natural (sem nome) e entre este igarapé misturado com efluentes. Igualmente, não existe diferença na estrutura genética entre as amostras das comunidades analisadas, o que indica que o despejo de efluentes no corpo de água, não tem impacto significativo na biodiversidade microbiana deste ambiente aquático (Segunda etapa do estudo).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ambientes aquáticos ao redor da Província Petrolífera de Urucu, apresentam uma grande diversidade bacteriana, ainda com despejo contínuo de efluentes de hidrocarbonetos, representando uma fonte rica para descoberta de novos grupos taxonômicos (espécies, famílias e até mesmo filos), a partir do isolamento microbiano e taxonomia polifásica (combinação de critérios fenotípicos e genotípicos).

Existe um grande desafio para a compreensão da relação entre a composição, abundância e diversidade dos microrganismos do ambiente aquático com o despejo de efluentes, o qual representa um enorme potencial para exploração biotecnológica desta diversidade no desenvolvimento de consórcios microbianos para processos de biorremediação, biomonitoramento, produção de biocombustíveis, entre outra variedade de processos de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HADHRAMI, M. N. et al. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bull**, v. 30, n. 6, p.403-408, 1995.
- ALLEN, T. D. et al. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1311–1316, 2006.
- ALVAREDO, D. A. P. **Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP.
- AMANN, R. I. et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v. 59, p. 143–169, 1995.
- ATLAS, R. M.; CERNIGLIA, C. E. Bioremediation of petroleum pollutants. **Bioscience**, v. 45, p. 332-338, 1995
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Tradução de Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. 2a Edição. Bookman: Porto Alegre, 622 p. 2002.
- BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de Eichornia crassipes na Amazônia**. 2009. 185f. Tese (Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.
- BERD, M. M. et al. **Caracterização de hidrocarbonetos em sedimentos na Amazônia, Brasil**. 36^a Sociedade Brasileira de Química, 2013. Águas de Lindóia, SP.
- BRADFORD, K. J. et al. Seed and soil treatments to improve emergence of muskmelon from cold or crusted soils. **Crop Science**, Madison, v. 28, p. 1001-1005. 1988.
- BRANCO, S. M. **Hidrologia aplicada à engenharia sanitária**. 3.ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB. 1986. 616 p.
- CANNAVAN, F. S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Oriental Piracicaba**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado-Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- CANHOS, V. P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, São Paulo, , v.1, p.1-13. Fapesp. 1997.
- CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Relação de Áreas Contaminadas**, 2007. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 15 ago. 2012.

COATES, J. D. et al. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1615-1622, 1999.

COLLINS, M. D. et al. The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 812- 826, Oct. 1994.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução n. 357** de 17 de março de 2005. Brasília, DF.

COSTA, I. D. **Estrutura de assembléias de peixes em uma área de exploração petrolífera na Amazônia (Bacia do rio Urucu, Amazonas, Brasil)**. 2009. 161f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas do Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia tropical e recursos naturais. Área de concentração: Biologia de água doce e pesca interior). INPA/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v. 30, n. 179, jan/fev. 2002.

DAVE, H. et al. Biodegradation of slop oil from a petrochemical industry and bioreclamation of slop oil contaminated soil. **W. J. Microbiol. Biotechnol**, Paris, v. 10, n. 6, p. 653-656, 1994.

DELFORNO, T. P. **Caracterização microbiana e remoção do alquibenzeno linear sulfonado em reactor EGSB**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

DUNBAR, J. et al. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65, p. 1662–1669, 1999.

ETTO, R. M. **Comunidades procarióticas das turfeiras dos campos de altitude paranaenses**. 2011. 160f. Dissertação (Doutorado em Ciências-Bioquímica)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FERREIRA, A. J. **Diversidade e estrutura da comunidade bacteriana associada às armadilhas da planta carnívora *Utricularia gibba* (Lentibulariaceae) e o ambiente aquático**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Área de concentração: Genética molecular e ecologia microbiana) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. SP.

FITTKAU, E. J. Remarks on limnology of Central Amazon rain-forest stream. **Verh.Internat. Verein.Limnol.**, v. 15, p. 1092-1096, 1964.

FREUND, J. E. **Estatística aplicada: economia, administração e contabilidade**. Tradução Claus Ivo Doering. 11ª edição. Bookman: Porto Alegre, 2006. 536 p.

FOCHT, D. D. Microbial degradation of chlorinated biphenyls. In: BOLLAG, J. M., STOTZKY, G. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v.8, Cap9, p.341-407. 1993.

GARRITY, G.M. et al. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York. 2004. p. 1-399.

GEBARA, S. S. et al. Métodos para análises de HPA e BTEX em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: um estudo de caso em Campo Grande. MS, Brasil. **Quim. Nova**. v. 36, n.7, p.1030-1037. 2013.

GIBBS, R. J. Water chemistry of Amazon river. **Geochim. Cosmochimica Acta**, v. 36, p. 1061-1066, 1972.

GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basic. New Jersey. **Biotech. Bioeng**, v. 27, n. 5, p. 660-674, 1985.

GU, W. et al. The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. **Eur Neurol.**, v. 52, p. 107-11, 2004.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HADER et al. Effects on aquatic ecosystems. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 53-68. 1998.

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 38-39, 2005.

HARTMANN, C. C. **Avaliação de um efluente industrial através de ensaios toxicológicos e análises físicas e químicas**. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HATAMONO, M. et al. Diversity of Anaerobic Microorganisms Involved in Long-Chain Fatty Acid Degradation in Methanogenic Sludges as Revealed by RNA-Based Stable Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4119-4127, jul. 2007.

HOEPEL, R. E.; HINCHEE, R. E. Enhanced biodegradation for on-site remediation of contaminated soils and groundwater. In: WILSON, D. J.; CLARKE, A. N.. (Ed.). **Hazardous waste site soil remediation. Theory and application of innovative technologies**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 7, p. 311-431. 1994.

JACQUES, R.J.S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência rural**, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

KATAOKA, A.P.A.G.. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming"**. 2001. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro.

KATZER, F. Grundzüge der Geologie des unteren Amazonasgebietes (des Staates Para in Brasilien): Leipzig, Max Weg, 298 p. (Crinoides p. 159). In: Sioli H. 1975. **Tropical river:**

- the Amazon.** In: Whitton, B. A. ed. River ecology. Berkeley, Univ. of California. p. 461-488.
- KAO, C. M.; WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Wat. Res.**, v. 34, n. 13, p. 3413-3423, 2000.
- KIELAK, A. et al. Differences in vegetation composition and plant species identity lead to only minor changes in soil- borne microbial communities in a former arable field. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 372–382, 2008.
- KIRCHMAN, D. L. The ecology of Cytophaga Flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 91–100, 2002.
- KLEINSTEUBER, S. et al. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon- contaminated aquifers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 4, p. 851-873, may. 2012.
- KOCH, I. H. et al. Edaphobacter modestus gen. nov., sp. nov., and Edaphobacter aggregans sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1114-1122, 2008.
- KÜCHLER, I. L. et al. Contribution to the Chemical Characterization of Rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, n. 3, p. 286-292, 2000.
- KUNIN, V. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, p. 557-578, 2008.
- LANDIS, W. G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems.** Boca Raton: CRC Press, 1995.
- LAPINSKAS, J. Bacterial degradation of hydrocarbon contamination in soil and groundwater. **Chemistry and Industry**, p. 784-789, 1980.
- LAW, R. J.; BISCAYA, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA)- problems and progress in sampling, analysis and interpretation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 29, p. 235-241, 1994.
- LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment". **Microbial Review**, v. 54, p.305-315. 1990.
- LEYEN, B. C. **Eco-eficiência na Exploração e Produção de Petróleo e Gás em Regiões de Florestas Tropicais Úmidas: O Caso da Petrobras na Amazônia.** 2008. 202f. Dissertação (Mestrado Programa de Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- LINHARES, D. C. **Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de Bertioiga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácidos nucléicos com isótopos estáveis (SIP-DNA).** 2011. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Instituto de Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

- LOPES, P. F. **Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ)**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade São Paulo USO/Instituto Butantan/IPT. São Paulo.
- LUCENA, T. et al. *Vibrio aestivus* sp. nov. and *Vibrio quintilis* sp. nov., related to Marisflavi and Gazogenes clades, respectively. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 35, p. 427-431, 2012.
- MAGURRAN, A.E. **Measuring Biological Diversity**. Blackwell Science Ltd, Oxford. 2004.
- MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of en Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 023-027, 2007.
- MATHEUS, C. E. et al. **Manual de análises limnológicas**. São Carlos: Escola de Engenharia, USP, São Paulo, 1995.
- MCVEETY, B. D.; HITES, R. A. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces: A mass balance approach. **Atmospheric Environment** (1957), v.22, p. 511-536. 1998.
- MENICONI, M. F. G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: Diferenciação de fontes em sedimentos e metabolitos em bile de peixe**. 2007. 213f. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte-Natal, RN. Brasil.
- MELO, A. S. O que ganhamos "confundindo" riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade?. **Biota Neotrop.**, v. 8, n. 3. p. 21-27, 2008.
- MOE, W. M. et al. Dehalogenimonas lykanthroporepellens gen. Nov., sp. Nov., a reductively dehalogenating bacterium isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 2692–2697, 2009.
- MOLLER, A. K. et al. Bacterial community structure in High-Arctic snow and freshwater as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes and cultivation. **Polar Research**, v. 32, p. 17390, 2013.
- NEVES, R. O. **Estudo da microbiota bacteriana do rio Negro (Amazonas) em variação espaço temporal por amplificação das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene rRNA 16S e uso de plataforma nova geração 454 pirosequenciador**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.
- NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Mechanisms for Accessing Insoluble Fe(III) Oxide during Dissimilatory Fe(III) Reduction by Geothrix fermentans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2294-2299, may. 2002.
- NISHIMURA, Y.; NAGATA, T. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 48, p. 231- 240. 2007.
- NYER, E. K. In: **Grounwater and soil remedioation: practical methods and strategies**. Ann Arbor Press, Michigan. 1998.

ÑIQUE, M. **Biodiversidade: Clasificación e cuantificación**. Universidade Nacional Agrária da Selva. Tingo María, Perú. 2010.

OLIVEIRA, L. L. **Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) e caracterização microbiana em reator anaeróbio de leito fluidificado**. 2010. 178f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, T. C. S. **Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus)**. 2007. 193f. Tese (Doutorado em Química Analítica. Departamento de Química). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, RJ.

PACCHIONI, R. G. **Metagenômica comparativa de solo de regiões de Mata Atlântica e Caatinga do Estado do Rio Grande do Norte – Brasil**. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

PEIXOTO, J. C. C. et al. Comparison of bacterial communities in the Solimões and Negro River tributaries of the Amazon River based on small subunit rRNA gene sequences. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n. 4, p. 3783-3793, 2011.

PEREYRA, L. P. et al. Detection and Quantification of Functional Genes of Cellulose-Degrading, Fermentative, and Sulfate-Reducing Bacteria and Methanogenic Archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2192-2202, apr. 2010.

PETROBRAS. **A saga do petróleo na Amazônia. O desafio de produzir ouro negro na Amazônia**. Manaus. Luz Comunicação, Rio de Janeiro, 2008. 36 p.

PETROBRAS. **Biodiversidade na Província Petrolífera de Urucu**. Organizado por Sirayama de Oliveira. Ferreira Lima et al. – Rio de Janeiro : PETROBRAS. CENPES. 2008. 194 p.

PISA, G. **Diversidade de bactérias do solo aderido à raiz de cana de açúcar**. 2010. 143 p. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

QUEIROZ, M. M. et al. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães-Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 10, n. 4, p. 943-952, 2009.

RAMOS, D. T. **Bioestimulação de processos metanogênicos com acetato de amônio para degradação acelerada de hidrocarbonetos de petróleo em águas subterrâneas contaminadas com diesel B20**. 2013. 263f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC.

REICHENBACH, H. Validation List N° 41. **Int J Syst. Bacteriol**. v. 42, p. 327-328 (Order 1. Cytophagales Leadbetter 1974, 99^{AL}. In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig N and Holt JG (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 3, The Williams & Wilkins Co., Baltimore 1989, p. 2011-2013).

RITTMANN, B.E. Innovations in biological processes for pollution control. In: MITCHELL, R. (ed.) **Environmental Microbiology**. New York : Wiley-Liss, 1992. p. 265-286.

RODRIGUES, T. B. **Diversidade metagênômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. 2011. 269f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética) Universidade Federal de Rio de Janeiro, RJ.

SCHLOSS, P. D. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8230, 2009

SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 10, p. 6773-6779, 2006.

SEO, J. et al. Bacterial degradation of aromatic compounds. **International Journal of Environmental Research, and Public Health**, v. 6, p. 278-309, 2009.

SINGLETON, D. R. et al. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

SILVA, C. L.V. et al. **Detecção de bactérias redutoras de Fe (III), em mangue da bacia petrolífera Português com potencial biodegradador de petróleo**. Campinas, SP. 4º PDPETRO. Outubro 2007.

SIOLI, H. Das Wasser im Amazonasgebiet. **Forsch.u.Fortschr**, v. 26, p. 274-280, 1950.

SIOLI, H. Valores de pH de águas Amazônicas. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi. **Geologia**, v. 1, p. 1-35, 1957.

SIOLI, H. Hydrochemistry and Geology in the Brazilian Amazon Region. **Amazoniana** v.3, p. 267-277. 1968.

SOUSA, A. K. F. **Variação sazonal e espacial da concentração de elementos-traços nos rio Urucu, Solimões e Negro - Amazônia Ocidental, Brasil**. 2008. 229f. Dissertação (Mestrado em Química com área de concentração em Química Analítica do programa de Pós-Graduação em química). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Ann Rev Microbiol.**, v. 39, p. 321-346, 1985.

STALLARD, R. F.; EDMOND, J. M. Geochemistry of the Amazon. 2. Influence of geology and watering environment on the dissolved load. **Journal of Geophysical Research**, v. 88, p. 9671 - 9688, 1983.

SUN, W. et al. Anaerobic Methyl tert-Butyl Ether-Degrading Microorganisms Identified in Wastewater Treatment Plant Samples by Stable Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2973-2980, apr. 2012.

TIBURTIUS, E. R. L. et al. Contaminação das águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sitios contaminados. **Quim. Nova**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 2004.

TONINI, R. M. C. W. et al. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias. **Oecol. Aust.**, v. 14, n. 4, p. 1027-1035. 2010.

TORSVIK, V. et al. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Appl Environ. Microbiol.**, p.776-781, 1990

TOYAMA, D. **Análise da diversidade microbiana aquática em rios e lagos da região amazônica**. 2012. 185f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo, SP.

VAL-MORAES, S. P. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. 2008. 171f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária área de concentração em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

VAN HAMME, J. D. et al. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 503-49, 2003.

VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial population exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 41, n. 9, p. 767-775, 1995.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. Atlas: São Paulo, 204 p. 2006.

XIE, Z. et al. Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchongensis*. **Biotechnol Lett.**, v. 35, p. 1283–1289, 2013.

WALTERS, K. J. et al. Structure of the soluble methane monooxygenase regulatory protein B. **Proc. Natl. Acad. Sci. Biophys.**, v. 96, p. 7877-7882, 1999.

WARD, N. et al. Genomic Insights into Methanotrophy: The Complete Genome Sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). **PLoS Biol.**, v. 2, p. 1616-1628, 2004.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 259-276, 2001.

WILSEY, B. J. et al. Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity. **Ecology**, v. 86, n. 5, p. 1178-1184. 2005.

ZING, P. et al. Low taxon richness of Bacteroplankton in high-altitude Lakes of the Eastern Tibetan Plateau, with a predominance of *Bacteroidetes* and *Synechococcus* spp. **App. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7017-7025, 2009.

ZWART, G. et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbiol. Ecol.** v.28, p.141-155. 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - FILOS IDENTIFICADOS NA PRIMEIRA ETAPA DO ESTUDO

N°	Nome de Filos	N° de Sequências	
		Aa	Ad
1	ABY1_OD1	1	2
2	AC1	3	8
3	Acidobacteria	310	747
4	Actinobacteria	128	234
5	AD3	3	7
6	Aquificae	2	8
7	Armatimonadetes	9	12
8	Bacteroidetes	203	449
9	Caldiserica	0	4
10	Caldithrix	0	2
11	Chlamydiae	0	7
12	Chlorobi	51	99
13	Chloroflexi	21	90
14	Cyanobacteria	2	8
15	Deferribacteres	1	1
16	Dictyoglomi	1	14
17	Elusimicrobia	15	62
18	Firmicutes	41	135
19	GAL15	4	15
20	Gemmatimonadetes	14	23
21	GN02	1	7
22	GN04	12	36
23	GN06	0	2
24	GN12	2	7
25	GOUTA4	16	32
26	HDBW-WB69	1	10
27	KSB1	0	1
28	LCP-89	0	4
29	Lentisphaerae	7	19
30	MVP-15	7	7
31	Não Classificados	4	15
32	NC10	1	3
33	NKB19	0	1
34	Nitrospirae	85	158
35	OP3	9	61
36	OP8	4	8

N°	Nome de Filos	N° de Sequências	
		Aa	Ad
37	Planctomycetes	1	10
38	Proteobacteria	835	1696
39	SC4	1	1
40	SM2F11	1	1
41	SPAM	1	3
42	Spirochaetes	69	186
43	Synergistetes	2	8
44	Tenericutes	1	4
45	TG3	15	39
46	Thermi	3	7
47	Thermotogae	2	6
48	TM6	4	27
49	TM7	0	2
50	Verrucomicrobia	44	116
51	WS3	1	6

Legenda:

Aa: Amostra igarapé antes de despejo efluentes

Ad: Amostra igarapé depois de despejo efluentes

APÊNDICE 2 - FILOS IDENTIFICADOS SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO

N°	Nome de Filos	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural			Igarapé com Efluente				
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	Acidobacteria	25	38	25	46	325	135	275	413	80	85	161	99
2	Actinobacteria	15	58	20	58	46	44	54	92	64	110	79	52
3	Armatimonadetes	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
4	Bacteroidetes	87	132	89	192	267	101	195	337	137	105	187	112
5	BRC1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	Caldiserica	0	1	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0
7	Chlamydiae	0	2	3	1	3	1	1	7	5	5	12	4
8	Chlorobi	3	9	6	9	10	0	7	9	5	3	8	5
9	Chloroflexi	13	29	8	26	31	3	4	50	38	70	56	60
10	Deferribacteres	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
11	Deinococcus-Thermus	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
12	Elusimicrobia	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	3
13	Fibrobacteres	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
14	Firmicutes	19	76	30	159	25	4	19	40	54	74	65	49
15	Fusobacteria	0	1	0	0	1	1	3	1	0	1	3	1
16	Gemmatimonadetes	3	0	0	0	1	0	2	2	1	1	2	3
17	Lentisphaerae	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
18	Não Classificados	196	296	189	522	715	202	311	1000	258	381	524	356
19	Nitrospira	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Planctomycetes	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
21	Proteobacteria	546	690	540	771	1150	746	1124	1729	1144	1117	1498	953
22	Spirochaetes	9	14	5	19	15	3	3	11	3	1	3	2
23	SR1	2	3	0	1	0	0	0	2	1	0	1	1
24	Synergistetes	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Thermotogae	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
26	TM7	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
27	Verrucomicrobia	6	4	5	5	74	13	31	45	16	9	27	4
28	WS3	2	2	2	4	0	0	0	2	1	1	2	2

APÊNDICE 3 - CLASSES IDENTIFICADAS NA PRIMEIRA ETAPA DO ESTUDO

N°	Nome das Classes	N° de Sequências		N°	Nome das Classes	N° de Sequências	
		Aa	Ad			Aa	Ad
1	ABS-6	3	7	39	Iii1-8	20	31
2	Acidobacteria	63	152	40	Koll11	9	59
3	Actinobacteria	128	234	41	KSB3	0	2
4	Agg27	1	1	42	Ktedonobacteria	1	7
5	Alphaproteobacteria	196	331	43	LC-1	1	2
6	Anaerolineae	7	19	44	Lentisphaerae	7	19
7	Aquificae	2	8	45	Leptospirae	1	4
8	Bacilli	16	64	46	M1NP2-04	7	15
9	Bacteroidia	79	184	47	Methylacidiphilae	0	1
10	BB34	1	6	48	Mollicutes	1	4
11	BD4-9	0	2	49	MSB-5A5	6	13
12	Betaproteobacteria	134	225	50	MVS-40	20	61
13	Bljii12	1	1	51	Não Classificados	27	75
14	Brachyspirae	0	4	52	Nitrospira	85	158
15	BSV19	10	21	53	Nostocophycideae	0	1
16	Caldithrixae	0	2	54	OP5	0	4
17	CH21	9	10	55	OP8_1	0	2
18	Chlamydiae	0	7	56	OP8_2	4	6
19	Chloracidobacteria	2	3	57	OPB56	8	14
20	Chlorobia	8	17	58	Oscillatoriothycideae	1	4
21	Chloroflexi	0	3	59	PAUC37f	5	28
22	Chloroflexi-4	0	2	60	Phycisphaerae	0	8
23	Clostridia	25	71	61	Planctomycea	0	1
24	Deferribacteres	1	1	62	PRR-12	1	6
25	Dehalococcoidetes	12	54	63	RB25	12	24
26	Deinococci	3	7	64	RB384	16	32
27	Deltaproteobacteria	342	811	65	S15B-MN24	0	2
28	Dictyoglomia	1	14	66	SBRH58	1	18
29	Elusimicrobia	15	62	67	SHA-114	2	6
30	Epsilonproteobacteria	10	21	68	SJA-176	0	2
31	Flavobacteria	63	148	69	SJA-28	7	17
32	Gammaproteobacteria	153	308	70	SJA-4	3	9
33	Gemmatimonadetes	14	23	71	SM1B09	1	2
34	GN08	0	1	72	SM1H02	1	1
35	GN15	6	23	73	SOGA31	0	2
36	GW-22	0	1	74	Solibacteres	155	394
37	Holophagae	32	52	75	Spartobacteria	2	3
38	Ignavibacteria	16	27	76	Sphingobacteria	55	105

Continuação...

Classes identificadas na primeira etapa do estudo

N°	Nome das Classes	N° de Sequências	
		Aa	Ad
77	Spirochaetes	57	146
78	Sva0725	1	1
79	Synechococcophycideae	1	1
80	Synergistia	2	8
81	TG3-1	15	39
82	Thermobacula	0	1
83	Thermotogae	2	6
84	TK17	0	1
85	TM7-3	0	2
86	Verrucomicrobiae	42	112
87	WWE1	4	17
88	0319-6G9	1	3
89	12 24	1	3

Legenda:

Aa: Amostra igarapé antes de despejo efluentes

Ad: Amostra igarapé depois de despejo efluentes

APÊNDICE 4 - CLASSES IDENTIFICADAS SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO

N°	Nome de Classes	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé c/Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1	Acidobacteria_Gp1	5	7	3	10	54	31	91	85	20	12	30	16
2	Acidobacteria_Gp10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	Acidobacteria_Gp11	1	1	3	3	4	4	3	4	0	0	7	3
4	Acidobacteria_Gp12	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
5	Acidobacteria_Gp13	0	0	1	1	6	1	0	18	0	0	5	2
6	Acidobacteria_Gp15	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
7	Acidobacteria_Gp16	0	0	0	0	1	0	1	3	0	2	0	0
8	Acidobacteria_Gp17	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1
9	Acidobacteria_Gp18	0	1	1	3	4	0	2	6	1	4	8	8
10	Acidobacteria_Gp2	0	0	0	0	19	12	13	21	4	2	15	4
11	Acidobacteria_Gp21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Acidobacteria_Gp22	4	3	2	4	8	0	0	8	1	11	9	15
13	Acidobacteria_Gp23	0	1	2	0	2	1	0	2	1	2	1	1
14	Acidobacteria_Gp3	12	16	8	12	114	38	51	149	31	39	43	27
15	Acidobacteria_Gp5	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	0
16	Acidobacteria_Gp6	0	1	0	0	0	2	0	4	3	2	2	4
17	Acidobacteria_Gp7	0	1	0	1	10	5	9	15	2	2	7	3
18	Actinobacteria	15	58	20	58	46	44	54	92	64	110	79	52
19	Alphaproteobacteria	101	194	95	156	280	276	304	398	279	262	231	124
20	Anaerolineae	2	4	1	5	1	0	0	4	7	13	8	9
21	Armatimonadetes_gp5_class_incertae_sedis	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
22	Bacilli	1	4	2	6	1	0	0	2	3	5	4	3
23	Bacteroidetes_incert_sedis_class_incer_sedis	0	0	0	1	2	0	1	2	0	0	2	0
24	Bacteroidia	2	7	4	20	8	4	30	12	6	2	9	4
25	Betaproteobacteria	249	213	216	282	284	189	344	458	447	376	554	377
26	BRC1_class_incertae_sedis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
27	Caldilineae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
28	Caldisericia	0	1	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0
29	Chlamydiae	0	2	3	1	3	1	1	7	5	5	12	4
30	Chlorobia	2	6	3	6	2	0	0	3	3	2	4	2
31	Chloroflexi	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
32	Clostridia	15	68	25	145	23	4	19	34	48	63	58	43
33	Deferribacteres	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
34	Dehalococcoidetes	1	0	0	5	16	1	0	26	2	2	5	2
35	Deinococci	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0

Continuação...

Nº	Nome de Classes	Nº de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé c/Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
36	Deltaproteobacteria	114	171	141	219	412	162	311	534	277	301	469	298
37	Elusimicrobia	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	3
38	Epsilonproteobacteria	1	2	1	3	0	0	0	1	0	0	1	0
39	Erysipelotrichia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
40	Fibrobacteria	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
41	Flavobacteria	25	16	19	26	1	1	2	3	19	12	22	7
42	Fusobacteria	0	1	0	0	1	1	3	1	0	1	3	1
43	Gammaproteobacteria	46	61	63	74	118	66	117	225	88	103	167	107
44	Gemmatimonadetes	3	0	0	0	1	0	2	2	1	1	2	3
45	Holophagae	2	6	5	12	98	41	101	91	13	7	25	14
46	Ignavibacteria	1	3	3	3	8	0	7	6	2	1	4	3
47	Ktedonobacteria	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
48	Lentisphaeria	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
49	Não Classificadas	293	452	276	698	1020	332	499	1408	415	590	762	528
50	Nitrospira	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	Planctomycetacia	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0
52	Sphingobacteria	10	30	12	30	25	22	29	48	41	20	39	28
53	Spirochaetes	9	14	5	19	15	3	3	11	3	1	3	2
54	SR1 class incertae sedis	2	3	0	1	0	0	0	2	1	0	1	1
55	Subdivision3	5	4	4	3	74	12	31	45	15	5	24	4
56	Subdivision5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	2	0
57	Synergistia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58	Thermotogae	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
59	TM7_class_incertae_sedis	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
60	Verrucomicrobiae	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
61	WS3_class_incertae_sedis	2	2	2	4	0	0	0	2	1	1	2	2

APÊNDICE 5 - GÊNEROS IDENTIFICADOS NA PRIMEIRA ETAPA DO ESTUDO

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad
1	Acetivibrio	1	4
2	Acetobacter	1	3
3	Achromobacter	0	1
4	Acidaminococcus	1	1
5	Acidimicrobium	6	10
6	Acidiphilium	0	1
7	Acidisoma	7	8
8	Acidisphaera	0	6
9	Acidobacterium	11	24
10	Acidovorax	3	7
11	Acinetobacter	3	4
12	Actinocorallia	1	1
13	Actinomadura	3	4
14	Actinospica	0	1
15	Aerococcus	2	3
16	Afipia	2	1
17	Agrobacterium	3	3
18	Alicyclobacillus	2	3
19	Alistipes	21	52
20	Alysiella	0	1
21	Anaerobaculum	1	3
22	Anaerobiospirillum	0	1
23	Anaerofustis	0	1
24	Anaeromyxobacter	96	160
25	Aneurinibacillus	2	11
26	Aquamonas	1	4
27	Aquifex	1	1
28	Aquimarina	3	5
29	Archangium	9	21
30	Arenibacter	0	1
31	Arhodomonas	0	5
32	Aromatoleum	3	5
33	Arthrospira	1	1
34	Aurantimonas	0	1
35	Azohydromonas	13	21
36	Azonexus	2	2
37	Azospira	2	4
38	Azospirillum	8	19

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad
39	Bacillus	1	4
40	Bacteroides	3	7
41	Bartonella	1	1
42	Bdellovibrio	6	7
43	Belliella	1	1
44	Blastochloris	1	2
45	Blastococcus	4	10
46	Blattabacterium	0	3
47	Borrelia	3	12
48	Brachyspira	0	4
49	Bradyrhizobium	3	8
50	Brevibacillus	0	4
51	Brevundimonas	1	2
52	Brochothrix	1	2
53	Burkholderia	1	6
54	Caldimonas	2	5
55	Caminiabacter	1	3
56	Candidatus Aquirestis	1	1
57	Candidatus Azobacteroides	2	3
58	Candidatus Entotheonella	1	4
59	Candidatus Ishikawaella	1	1
60	Candidatus Microthrix	3	3
61	Candidatus Phytoplasma	1	1
62	Candidatus Protochlamydia	0	5
63	Candidatus Solibacter	155	394
64	Capnocytophaga	12	36
65	Carboxydotherrmus		5
66	Caulobacter	5	6
67	Cellulomonas	0	2
68	Cellvibrio	1	2
69	Chelativorans	1	2
70	Chitinimonas	0	1
71	Chlorobaculum	1	1
72	Chlorobium	2	4
73	Chloroflexus	0	1
74	Chloroherpeton	1	0
75	Chondromyces	21	45
76	Chromobacterium	1	1

Continuação...

Gêneros identificados na primeira etapa do estudo

Item	Nome de Gêneros	Nº de Sequências		Item	Nome de Gêneros	Nº de Sequências	
		Aa	Ad			Aa	Ad
77	Chryseobacterium	6	15	115	Enterococcus	0	7
78	Chthoniobacter	2	2	116	Epulopiscium	1	1
79	Clostridium	8	18	117	Erythromicrobium	1	1
80	Comamonas	1	2	118	Facklamia	1	4
81	Congregibacter	1	1	119	Flavobacterium	3	3
82	Corallocooccus	0	2	120	Flexibacter	1	2
83	Coriobacterium	1	1	121	Frankia	2	3
84	Corynebacterium	2	5	122	Fulvimarina	1	1
85	Coxiella	0	1	123	Geitlerinema	0	1
86	Crenothrix	18	27	124	Gemmatimonas	7	9
87	Croceibacter	9	15	125	Geobacillus	3	8
88	Cryobacterium	1	1	126	Geobacter	54	173
89	Cupriavidus	5	8	127	Geothrix	13	22
90	Cystobacter	3	9	128	Gluconacetobacter	0	3
91	Cytophaga	15	27	129	Gordonia	0	2
92	DCE29	0	1	130	GOUTA19	26	44
93	Dechloromonas	3	4	131	Gramella	1	4
94	Deferribacter	1	1	132	Haliangium	2	5
95	Dehalococcoides	6	20	133	Haliscomenobacter	1	2
96	Deinococcus	2	4	134	Halobacillus	0	1
97	Desulfatibacillum	39	101	135	Halolactibacillus	2	2
98	Desulfobacca	3	3	136	Halothermothrix	1	1
99	Desulfobacterium	5	21	137	HB118	1	5
100	Desulfobulbus	0	1	138	Helicobacter	8	14
101	Desulfococcus	4	15	139	Herbaspirillum	2	2
102	Desulfomicrobium	0	4	140	Herminiimonas	3	5
103	Desulfomonile	2	3	141	Hydrogenobaculum	0	2
104	Desulfotalea	1	1	142	Hylemonella	3	4
105	Desulfovibrio	3	11	143	Hyphomicrobium	22	23
106	Desulfuromonas	14	32	144	Iamia	4	4
107	Devosia	0	1	145	Ignavibacterium	1	6
108	Dictyoglomus	1	14	146	Janthinobacterium	1	1
109	Dokdonella	0	3	147	JG37-AG-70	0	1
110	Dorea	0	1	148	Jonquetella	1	5
111	Echinicola	0	4	149	Kaistobacter	0	1
112	Edaphobacter	0	2	150	Kineosporia	2	6
113	Ehrlichia	0	1	151	Kitasatospora	1	1
114	Ensifer	4	7	152	Kordia	2	5

Continuação...

Gêneros identificados na primeira etapa do estudo

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad
153	Kosmotoga	1	1
154	Kouleothrix	0	1
155	KSA2	4	7
156	Labrys	2	5
157	Laceyella	0	3
158	Lactobacillus	0	3
159	Lamprocystis	1	2
160	Lawsonia	3	4
161	LCP-6	7	10
162	Lentisphaera	5	7
163	Leptolyngbya	1	1
164	Leptonema	0	1
165	Leptospira	1	3
166	Leucothrix	1	2
167	Lewinella	1	3
168	Limnohabitans	3	4
169	Listeria	0	1
170	Marinobacter	1	1
171	MC18	0	1
172	Mechercharimyces	1	1
173	Meiothermus	1	3
174	Mesonina	1	4
175	Mesorhizobium	2	4
176	Methylobacillus	0	1
177	Methylocaldum	9	15
178	Methylocella	1	3
179	Methylococcus	38	81
180	Methylocystis	2	5
181	Methylomicrobium	3	5
182	Methylomonas	21	39
183	Methylosarcina	3	10
184	Methylosinus	9	12
185	Methylosphaera	1	2
186	Methylotenera	0	2
187	Methyloversatilis	11	19
188	Methylovorus	3	6
189	Microbacterium	0	1
190	Moraxella	0	1

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad
191	Mycobacterium	0	2
192	Mycoplasma	0	1
193	Mycoplasma	0	3
194	Myxococcus	2	7
195	Não Classificados	528	1321
196	Nautilia	1	1
197	Nitrobacter	1	6
198	Nitrosospira	38	60
199	Nitrosovibrio	1	1
200	Nitrospira	12	23
201	Nocardia	11	20
202	Nocardioides	1	2
203	Novosphingobium	3	4
204	Olsenella	30	45
205	Oribacterium	4	11
206	Oxalobacter	0	1
207	Paenibacillus	1	3
208	Pandoraea	1	3
209	Parabacteroides	7	10
210	Parachlamydia	0	2
211	Parvibaculum	0	1
212	Pedomicrobium	11	10
213	Pelobacter	2	5
214	Pelodictyon	3	8
215	Pelomonas	2	2
216	Pelotomaculum	0	5
217	Persicobacter	2	5
218	Phenylobacterium	3	5
219	Phyllobacterium	1	2
220	Planifilum	0	1
221	Plesiocystis	0	1
222	Polynucleobacter	1	1
223	Porphyromonas	10	21
224	Prevotella	0	5
225	Prostheco bacter	0	6
226	Prosthecochloris	1	3
227	Pseudomonas	2	4
228	Pseudoxanthomonas		2

Continuação...

Gêneros identificados na primeira etapa do estudo

Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências		Item	Nome de Gêneros	N° de Sequências	
		Aa	Ad			Aa	Ad
229	Psychrobacter	0	1	268	Subdoligranulum	0	1
230	Ralstonia	2	4	269	Subtercola	1	1
231	Reinekea	0	1	270	Sulfurihydrogenibium	1	5
232	Rhizobium	2	3	271	Sulfurimonas	0	1
233	Rhodobaca	0	1	272	Sutterella	1	1
234	Rhodococcus	2	6	273	Syntrophobacter	16	38
235	Rhodocyclus	1	1	274	Syntrophus	15	37
236	Rhodoferax	0	1	275	Tanticharoenia	1	2
237	Rhodomicrobium	4	5	276	Tenacibaculum	0	1
238	Rhodoplanes	56	80	277	Terriglobus	47	116
239	Rhodospirillum	1	5	278	Tetrasphaera	0	1
240	Rhodovibrio	5	9	279	Thauera	7	9
241	Rickettsiella	2	5	280	Thermaerobacter	4	8
242	Riemerella	18	39	281	Thermoanaerobacter	1	4
243	Robiginitalea	0	1	282	Thermobaculum	0	1
244	Roseiflexus	0	1	283	Thermodesulfovibrio	6	11
245	Roseivirga	1	4	284	Thermomonas	1	2
246	Roseomonas	2	3	285	Thermopallium	0	1
247	Rubellimicrobium	1	1	286	Thermosipho	1	2
248	Rubrobacter	13	30	287	Thermotoga	0	2
249	SA-8	23	60	288	Thioalkalivibrio	2	6
250	Saccharothrix	0	2	289	Thiobacillus	2	5
251	Salinibacter	0	1	290	Thiocystis	0	2
252	Salisaeta	0	3	291	TM3	7	20
253	Schlegelella	7	8	292	Trabulsiella	0	1
254	Shinella	0	2	293	Treponema	16	38
255	Silvimonas	2	2	294	Trichormus	0	1
256	Sodalis	1	1	295	Verrucosispora	0	1
257	Sphingobacterium	5	12	296	W22	0	1
258	Sphingobium	2	2	297	Wolinella	0	2
259	Sphingomonas	0	1	298	Xanthobacter	1	2
260	Spirochaeta	4	7	299	Xenophilus	0	1
261	Sporichthya	0	2	300	Yonghaparkia	0	1
262	Sporolactobacillus	0	1	301	Z4MB24	0	1
263	Steroidobacter	2	5	302	Za29	0	2
264	Stigmatella	9	19	303	Zhouia	5	11
265	Streptococcus	0	2	304	Zoogloea	3	4
266	Streptomyces	5	9	305	4 29	33	62
267	Streptosporangium	1	1	306	4041AA30	0	1

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
39	Azonexus	3	0	2	7	0	0	0	0	0	2	3	1
40	Azospira	2	1	1	3	2	1	2	1	0	0	1	1
41	Azospirillum	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	Azotobacter	2	1	2	1	0	0	0	0	0	1	1	1
43	Bacillus	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
44	Bacteriovorax	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
45	Bacteroides	0	1	0	1	1	0	3	0	2	1	2	1
46	Bdellovibrio	2	4	1	3	2	2	11	9	2	3	2	2
47	Beggiatoa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
48	Beijerinckia	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
49	Blastochloris	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
50	Blastococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
51	Blastomonas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	Bosea	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0
53	Brachymonas	1	1	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1
54	Bradyrhizobium	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
55	BRC1_genera_incertainae_sedis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
56	Brevibacillus	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
57	Brevibacterium	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
58	Brevinema	1	4	1	4	13	2	2	10	2	0	1	0
59	Brevundimonas	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0
60	Burkholderia	1	1	1	1	0	0	0	4	6	2	4	1
61	Byssovorax	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
62	Caedibacter	0	0	0	0	2	4	1	4	0	0	0	0
63	Caldilinea	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
64	Caldimonas	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
65	Caldisericum	0	1	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0
66	Calditerrivibrio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
67	Catellibacterium	0	1	0	0	0	0	0	0	3	5	2	2
68	Caulobacter	2	1	2	2	0	1	0	0	1	1	1	1
69	Cetobacterium	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
70	Chitinophaga	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
71	Chlorobaculum	1	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
72	Chromobacterium	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	2
73	Chryseobacterium	0	1	1	2	0	1	2	2	3	2	3	2
74	Cloacibacterium	20	8	13	13	0	0	0	0	4	2	4	1
75	Clostridium_III	1	2	0	5	1	0	1	2	0	0	2	2
76	Clostridium_IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
77	Clostridium_sensu_stricto	1	2	1	11	2	1	1	4	1	6	6	1
78	Clostridium_XI	0	2	0	1	0	0	1	0	4	2	2	2
79	Clostridium_XIVa	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Continuação...

Item	Nome de Gêneros	Nº de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
80	Comamonas	1	2	1	2	0	1	0	0	2	3	3	2
81	Conexibacter	0	0	0	0	2	4	0	2	0	0	0	0
82	Corynebacterium	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
83	Coxiella	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
84	Craurococcus	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
85	Cryptosporangium	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	Cupriavidus	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
87	Curvibacter	1	0	0	0	2	2	2	2	2	1	2	4
88	Cystobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
89	Dechloromonas	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	5
90	Defluviicoccus	1	2	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0
91	Dehalogenimonas	1	0	0	5	16	1	0	26	2	2	5	2
92	Delftia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
93	Denitratisoma	1	1	0	1	2	1	0	3	2	2	3	1
94	Derxia	2	1	1	1	0	0	1	3	1	1	3	1
95	Desulfobacca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
96	Desulfobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
97	Desulfobulbus	1	1	1	3	0	0	0	0	5	3	4	4
98	Desulfomicrobium	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
99	Desulfomonile	0	1	1	3	4	1	1	4	4	7	8	1
100	Desulfovibrio	3	9	5	10	0	4	5	3	9	3	6	3
101	Desulfovirga	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
102	Desulfuromonas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
103	Devosia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
104	Diaphorobacter	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
105	Dongia	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3	2
106	Duganella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
107	Dyadobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
108	Dyella	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
109	Dysgonomonas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	Elizabethkingia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
111	Elusimicrobium	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	3
112	Empedobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
113	Epilithonimonas	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
114	Erythromicrobium	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	Exiguobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
116	Ferruginibacter	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
117	Fervidobacterium	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
118	Fibrobacter	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
119	Flavobacterium	1	5	2	5	0	0	0	0	8	3	10	2

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique Efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
120	Flavonifractor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
121	Fluviicola	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1
122	Formivibrio	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
123	Geminicoccus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
124	Gemmatimonas	3	0	0	0	1	0	2	2	1	1	2	3
125	Geobacter	14	18	19	13	98	42	80	76	71	44	86	53
126	Geodermatophilus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	Geopsychrobacter	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128	Georgfuchsia	0	0	0	0	2	1	4	3	0	0	0	0
129	Geothrix	1	2	3	6	37	15	21	40	10	6	14	6
130	Giesbergeria	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131	Gordonia	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
132	Gp1	5	7	3	10	54	31	91	85	20	12	30	16
133	Gp2	0	0	0	0	19	12	13	21	4	2	15	4
134	Gp3	11	16	7	12	111	37	51	142	31	38	42	25
135	Gp5	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	3	0
136	Gp6	0	1	0	0	0	2	0	4	3	2	2	4
137	Gp7	0	1	0	1	10	5	9	15	2	2	7	3
138	Gp10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
139	Gp11	1	1	3	3	4	4	3	4	0	0	7	3
140	Gp12	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
141	Gp13	0	0	1	1	6	1	0	18	0	0	5	2
142	Gp15	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
143	Gp16	0	0	0	0	1	0	1	3	0	2	0	0
144	Gp17	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	2	1
145	Gp18	0	1	1	3	4	0	2	6	1	4	8	8
146	Gp21	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147	Gp22	4	3	2	4	8	0	0	8	1	11	9	15
148	Gp23	0	1	2	0	2	1	0	2	1	2	1	1
149	Gracilibacter	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150	Granulibacter	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
151	Heliothrix	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
152	Herbaspirillum	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
153	Holophaga	0	0	0	1	17	6	21	13	2	0	2	3
154	Humicoccus	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
155	Hydrogenophaga	2	2	4	4	0	0	1	0	4	2	4	5
156	Hymenobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
157	Hyphomicrobium	2	1	0	1	2	1	3	2	3	2	3	2
158	Iamia	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
159	Ignavibacterium	1	3	3	3	8	0	7	6	2	1	4	3
160	Ilumatobacter	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	0

Continuação...

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
161	Kaistia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
162	Kofleria	0	0	1	1	1	0	2	6	2	3	3	2
163	Krasilnikovia	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164	Ktedonobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
165	Labrys	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0
166	Lacibacter	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
167	Lactococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1
168	Leadbetterella	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
169	Legionella	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0
170	Leptothrix	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
171	Leucobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
172	Limnohabitans	0	0	0	0	3	2	1	2	0	2	2	1
173	Longilinea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
174	Lysobacter	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
175	Magnetospirillum	3	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	1
176	Malikia	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
177	Marmoricola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
178	Massilia	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
179	Meiothermus	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
180	Meniscus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
181	Mesorhizobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
182	Methylobacter	0	0	0	0	3	2	2	4	4	2	6	3
183	Methylobacterium	0	1	1	0	1	2	0	0	0	3	0	1
184	Methylocapsa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
185	Methylocella	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
186	Methylococcus	1	0	0	3	1	2	1	4	1	0	2	1
187	Methylocystis	2	2	1	1	11	6	5	7	7	3	3	2
188	Methylomonas	0	1	1	0	1	3	6	5	6	7	5	7
189	Methylophilus	1	0	2	4	0	0	0	0	5	9	8	12
190	Methylosarcina	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
191	Methylotenera	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
192	Methyloversatilis	2	3	1	2	1	0	1	1	4	2	4	1
193	Methylovorus	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
194	Methylovulum	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1
195	Microvirga	1	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0
196	Mucilaginibacter	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0
197	Mycobacterium	2	5	4	6	1	2	0	1	2	5	2	1
198	Myxococcus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
199	Não Classificados	722	1074	710	1446	1993	954	1502	2972	1398	1574	2057	1342
200	Neochlamydia	0	0	0	0	2	0	1	1	1	2	2	1

Continuação...

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
201	Nevskia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
202	Niabella	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
203	Niastella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
204	Nocardioides	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0
205	Novosphingobium	6	6	6	5	2	2	1	3	4	3	3	3
206	Ochrobactrum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
207	Ohtaekwangia	0	0	0	1	2	0	1	2	0	0	2	0
208	Oxalicibacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
209	Paenibacillus	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
210	Paludibacter	1	1	1	5	4	3	9	4	1	1	3	2
211	Parabacteroides	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
212	Paracoccus	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
213	Parasegetibacter	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
214	Pedomicrobium	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	1
215	Pelobacter	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
216	Pelomonas	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	2	1
217	Peredibacter	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
218	Petrobacter	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1
219	Phaselicystis	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
220	Phenylobacterium	2	2	1	2	7	6	7	7	3	1	5	0
221	Phycococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
222	Pimelobacter	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
223	Piscinibacter	2	2	1	1	0	0	0	1	2	2	1	1
224	Pleomorphomonas	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1
225	Polaromonas	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
226	Polynucleobacter	0	0	0	2	14	8	11	15	2	5	4	2
227	Porphyrobacter	0	2	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0
228	Prevotella	0	1	1	4	0	0	2	0	0	0	1	0
229	Propionivibrio	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
230	Proteiniclasticum	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0
231	Proteiniphilum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
232	Pseudacidovorax	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
233	Pseudolabrys	0	0	0	1	2	1	1	4	1	2	1	1
234	Pseudomonas	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1
235	Pseudonocardia	1	4	1	2	0	0	0	0	0	1	1	1
236	Pseudorhodoferax	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
237	Pseudoxanthomonas	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
238	Ralstonia	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
239	Rhizobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
240	Rhizobium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
241	Rhizomicrobium	0	0	0	0	5	3	15	8	0	0	0	0

Continuação...

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
242	Rhodobacter	2	2	3	2	0	0	0	0	4	4	4	2
243	Rhodoblastus	1	1	0	1	5	2	3	2	1	3	4	1
244	Rhodomicrobium	0	0	0	1	14	8	5	4	2	2	3	3
245	Rhodopila	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
246	Rhodoplanes	0	2	1	2	1	1	1	1	2	3	0	0
247	Rhodopseudomonas	2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	2
248	Rhodospirillum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
249	Rhodovarius	4	4	1	2	0	0	0	0	3	1	2	1
250	Rickettsia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
251	Roseateles	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0
252	Roseomonas	4	4	4	2	0	1	3	0	5	4	3	2
253	Rubellimicrobium	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
254	Rubritepida	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
255	Rubrividax	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	Rubrobacter	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
257	Runella	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
258	Saccharofermentans	1	5	1	6	0	0	0	1	0	3	2	2
259	Sandaracinobacter	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
260	Sandarakinorhabdus	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
261	Sarcina	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
262	Sediminibacterium	0	1	0	1	2	0	2	0	0	0	2	1
263	Shinella	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
264	Silanimonas	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
265	Singulisphaera	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
266	Sinomonas	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
267	Smaragdicooccus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
268	Smithella	0	0	0	2	3	1	4	3	2	0	1	0
269	Soehngenia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
270	Solirubrobacter	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
271	Sphaerotilus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
272	Sphingobacterium	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
273	Sphingobium	0	3	4	2	0	0	0	0	2	1	0	1
274	Sphingomonas	0	2	1	2	0	0	1	1	1	2	2	0
275	Sphingopyxis	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
276	Sphingosinella	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
277	Spirillum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
278	Spirochaeta	1	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0
279	Sporacetigenium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
280	Sporichthya	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
281	Sporobacter	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
282	SR1_genus_incertae_sedis	2	3	0	1	0	0	0	2	1	0	1	1

Continuação...

N°	Gêneros	N° de Sequências totais por amostra											
		Dique efluentes				Igarapé Natural				Igarapé com Efluente			
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
283	Stella	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0
284	Stenotrophomonas	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
285	Steroidobacter	1	1	1	1	3	1	1	6	1	1	5	0
286	Stigmatella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
287	Streptomyces	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
288	Sulfuritalea	0	0	1	1	1	2	3	5	2	4	3	3
289	Sulfurospirillum	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
290	Syntrophobacter	1	4	2	4	5	0	1	3	2	4	2	4
291	Syntrophobotulus	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
292	Syntrophomonas	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0	1	0
293	Syntrophorhabdus	15	17	11	23	10	0	3	8	12	14	14	13
294	Syntrophus	3	2	2	4	3	0	2	4	0	2	3	3
295	Telmatospirillum	0	1	0	0	6	10	6	9	0	0	1	0
296	Tepidibacter	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
297	Tepidicella	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
298	Tepidiphilus	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
299	Terrimonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
300	Thauera	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2	2	3
301	Thermodesulfovibrio	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
302	Thermoleophilum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
303	Thermomonas	1	3	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0
304	Thermovirga	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
305	Thiobacillus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1
306	Thiothrix	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
307	Tissierella	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	TM7_genus_incertae_sedis	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
309	Treponema	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
310	Trichococcus	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	Turcibacter	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
312	Turneriella	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
313	Uliginosibacterium	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
314	Undibacterium	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
315	Vampirovibrio	0	0	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0
316	Variovorax	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
317	Victivallis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
318	Vogesella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
319	Williamsia	1	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1
320	WS3_genus_incertae_sedis	2	2	2	4	0	0	0	2	1	1	2	2
321	Xanthobacter	1	3	1	0	0	0	0	0	6	4	2	3
322	Zoogloea	3	2	4	5	0	0	0	0	4	2	5	4