



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Caracterização da microbiota bacteriana da água do rio Negro em diferentes
períodos sazonais.**

Rogério de Oliveira Neves

Manaus – AM
Março/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rogério de Oliveira Neves

Caracterização da microbiota bacteriana da água do rio Negro em diferentes
períodos sazonais.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus – AM
Março/2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N518c Neves, Rogério de Oliveira
Caracterização da microbiota bacteriana da água do rio Negro em diferentes períodos sazonais. / Rogério de Oliveira Neves. 2013. 92 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Spartaco Astolfi Filho
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Diversidade. 2. regiões hipervariáveis. 3. gene rRNA 16S. 4. sequenciamento. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico a minha família, a
minha noiva Natália Moura
Carvalho e à Deus este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carmem de Oliveira Neves e Carlos Roberto Neves.

Ao meu orientador Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho.

Aos meus amigos do Centro de Apoio Multidisciplinar - CAM, Laboratório de Tecnologia do DNA, Universidade Federal do Amazonas.

Aos meus colaboradores Prof. Dr. Daniel Saito, Prof. Dr. Jean Charles da Cunha Peixoto pelo apoio constante e sugestões.

Aos meus amigos Prof. Msc. Edson Junior do Carmo, Prof. Msc. Ítalo Thiago Silveira Rocha, Msc Tiago Santos de Oliveira.

Aos meus irmãos Roberto de Oliveira Neves e Robson de Oliveira Neves.

As minhas sobrinhas Camile Vitória Neves, Lívia Neves e Nicole Neves.

Ao meu filho Pablo Felipe Mendonça Neves.

Minha noiva Natália Carvalho e sua família.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Sistemas aquáticos	18
2.2	Bacia Amazônica	19
2.3	Rio Negro	20
2.4	Diversidade dos procariotos e os ciclos biogeoquímicos	21
2.4.1	Domínio Bactéria	22
2.4.2	Filo Protobacteria	23
2.4.3	α – Proteobacteria	23
2.4.4	β – Proteobacteria	23
2.4.5	γ – Proteobacteria	24
2.4.6	δ – Proteobacteria	24
2.4.7	ε – Proteobacteria	25
2.4.8	Filo Firmicutes	25
2.4.9	Filo Actiniobacteria	25
2.5	Domínio Archaea	25
2.6	Abordagem Metagenômica	26
2.7	Análise da diversidade bacteriana	26
2.8	A plataforma de sequenciamento de nova geração 454 Roche®	28
2.9	Ferramenta de Bioinformática, Algoritmos e Estimadores	29
3	HIPOTESE	31
4	OBJETIVOS	31
4.1	Geral	31
4.2	Específicos	31
5	JUSTIFICATIVA	32
6	MATERIAL E MÉTODOS	34
6.1	Coleta de água do rio Negro	34
6.2	Isolamento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do rio	37

	Negro	
6.3	Extração do DNA total	31
6.4	Reação de Amplificação do gene rRNA 16S	38
6.5	Purificação dos <i>Amplicons</i>	39
6.6	Sequenciamento dos <i>Amplicons</i> do gene rRNA 16S	40
6.7	Processamento e análise das sequências	40
7	RESULTADO E DISCUSSÃO	42
7.1	Isolamento das Unidades Formadoras de Colônias - UFC	42
7.2	Abordagem Molecular	51
7.2.1	Extração do DNA total e quantificação	51
7.2.2	Amplificação do gene rRNA 16S	51
7.2.3	Purificação dos <i>Amplicons</i>	52
7.2.4	Quantificação dos <i>Amplicons</i> purificados	53
7.2.5	Sequenciamento dos <i>Amplicons</i> do gene rRNA 16S	54
7.2.6	Análise da diversidade das comunidades microbianas	56
7.2.7	Análise Taxonômica	56
7.2.8	Análise de Riqueza e Diversidade de OTU's	60
8	CONCLUSÃO	63
9	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	64
	APÊNDICE	70

Lista de figuras

- Figura 1:** Foto de satélite do sítio de coleta georeferenciado no rio Negro. Fonte Google earth. **36**
- Figura 2:** Garrafa de coleta de água. **37**
- Figura 3:** Unidades Formadoras de Colônias do rio Negro 23/01/2012 cultivados em LB ¼. **43**
- Figura 4:** Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL do rio Negro em períodos sazonais do nível hidrológico. **49**
- Figura 5:** Total de *Chromobacterium violaceum* isoladas por mL em períodos sazonais do nível hidrológico do rio Negro com meio de cultura LB 1/4. **50**
- Figura 6:** Perfil eletroforetico do DNA total extraído das amostras RN2 e RN3 do rio Negro em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de etídio, 18/01/2012. **51**
- Figura 7:** Perfil eletroforetico dos Amplicons do gene rRNA 16S das amostras do rio Negro (RN2 e RN3) em agarose 0.9 % corado com brometo de etídio. Ladder DNA 1Kb Promega, 24/02/2012. C+ controle positivo, C- controle negativo da reação. **52**
- Figura 8:** Perfil eletroforético do DNA purificação da amostra RN2 do rio Negro em gel de agarose 0.9 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb Invitrogen, 26/03/2012. **53**
- Figura 9:** Perfil eletroforético do DNA purificação da amostra RN3 do rio Negro em gel de agarose 0.9 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb Invitrogen, 27/03/2012. **53**
- Figura 10:** Perfil eletroforético da quantificação dos amplicons purificados das amostras (RN2 e RN3), em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb **54**

Invitrogen, no dia 27/03/2012.

- Figura 11:** Mapa das regiões hipervariáveis variáveis V1 a V9 do gene rRNA 16S de *E. coli*. Fonte: www.bioinformatics-toolkit.org/help/topics/hypervariableRegions.html **56**
- Figura 12:** Porcentagem de bactérias pertencentes aos filos das bibliotecas do rio Negro classificados pelo programa MultiClassifier do RDPX. **60**
- Figura 13:** Índice de diversidade e riqueza de espécies das amostras do rio Negro no período de cheia (RN2 27/07/2011) e vazante (RN3 22/10/2011) de 2011, calculado pelo programa Mothur. **62**
- Figura 14:** Curva de rarefação de OTU's das bibliotecas do rio Negro no período de cheia (RN2 27/07/2011) e vazante (RN3 22/10/2011). **62**
- Figura 15:** Parâmetros Físico-químicos do rio Negro coletados em 2006. Fonte: Souza, A.K.F., 2008, dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas. **71**

Lista de tabelas

Tabela 1:	Estudos relacionados à estrutura de comunidade e diversidade microbiana com abordagem das regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S.	28
Tabela 2A:	Representação geográfica dos pontos de coleta das amostras de água do rio Negro (28/07/2012 RN2 e 22/10/2012 RN3).	34
Tabela 2B:	Representação geográfica dos pontos de coleta das amostras de água do rio Negro.	35
Tabela 3:	Iniciadores utilizados para amplificar as regiões variáveis do gene rRNA16S.	39
Tabela 4:	Parâmetros físico-químicos do rio Negro no decorrer das coletas.	42
Tabela 5:	Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL das amostras do rio Negro em pontos.	44
Tabela 6:	Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL das amostras do rio Negro em profundidades.	45
Tabela 7:	Isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> das amostras do rio Negro por ponto e quantidade total/mL.	46
Tabela 8:	Isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> das amostras do rio Negro por profundidade e quantidade total/mL.	47
Tabela 9:	Sumário dos resultados do sequenciamento da amostra RN2 (RN 28/07/2011) do rio Negro.	55
Tabela 10:	Sumário dos resultados do sequenciamento da amostra RN3 (RN 22/10/2011) do rio Negro.	55
Tabela 11:	Índice de diversidade e riqueza de espécies das amostras do rio Negro no período de cheia (RN2 27/07/2011) e	72

vazante (RN3 22/10/2011) de 2011, calculado pelo programa Mothur.

- Tabela 12:** Agrupamento em OTU's de gêneros classificadas pelo programa Mothur da biblioteca RN2 (27/07/2011) (Apêndice). **72**
- Tabela 13:** Agrupamento em OTU's de gêneros classificadas pelo programa Mothur da biblioteca RN3 (22/10/2011) (Apêndice). **76**
- Tabela 14:** Classificação em nível de gênero pelo MultiClassifier do RDPX das bibliotecas do rio Negro (Apêndice). **81**

Lista de Abreviaturas e Siglas

UFC: Unidades Formadoras de Colônias.

OTU: Unidades Taxonômicas Operacionais.

RN 2: Rio Negro – coleta de amostra no rio em 28/07/2011.

RN 3: Rio Negro – coleta de amostra no rio em 22/10/2011.

SIPAM: Sistema de Proteção da Amazônia.

CPRM: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ORF: Matriz aberta de leitura.

PCR: Reação em Cadeia da Taq. DNA Polimerase.

Barcode: Código de barras.

PVC: Poli Cloreto de Vinila.

LB: Luria e Bertani.

α: Alpha.

β: Beta.

γ: Gama

δ: Delta

ε: Epsilon

V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9: Regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S.

RDP 10 : Ribossomal Database Project.

Dotur/ Mothur: Programa de computador para calcular diversidade e riqueza de espécies.

WS3: Filo do domínio Bactéria.

TM7: Filo do domínio Bactéria.

Gp3: Gênero do filo Acidobacteria.

TSS: Total de sólidos suspensos.

Resumo

A comunidade de microrganismos do sistema aquático dos rios Solimões e Negro, bem como a diversidade destes ecossistemas não foram exaustivamente estudadas até o momento. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota bacteriana do rio Negro em relação a sazonalidade, tanto em seu aspecto quantitativo (contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFCs) e no qualitativo (identificação taxonômica via sequenciamento do DNA codificador do RNA de pequena subunidade ribossomal SSU-rRNA). Amostras de água do rio Negro foram coletadas em cinco diferentes pontos, em 4 profundidades e em 5 datas de diferentes épocas do ano, sendo que de todas amostras as UFCs foram contadas. O DNA total foi extraído da biomassa contida na água do rio Negro em períodos de cheia (RN2) e vazante (RN3) e analisado espectrofotometricamente e por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Foram amplificadas as regiões variáveis V3 e V4 do SSU-rRNA por PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase) e os amplicons foram sequenciados por pirosequenciamento utilizando o equipamento 454 (Roche®). Os arquivos brutos das bibliotecas RN2 e RN3 do Rio Negro foram submetidas à suíte do programa Mothur para o controle de qualidade, alinhamento das sequências, cálculo das distâncias genéticas e definição das Unidades Taxonômicas Operacionais – OTUs, além de, estimativa da riqueza e diversidade das espécies. Pela contagem de UFCs foi possível comparar o número de bactérias cultiváveis nos diferentes pontos de coleta e em função da sazonalidade. Pela análise molecular verificou-se que o filo Proteobacteria mostrou-se dominante nestas duas coletas do rio (cheia e vazante), os gêneros dominantes deste filo na cheia foram *Limnohabitans*, *Methylomonas*, e outro filo expressivo foi Acidobacteria do gênero *Gp3*. No período de vazante os gêneros abundantes foram *Polynucleobacter*, *Acinetobacter* e *Curvibacter*, dentro do filo Proteobacteria. As curvas de rarefação demonstraram que a biblioteca RN3 é mais diversa em número de espécies do que a biblioteca RN2 e confirmado pelo índice de Shannon e InvSimpson. Pode-se observar a partir dos índices de ACE e Cha 1 que a biblioteca RN3 é mais rica em espécies comparada com a RN2.

Palavras chave: Diversidade, regiões hipervariáveis, gene rRNA 16S, sequenciamento.

Abstract

The microorganisms of the community aquatic system of the Solimões and Negro rivers, as well as the diversity of these ecosystems have not been thoroughly investigated so far. The aim of this study was to characterize the bacterial microbiota of the Negro River in relation to seasonality, both in its quantitative aspect (forming units count colonies - CFUs) and qualitative (taxonomic identification via DNA sequencing RNA encoding small ribosomal subunit SSU -rRNA). Negro River water samples were collected at five different points on 4 and 5 depths dates from different times of the year, and all samples CFUs were counted. Total DNA was extracted from the biomass contained in the water of the Negro in full periods (RN2) and receding (RN3) and analyzed spectrophotometrically and by agarose gel electrophoresis 0.8%. They were amplified variable regions V3 and V4 SSU-rRNA PCR (Reaction Polymerase Chain DNA) and the amplicons were sequenced by pyrosequencing using equipment 454 (Roche®). Files (reading DNA) of RN2 and Rio Negro RN3 libraries were submitted to the Mothur program suite for quality control, alignment of sequences, calculation of genetic distances and definition of Operational Taxonomic Units - OTUs, plus an estimate of the richness and diversity of species. The CFU count was possible to compare the number of culturable bacteria in the different collection points and due to seasonality. By molecular analysis we found that the phylum Proteobacteria proved dominant in these two collections of the river (full and low tide), the dominant genera of this phylum in full were *Limnohabitans*, *Methylomonas*, and other expressive filo was Acidobacteria the GP3 race. In the ebb period abundant genera were *Polynucleobacter*, *Acinetobacter* and *Curvibacter* within the phylum Proteobacteria. Rarefaction curves demonstrated that RN3 library is more diverse in number of species than the RN2 library and confirmed by Shannon and InvSimpson index. It can be seen from the ACE 1 indexes and Cha RN3 the library is richer in species compared to RN2.

Keywords: Diversity, hypervariable regions, 16S rRNA gene, sequencing.

1 INTRODUÇÃO

As mudanças sazonais do nível hidrológico da bacia Amazônica são influenciadas pelos eventos naturais El Niño, que aquece a superfície das águas costeiras da América do Sul, seguida por La Niña, que é marcado por períodos de ventos fortes que acentuam as correntes marítimas e é caracterizado por chuvas fortes em muitas regiões dos trópicos, seca moderada ou intenso nas regiões temperadas do norte e aumento da atividade de furacões no Oceano Atlântico Norte (Ricklefs, 2001).

O rio Negro é um dos principais rios da bacia Amazônica, sendo responsável por 14% do volume de água desta. Nasce na região pré-Andina da Colômbia, e seu curso de água passa por planície antiga, o que resulta na concentração reduzida de íons inorgânicos em suspensão e nutrientes minerais deste bioma (Sioli, 1984).

Os biomas aquáticos de água doce contêm diferenças de temperatura e densidade da água, são classificados de epilímnio e hipolímnio. O epilímnio é caracterizado por água quente, aerada com oxigênio atmosférico, fotossíntese, alta concentração de nutrientes minerais e atividade biológica que ocorre na faixa de 5 a 20 metros abaixo da superfície. O hipolímnio é caracterizado por água fria, profunda, com baixa concentração de nutrientes minerais e oxigênio (Ricklefs, 2001). E estes fatores químicos e físicos são fundamentais para a organização da estrutura da comunidade de microrganismos e diversidade.

Para inferência da biodiversidade destes habitats são necessários quantificar a diversidade de organismos nestes sistemas aquáticos locais (diversidade alfa) ou regionais (diversidade beta) incluindo a frequência gênica, unidade taxonômica e o endemismo. Rai & Hill (1978) conseguiram isolar microrganismos do rio Amazonas, próximo a cidade de Manaus, utilizando o método de cultivo clássico e contagem de UFC's (Unidade formadora de colônias) e Praça *et al.*, (2009) isolou *Bacillus thuringiensis* do solo para bioprospecção de bioativos contra lagarta de *Spodoptera frugiper* da praga do milho, *A. gemmatilis* praga da soja, entre outras e encontraram esporos e cristais que causaram mortalidade de 50 % das lagartas. O método de cultivo clássico é utilizado para bioprospectar biomoléculas com aplicação biotecnológica de vários ecossistemas e o *screening* de isolados tem objetivo de identificar a produção e secreção destas biomoléculas ativas por bioensaios rápidos

e diretos, mas é limitado quando se busca os índices de diversidade e riqueza, portanto a caracterização da microbiota do rio Negro é importante para descobrir como está organizada a comunidade bacteriana, estudar as vias metabólicas das biomoléculas com potencial biotecnológico, calcular a diversidade e riqueza de espécies.

A caracterização da microbiota pela abordagem Metagenômica é possível, com o acesso a um conjunto de genomas de microorganismos, como um todo, possibilitando isolar gene e manipulá-los para estudos da estrutura da comunidade, diversidade microbiana (Handelsman, 2004) e expressão gênica. Peixoto *et al.*, (2011) compararam a diversidade da microbiota entre os rios Solimões e Negro pela abordagem da amplificação do gene rRNA 16S e identificaram 11 gêneros diferentes no rio Solimões e 4 gêneros diferentes no rio Negro, demonstrando que os dois habitats aquáticos compartilharam 2 gêneros. Ghai *et al.*, (2011) estudaram a diversidade microbiana do rio Solimões por abordagem Metagenômica, e neste trabalho o domínio bactéria foi representado pelos filos Actinobacteria e Proteobacteria (alfa, beta e gama) e ainda encontram o domínio Archaea, provavelmente a sazonalidade destes sistemas aquáticos está influenciando a diversidade.

Do exposto, observa-se que há uma lacuna na abrangência de conhecimentos da diversidade genética e a estrutura da população de microrganismo no ecossistema aquático da Amazônia (rio Negro).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi, a partir do isolamento de UFC, a caracterização molecular da microbiota aquática do rio Negro por abordagem Metagenômica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemas aquáticos

Os sistemas aquáticos são classificados em águas corrente, lagos, estuários e oceanos e as características físico-químicas são baseadas em concentrações de minerais, hidrogeniônica, matéria orgânica dissolvida ou suspensa, movimentação das águas e profundidade.

As águas correntes são formadas onde há precipitação pluvial em excesso e baixa evaporação e estas condições são fundamentais para a lixiviação de partículas rochosa, silte e material orgânico. Dentro do contexto, as pequenas correntes fluviais são importantes para o transporte de material orgânico de origem vegetal que entram no sistema aquático e é denominado de material alóctone. Já o material orgânico autóctone é formado pelo encontro de correntes fluviais ricas em carbono orgânico, sais minerais e compostos recalcitrantes e que conseqüentemente alaga grandes áreas, e assim surge o rios, igapós, várzeas e lagos que quanto maior for, maior sua produção interna de compostos orgânica autóctone (Ricklefs 2001).

Os lagos são subdivididos em regiões (zona litoral, zona limnética e zona bentônica) e cada qual com suas principais características, a zona litoral é rasa em torno da margem com vegetação enraizada, a zona limnética, onde se encontra as algas unicelulares flutuantes ou fitoplânctons, os sedimentos no fundo dos lagos e poças que constituem a zona bentônica e a variação fluvial está relacionada com as precipitações (Ricklefs 2001).

A movimentação sazonal do equador solar para norte e para sul determina a sazonalidade de chuvas, a convergência intertropical segue o equador solar produz um cinturão móvel de precipitação à altitude de 20° a norte e sul do Equador. O El Niño com fortes ventos trazem as correntes equatoriais para oeste, com isso, eleva a temperatura d'água do mar da costa do Peru entre intervalos regulares de 2 a 10 anos. Conseqüentemente é formada La Niña com períodos de fortes ventos que trazem climas extremos para boa parte do mundo, caracteriza-se por chuvas intensas nas regiões tropicais, seca nas regiões temperadas do norte e furacões no Oceano Atlântico Norte (Ricklefs 2001).

De acordo com o acompanhamento metrológico das distribuições das precipitações na região norte durante as primeiras duas semanas do mês de Dezembro de 2011 foram acima do normal nos estados de Tocantins, Mato Grosso, Rondônia, Acre, sul e oeste do Amazonas e sul do Pará com 300 mm acima do normal para o período e durante este período ocorreu à atuação da Zona de Convergência do Atlântico Sul que influenciou o acumulo significativo da chuva na região Norte do Brasil e contribuiu para a maior cheia da Bacia Amazônica em 2012 (CPRM – Serviço Geológico do Brasil).

2.2 Bacia Amazônica

A bacia Amazônica é a maior e mais densa rede fluvial do mundo com cerca de 7×10^6 Km² de extensão e vazão de 209.000 m³/segundo (Moreira-Turcq *et al.*, 2003). Sua formação geológica iniciou-se por volta de 10.000 a 12.000 anos atrás com base no calendário do ¹⁴C (Maslin *et al.*, 2000). Esta bacia contribui com cerca de 20% da descarga mundial de água doce nos oceanos e mares. O rio Solimões-Amazonas é o coletor final deste complexo sistema de drenagem, sendo formado por um incontável número de igarapés, riachos, córregos, várzeas alagadas e rios (Santos & Ferreira, 1999).

Os rios amazônicos são classificados de acordo com suas propriedades físicas e químicas de seus cursos. Com base nestas características Sioli (1975, 1976, 1984) classificou as águas da bacia Amazônica como águas claras, brancas e pretas.

Os rios de água branca apresentam águas turvas com coloração barrenta e transparência entre 0.10 e 0.50 m. Nasce na região Andina ou Pré-Andina, carregando altas cargas de sedimentos em suspensão devido à erosão do solo nas cabeceiras e a sua concentração de sedimentos é de 0,1 g/L. O pH destes rios é quase neutro, com variação de 6.5 a 7.0. Segundo Moreira-Turcq *et al.* (2003), no período de abril de 1996, a concentração total de sólidos suspensos (TSS) na sub-bacia de águas brancas foi de 7.5 mg/L e em julho houve um aumento no TSS, apresentando 22.7 mg/L. São exemplares destes rios o Solimões-Amazonas, Madeira, Purus, Juruá, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

Os rios de água clara apresentam águas de coloração verde a verde-oliva e transparência entre 1.10 a 4.50 m. Eles nascem nos maciços pré-cambrianos das Guianas e do Brasil central e devido à presença do relevo mais regular, oferecem pouca possibilidade de erosão. O pH destes rios varia entre 4.5 a 7.0. Como estas regiões contêm as estações de seca e chuvosa bem definida, estes rios carregam material orgânico ou inorgânico em suspensão em quantidade apreciável no período chuvoso. A concentração média do total de sólidos suspensos é 7.2 mg/L do rio Tapajós e Xingu e para o rio Trombetas a média é 8 mg/L (Moreira-Turcq *et al.*, 2003). São exemplares os rios Tapajós, Xingu, Trombetas, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

Os rios de água preta apresentam coloração marrom e transparência entre 1.30 a 2.90 m. Nasce nos escudos da Guiana e do Brasil central onde o relevo é suave e os processos de erosão são poucos intensos e reduzidos pela densa mata pluvial e a carga de sedimento é baixa e com a ausência de cálcio e magnésio na formação geológica. As águas são ácidas com o pH entre 3.0 a 5.0 e há pobreza em sais minerais. A coloração escura é provocada pela decomposição de material orgânico produzindo pelas florestas, resultando em vários produtos solúveis como os ácidos húmicos e fúlvicos. São exemplos os rios: Negro, Uatumã, Preto da Eva, Urubu, Cururu, entre outros (Santos & Ferreira, 1999).

2.3 Rio Negro

O rio Negro é o maior tributário do Amazonas e é considerado um dos maiores rios do mundo (Sioli, 1984), sendo responsável por 14% do volume de água da bacia amazônica. Nasce na região pré-Andina da Colômbia, entra em território brasileiro e encontra-se com o rio Solimões para formar o Amazonas, totalizando 7×10^6 km² de extensão (Sioli, 1984). Segundo Sioli (1976) o rio Negro é originário de uma peneplanície antiga, o que resulta na concentração reduzida de íons inorgânicos em suspensão na água.

Benetti *et al.*, (2003), através das técnicas de espectrofotometria de absorção atômica do carbono (GFAAS) e espectroscopia de emissão óptica de plasma (ICP-OES) de amostras de águas dos rios Negro, Solimões, Madeira e Amazonas, detectaram íons metálicos (Al, Fe, Cu, Na, K, Ca e Mg) em estado de partículas

(Me_P), estado coloidal (Me_C) e estado dissolvido (Me_D) nas amostras destes rios. No rio Negro, há baixa concentração de íons metálicos e partículas orgânicas em suspensão devido as suas propriedades físicas e químicas (Benetti *et al.*, 2003).

Segundo Moreira-Turcq *et al.* (2003) o fluxo de partículas e carbonos orgânicos dissolvidos dos rios amazônicos encontraram no rio Negro uma baixa carga de material orgânico em suspensão devido o seu pH ácido e alta concentração de ácidos húmicos e fúlvicos aumentando a concentração de carbono orgânico dissolvido na água. Deste modo, a presença de ácidos húmicos e fúlvicos é resultante da decomposição de matéria orgânica da vegetação produzindo uma coloração escura na água deste rio (Santos e Ferreira, 1999; Moreira-Turcq *et al.*, 2003).

Saliot *et al.*, (2001) encontraram no rio Negro composições e concentrações de esteróides, ácidos graxos, carbono orgânico e pigmentos diversos. Estes autores revelaram que a concentração de moléculas de esteróides foram 120 ng/L, de ácidos graxos foi 1500 ng/L, de carbono orgânico foi 1.9 ng/L e pigmentos foram 534.5 ng/L, e são essenciais para a organização e composição da microbiota bacteriana deste rio.

2.4 Diversidade dos procariotos e os ciclos biogeoquímicos

Os procariotos constituem um vasto grupo heterogêneo de organismos unicelulares, entre os quais incluem as bactérias e arqueas, que possuem tamanhos entre 0.2 a 2.0 μm de diâmetro e de 2 a 8 μm de comprimento. As bactérias são diferenciadas por vários fatores, incluindo a morfologia, composição química das biomoléculas, fatores necessários para o crescimento, atividades bioquímicas e fonte de energia. As arqueas sobrevivem em locais adversos da biosfera em condições extrema de pH, salinidade e temperatura. As bactérias são encontradas no trato digestivo de invertebrados e de vertebrados superiores, na superfície externa do corpo e nas mucosas. Encontra-se como simbiote em plantas colonizando o xilema, floema, a superfície externa e a camada interna das folhas, caules, raízes e rizosfera. Esta habilidade de sobreviver em diferentes habitats (solo, água do mar e doce, tecidos vegetais e tecidos animais) deve-se à sua diversidade metabólica e adaptação ao ambiente. Diferentes microrganismos podem usar uma

variedade de fontes de energia e carbono para crescer sob várias condições físicas e química diferentes (Tortora, 2005; Azevedo, 2008).

Com relação ao ciclo biogeoquímico, os elementos químicos são oxidados ou reduzidos por microrganismos para satisfazer suas necessidades energéticas utilizadas nas vias metabólicas. O ciclo biogeoquímico do carbono inicia com os autotróficos reduzindo dióxido de carbono (CO_2) e fixando o carbono em matéria orgânica utilizando energia solar ou química (fotossíntese). Em seguida, a matéria orgânica entra em contato com a microbiota aquática que irá incorporar ou fixar o dióxido de carbono através de microrganismos quimiotróficos ou fototróficos. O carbono retornará à atmosfera através de processos fermentativos ou decomposição da matéria orgânica. Assim, a energia química que é liberada na forma de CO_2 voltará ao ciclo biogeoquímico do carbono. Esta energia química é transportada para as reações enzimáticas das vias metabólicas de síntese de biomoléculas em processos anabólicos que consomem energia química, e os processos catabólicos degradam biomoléculas e liberam energia contida nas ligações químicas. Estas reações enzimáticas que consomem ou liberam energia química estão integradas no ciclo biogeoquímico do carbono e outros elementos químicos como o enxofre e nitrogênio (Tortora, 2005).

2.4.1 Domínio Bactéria

É amplamente distribuído nos continentes, mares e atmosfera e alguns grupos apresentam ocorrências limitadas em ambiente hostis (Ludwig *et al.*, 1997). Os representantes desses Domínios possuem ampla diversidade metabólica quanto à fonte de carbono (autotrófico e heterotrófico), o tipo de energia (luminosa – fototrófico, ou química – quimiotrófica), o tipo de substrato oxidável utilizado (orgânico – organotrófico, ou inorgânico – litotrófico) (Barbosa & Torres, 1998). Abrange a divisão Thermotogales (bactérias termofílicas); Flavobacteria; Cyanobacteria; Proteobacteria (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon), Gram positivas, Bactéria verdes não sulfurosas e Bactérias verdes sulfurosas.

O referencial para a classificação filogenética, fenotípica e informações ecológica do domínio Bactéria é encontrado no Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology, 2^o edição, 5^o volume (2002) que relata 2200 novas espécies e 390 novos gêneros e condições ideais de crescimento.

2.4.2 Filo Proteobacteria

O filo Proteobacteria tem origem etimológica da palavra grega “Proteu” que representa um Deus mitológico com capacidade de assumir várias formas e a classe se divide em 5 grupos Alfa (α), Beta (β), Gama (γ), Delta (δ) e Epsilon(ϵ), representa o maior grupo taxonômico de bactéria, concentrando a maioria das bactérias Gram negativas.

2.4.3 α – Proteobacteria

A classe da α – Proteobacteria em sua maioria são compostas pelos gêneros fototróficos, apresentam morfologia variada, são Gram-negativas, inclui a família Acetobacteraceae, as bactérias aeróbicas são utilizadas na indústria para converter etanol em ácido acético, foram encontradas no rio Solimões e Negro afluentes do rio Amazonas por Peixoto *et al.*, 2011.

2.4.4 β – Proteobacteria

A classe da β – Proteobacteria utiliza como nutrientes produtos da decomposição anaeróbica como gás metano, o gás hidrogênio e amônio. O gênero *Thiobacillus* é quimioautotrófico e obtém energia a partir da oxidação do enxofre reduzido, convertendo o H_2S e S^0 em SO_4^{2-} .

Brummer *et al.*, (2003) estudou a sazonalidade de dois rios poluídos com materiais pesados e a produção biofilmes da microbiota aquática e relatou que o domínio β – Proteobacteria dominou ao longo do ano entre as sequências analisadas de DNA do gene rRNA 16S e as bactérias deste gênero poderá ser utilizadas para o tratamento de biomassa poluidora.

Peixoto *et al.*, (2011) encontrou no rio Solimões e rio Negro, a família Burkholderiaceae e dentro do gênero *Burkholderia*, a espécie mais frequente é *Burkholderia cepacia* causadora de infecção hospitalar, a qual possui peculiaridade de crescer em ambientes desinfetados.

Dentro da classe β -Proteobacteria, encontra-se a espécie *Chromobacterium violaceum*. Os membros do gênero *Chromobacterium* são Gram-negativos com estrutura de bastonete de vida livre. São comumente isoladas de ambientes aquáticos, solo e bancos de areia amazônicos. Os representantes do gênero produzem um pigmento roxo classificado como violaceína, como descrito por Rettori & Dúran (1998), o qual contém várias aplicações biotecnológicas, sendo utilizado como fármaco de múltiplas finalidades e descrito como tendo ação antiparasitária, antibiótica, antiviral e antitumoral (Vasconcelos *et al.*, 2003).

2.4.5 γ – Proteobacteria

A classe da γ – Proteobacteria incluem os gêneros bacterianos que degradam substratos complexos, apresentam características fisiológicas versáteis, dentro destas espécies de interesse ambiental, industrial e principalmente médico encontram-se os membros de Enterobacteriales, Pseudomonadales, Pasteurelales, entre outras. Os representantes desse gênero são bastonetes Gram-negativos aeróbicos, possuem tufo de flagelos ou um flagelo polar único, as bactérias são isoladas do solo, ambiente aquático.

Peixoto *et al.*, (2011), encontraram no rio Solimões o gênero *Pseudomonas*, e este gênero sintetiza várias biomoléculas, com isso, aumenta a sua capacidade de metabolizar ampla variedade de substratos incomuns, atuam na decomposição de xenobióticos tais como hidrocarboneto de petróleo, pesticidas entre outros poluentes.

2.4.6 δ – Proteobacteria

A classe da δ – Proteobacteria abrange bactérias redutoras de enxofre, contribuem para a manutenção do ciclo biogeoquímico do enxofre, e predam as bactérias Gram-negativas e possivelmente poderá ser utilizado como agente de controle biológico de doenças vegetais e biorremediação de ambientes contaminados com enxofre. Dentre elas as bactérias do gênero *Desulfovibrio* reduzem substâncias orgânicas como ácidos graxos ou etanol.

2.4.7 ϵ – Proteobacteria

A classe da ϵ – Proteobacteria é integrante do grupo de bactérias Gram-negativas de características morfológicas de bacilo helicoidal, são microaerófilos e movimentam-se por meio de flagelos e a principal espécie desta classe é *Helicobacter pylori* que possui a morfologia de múltiplos flagelos e bastão recurvado, sendo apontado como causador de úlcera gástrica na espécie humana.

2.4.8 Filo Firmicutes

O filo Firmicutes inclui bactérias que possuem pseudomembranas exteriores porosas que as tornam Gram-positivas e alguns gêneros são aeróbicos ou anaeróbicos, produzem endósporos. Os gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacilos* são utilizados em processos biotecnológicos.

2.4.9 Filo Actinobacteria

O filo Actinobacteria agrupa bactérias Gram-positivas pleomórficas e morfologia filamentosa ramificada do gênero *Streptomyces*. O gênero *Mycobacterium* é morfologicamente semelhante aos bacilos, são isolados do solo e popularmente conhecidos como actinomicetos devido à ramificação dos filamentos que surgem na placa de crescimento semi-sólido e emite radiação multidirecionais.

2.5 Domínio Archaea

O Domínio Archaea anteriormente denominado de Arqueobactérias (Woese *et al.*, 1990) é composto por microrganismos procariotos evolutivamente distintos do domínio bactéria. As Archaea são procariotos que sobreviveram preferencialmente em ambiente inóspitos e extremos incluindo solo e ambientes aquáticos (Barns *et al.*, 1994). Compreende cinco divisões filogenéticas, que têm como representantes *Crenarchaeotas*, as quais contribuem para a redução do enxofre e abrange os microrganismos hipertermófilos; as *Korarchaeotas* que incluem microrganismos hipertermófilos pouco conhecidos (Hugenholtz *et al.*, 1998) e as *Euryarchaeotas* que englobam vários microrganismos halófilicos extremos, os quais foram encontrados no rio Solimões-Amazonas (Ghai *et al.*, 2011).

2.6 Abordagem Metagenômica

Os microrganismos são encontrados em vários ecossistemas, contribuindo com os ciclos biogeoquímicos de vários elementos naturais, com estimativa de 1.5×10^{10} células de procariotos por grama de solo (Wagner *et al.*, 1993). Estudos da diversidade microbiana com a abordagem cultivo-independente (Metagenômica) foram comparados com a análise de cultivo dependente abordagem clássica, demonstraram que a fração cultivável de uma população bacteriana não é quantitativa nem qualitativamente representativa da totalidade da comunidade microbiana do ambiente estudado (Wagner *et al.*, 1993; Felske *et al.*, 1999). Atualmente, as técnicas de extração de DNA permitem isolar o DNA total de amostras de solo (Macrae, 2000; Robe *et al.*, 2003), amostras de água do mar (Sorgin *et al.*, 2006) e amostras de ambiente aquático de água doce (Kenzaka *et al.*, 2001) com altas concentrações e grau de pureza que possibilitam a manipulação do material genético. As técnicas moleculares atuais revolucionaram um dos campos da Microbiologia moderna, denominado de Metagenômica. Conceitualmente, a Metagenômica é análise baseada no acesso do material genético e expressão funcional dos genomas coletivos de microrganismos contidos em uma amostra ambiental (Handelsman, 2005) e conseqüentemente o estudo da estrutura da comunidade de bactérias de ambientes naturais tornou-se mais abrangente e completo em decorrência da recuperação de genomas de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis presentes nos ambientes.

2.7 Análise da diversidade bacteriana

A identificação molecular de microrganismo iniciou-se na década de 70 estimulada pelas técnicas moleculares inovadoras de extração de DNA total, purificado com fenol, tratado com T1 ribonuclease, para análise do material genético extraído a two-dimensional paperelectrophoresis (eletroforese bidimensional de papel) desenvolvido por Sanger *et al.*, (1965) que auxiliaram a classificação taxonômica de bactérias cultiváveis (Fox *et al.*, 1977; Woese & Fox, 1977). O gene escolhido como marcador molecular é o que codifica à subunidade 16S do RNA ribossômico. Ele possui uma alternância entre regiões conservadas e hipervariáveis, classificadas de V1 a V9, e sendo utilizado como padrão no estudo da determinação

filogenética, avaliação da diversidade em amostras ambientais e quantificação e detecção de estruturas de comunidades microbianas (Head *et al.*, 1998). A escolha da sequência gênica (rRNA 16S) decorre do fato da mesma agrupar características necessárias para um bom marcador molecular que inclui a sua distribuição universal entre os procariotos, estrutura e função conservadas entre os táxons, ausência de transferência lateral, e tamanho (cerca de 1500 pb) suficiente para estudos filogenéticos (Amann & Ludwig, 2000). Estas características foram necessárias para geração de milhares de sequências que se encontram depositadas em bancos de dados públicos e permitiu maior uso do gene como marcador filogenético (Macrae, 2000).

Os vários trabalhos relacionados com o estudo da diversidade e estrutura de comunidades de microrganismos (tabela 1) utilizaram a PCR (Reação em Cadeia da DNA polimerase) para amplificar o gene rRNA 16S (Cottrell *et al.*, 2005) de amostras de DNA metagenômico de vários ambientes e sequenciaram os amplicons pela plataforma 454 que gera em torno de 1,6 milhões de sequências de 450 nucleotídeos em 8 horas de sequenciamento (Ronaghi, 2001; Carvalho & Silva, 2010).

Tabela 1: Estudos relacionados à estrutura de comunidade e diversidade microbiana com abordagem das regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S.

Fonte: Armougom & Raoult (2009).

Referências Bibliográfica	Regiões variáveis do gene rRNA 16S	Amostra
Roesch <i>et al.</i>, (2007)	V5 a V6	Amostras de solo
Will <i>et al.</i>, (2010)	V2 a V3	Amostras de solo
Nacke <i>et al.</i>, (2011)	V2 a V3	Amostras de solo
Keijser <i>et al.</i>, (2008)	V6	Cavidade oral
Sogin <i>et al.</i>, (2006)	V6	Mares profundos
Monstein <i>et al.</i>, (2001)	V1 a V2	Isolados clínicos
Andersson <i>et al.</i>, (2008)	V6	Úlcera no estômago
Huse <i>et al.</i>, (2007)	V6	Fontes hidrotermais
Engelbrektson <i>et al.</i>,(2010)	V1 a V2 e V8	Intestino posterior de cupins.

2.8 A plataforma de sequenciamento de nova geração 454 Roche

A plataforma 454 foi a primeira da nova geração a ser comercializada, o sistema opera com fragmentos de DNA de 450 pb que são ligados às microesferas por microsuptes (adaptadores A e B) inseridos na extremidade dos iniciadores para amplificar o gene rRNA 16S, necessárias para a PCR em emulsão. Cada micela (microrreator) produz muitas cópias idênticas de um fragmento de DNA isoladamente. Após a PCR de emulsão, as microesferas ligadas a vários clones de fita simples de DNA são depositadas em poços distintos de uma placa de sílica com

os componentes para o sequenciamento, que é realizado em ciclos. A cada ciclo, um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação, se o nucleotídeo adicionado for incorporado à reação em síntese, um sinal de luz é emitido, conseqüentemente a intensidade do sinal emitido é considerado o reflexo do número de nucleotídeos desse tipo específico que foram sucessivamente incorporados à molécula. O sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação de sequenciamento (Ronaghi, 2001; Carvalho & Silva, 2010).

Portanto, esta plataforma (454) tem sido amplamente utilizada para a inferência da diversidade genética, estrutura de comunidade de microrganismos, sequenciamento de genomas de eucariotos e procariotos.

2.9 Ferramentas de Bioinformática, Algoritmos e Estimadores.

O sequenciamento do gene rRNA 16S combinado com abordagens estatísticas podem fornecer informações detalhas da diversidade e comunidade de microrganismos, procurando estimar a diversidade microbiana através da diversidade de OTU's (Bohannan & Hughes, 2003). E aceita-se 97% de similaridade para a separação das espécies e sugere se o uso de outros genes como marcadores molecular para melhor resolução taxonômica (Gevers *et al.*, 2005).

A utilização de algoritmos específicos para o processamento de sequencias geradas por sequenciamento permite criar arquivos com posterior utilização em diferentes aplicativos, entre elas, a afiliação taxonômica através da comparação das sequencias depositadas nos bancos de dados públicos como RDP (Ribossomal Database Project) e o GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology).

Schloss e Handelsman (2005) desenvolveram o programa de computador que analisa a riqueza de espécies microbianas, o DOTUR (Distancia baseada em OTU), que utiliza a matriz de distancia gênica gerada pelo algoritmo do programa dnadist.exe do pacote PHYLIP (Felsenstein, 2007), como arquivo de entrada para o agrupamento e definição em UTO's das seqüências analisadas.

Schloss e colaboradores construíram o programa livre DOTUR, apartir deste, criaram o programa Mothur, o software contém vários algoritmos que calcula a qualidade das sequências, identificando os ruídos existentes nas bases de acordo

com os algoritmos do PyroNoise e Amplicon Noise. (<http://userweb.eng.gla.ac.uk/christopher.quince/Software/PyroNoise.html>)

As sequências de baixa qualidade contêm homopolímeros repetitivos ao longo da sequência, erros de amplificação do gene rRNA 16S e na reação de sequenciamento em emulsão, reduzindo a qualidade do alinhamento, filtragem das sequências e prejudica a filiação taxonômica, pelo aumento do número de sequências não classificadas, gerando falsos índices de riqueza e diversidade de espécies (Huse *et al.*, 2007; White *et al.*, 2010). Em um conjunto de sequências recuperadas após o controle de qualidade de maneira rápido e confiável foi possível o cálculo para a construção da curva de rarefação, estimativa de riqueza e índice de diversidade (Schloss, 2010).

O estimador estatístico não paramétrico é utilizado para analisar os padrões de diversidade ambientais e inferência da diversidade de microrganismos de vários ecossistemas, estimando a riqueza de OTU a partir de amostragens de menor tamanho. O estimador Chao1 considera o número de espécies (OTU) raras para estimar a diversidade de um dado ambiente (Bohannan & Hugles, 2003) e considera o número de OTU's presentes uma vez (*singletons*), ou seja, OTU representadas por somente uma sequência na amostra, ou duas vezes (*doubletons*), OTU representadas por duas sequências em uma amostra. Ele ainda é útil para conjuntos de dados onde a maioria de OTU são raras na biblioteca e amostras de tamanho menor (Kemp & Aller, 2004).

O estimador ACE determina a abundância numérica de espécies (sequências) presentes em uma amostra e quantifica a riqueza de espécies. Para o cálculo de diversidade foram utilizados os índices de Shannon apropriado para amostras aleatórias baseados na abundância relativa de espécies de uma comunidade e InvSimpson calcula o número de espécies mais o total de espécies além da proporção total de todas as espécies de uma amostra (sequências) (Dias, 2004).

3 HIPÓTESE

A microbiota bacteriana total do rio Negro varia com a sazonalidade.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar a microbiota bacteriana do rio Negro em relação a um ciclo sazonal por isolamento de UFC totais e Metagenômica.

4.2 Específicos

- 1) Coletar amostras de água do rio Negro em períodos sazonais do nível hidrológico.
- 2) Isolar as Unidades Formadoras de Colônias em meio de cultivo LB ¼.
- 3) Calcular as UFC's totais e *Chromobacterium violaceum* pela abordagem clássica.
- 4) Verificar quais os pontos mais diversos dos isolados do rio Negro e escolher 2 pontos para prosseguir com a abordagem Metagenômica.
- 5) Isolar o DNA total de amostras coletadas em duas fases sazonais diferente do rio Negro, cheia e vazante.
- 6) Amplificar as regiões variáveis V3 a V4 do gene rRNA 16S da microbiota bacteriana do rio Negro.
- 7) Sequenciar os amplicons do gene rRNA 16S pela plataforma 454 FLX da Roche.
- 8) Classificar os isolados em nível de gênero.
- 9) Comparar a riqueza e a diversidade de espécies (OTUs) entre os períodos avaliados.

5 JUSTIFICATIVA

A diversidade biológica é definida como uma variedade de organismos vivos, incluindo a diversidade intra e interespecífica e entre os ecossistemas terrestres, marinhos, aquáticos e outros complexos ecológicos (Borém & Vieira, 2005).

A microbiota aquática de águas doces tem sido pouco estudada, o que torna necessário estudos complementares para somar a este trabalho. Esses microrganismos auxiliam na reciclagem da matéria orgânica em ciclos biogeoquímicos. A energia contida na matéria orgânica é fundamental para a dinâmica dos ciclos de nutrientes e para o fluxo de energia dos ecossistemas. As mudanças sazonais do ambiente aquático, mais a exposição à radiação solar intensa e altas temperaturas são fatores essenciais para a composição de grupos de bactérias que habitam ecossistemas aquáticos.

Segundo Peixoto, *et al.*, (2011), estudando a microbiota bacteriana dos rios Negro e Solimões, através da abordagem metagenômica, identificou a presença de 11 gêneros de bactérias diferentes no rio Solimões e 4 gêneros de bactérias diferentes no rio Negro, e desse total, 2 gêneros foram compartilhados pelos dois rios. A partir destes dados, a abordagem metagenômica mostra um modo alternativo para o conhecimento de populações microbianas em ambientes aquáticos. Com intuito de ampliar os estudos e conhecimentos da microbiota bacteriana do rio Negro com o uso de novos métodos de sequenciamento como o pirosequenciamento, pode-se proporcionar uma melhor visão da composição das populações microbianas deste ambiente, avaliando a forma de como este está organizada e quais os gêneros poderão ser encontrados.

As diversas observações feitas no Laboratório de Tecnologia de DNA na última década indicam que a percentagem de *Chromobacterium violaceum* em relação às outras bactérias cultiváveis em meio de cultivo LB varia muito nas diferentes amostras coletas (Astolfi-Filho, S. dados não publicados).

Hungria *et al.* (2005) realizaram estudos sobre a caracterização genética de isolados de *Chromobacterium violaceum* em ambientes de água preta na Amazônia brasileira. Neste estudo, os autores utilizaram genes do rRNA 16S e 23S e com base nestas análises foi verificada alta diversidade genética indicando que os isolados brasileiros podem estar dentro de pelo menos dois novos grupos de

Chromobacterium. Ainda, foi possível observar que todos os isolados do rio Negro foram tolerantes a temperatura alta (44 °C) e condições ácidas (pH 4,5), refletindo sua adaptabilidade em ecossistemas Amazônicos.

A notável habilidade de adaptação ao ambiente Amazônico da *C. violaceum* é em consequência da grande quantidade de ORFs (matriz aberta de leitura) encontradas em seu genoma e descritas pelo Consórcio do Projeto Genoma Nacional (Vasconcelos, *et al.*, 2003).

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta de água do rio Negro

As coletas foram realizadas no baixo rio Negro, na cidade de Manaus. Foram escolhidos 4 pontos diferentes conforme tabela 2. Em cada ponto foi coletada água à profundidade de 0,2 metros, 5 metros, 10 metros e 20 metros. Todos os pontos de coleta foram georeferenciados (tabelas 2A e 2B).

Tabela 2A: Representação geográfica dos pontos de coleta das amostras de água do rio Negro em 28/07/2012 (RN2) e 22/10/2012 (RN3).

Ponto	Referência Geográfica	Profundidade	Cheia	Vazante
P1	S 03° 06,504' W 060° 04,262'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	28/07/2011 (RN2)	22/10/2011 (RN3)
P2	S 03° 06,868' W 060° 04,528'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	28/07/2011 (RN2)	22/10/2011 (RN3)
P3	S 03° 07,222' W 060° 04,822'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	28/07/2011 (RN2)	22/10/2011 (RN3)
P4	S 03° 07,260' W 060° 04,891'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	28/07/2011 (RN2)	22/10/2011 (RN3)

Tabela 2B: Representação geográfica dos pontos de coleta das amostras de água do rio Negro.

Ponto	Georeferência	Profundidade	Coletas				
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
P1	S 03 ⁰ 06,504' W 060 ⁰ 04,262'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	22/12/2010	10/02/2011	28/07/2011	22/10/2011	18/01/2012
P2	S 03 ⁰ 06,868' W 060 ⁰ 04,528'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	22/12/2010	10/02/2011	28/07/2011	22/10/2011	18/01/2012
P3	S 03 ⁰ 07,222' W 060 ⁰ 04,822'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	22/12/2010	10/02/2011	28/07/2011	22/10/2011	18/01/2012
P4	S 03 ⁰ 07,260' W 060 ⁰ 04,891'	0,2 m; 5 m; 10 m e 20 m	22/12/2010	10/02/2011	28/07/2011	22/10/2011	18/01/2012



Figura 1: Foto de satélite do sítio de coleta georeferenciado no rio Negro. Fonte Google earth.

Para a coleta de água foi utilizada uma garrafa coletora de PVC (Poli Cloreto de Vinila) com dimensões de 50 cm de altura, 10 cm de largura e 5 cm de raio, afixada a um peso náutico de 5 Kg em 28 metros de cabo (figura 2). Durante os ciclos sazonais do rio Negro: primeira coleta 22/12/2010, segunda coleta 10/02/2011, terceira coleta 28/07/2011, quarta coleta 22/10/2011, quinta coleta 18/01/2012. Em cada coleta mediram-se os valores de pH e temperatura. O pH foi aferido com o eletrodo do equipamento da Jenway® modelo 3510 Meter no laboratório de Tecnologia da DNA – Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM – UFAM), a temperatura com termômetro de bulbo de vidro e coluna de mercúrio para verificar as mudanças físico química do sistema aquático do rio Negro.



Figura 2: Garrafa de coleta de água.

Foram coletados 2 L de água por profundidade, 8 L por pontos, totalizando 32 L por coleta. As amostras foram armazenadas em garrafas de 2 L e mantidas à temperatura ambiente até o momento de centrifugação. As amostras de cada ponto foram misturadas em um garrafão de 20 L esterilizado. Todos os materiais utilizados no acondicionamento e posterior centrifugação foram esterilizados com hipoclorito de sódio 0,2 %, lavadas com água quente e álcool 70% (figura 3). Após a centrifugação a 8000 g por 10 minutos à temperatura ambiente, o pellet (biomassa) foi recuperado e congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até se proceder a extração do DNA total.

6.2 Isolamento das Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) do rio Negro

Para se determinar as colônias cultiváveis em meio LB Ágar foram inoculados 50 μL de amostra em duplicata de água coletada dos diferentes pontos e profundidades. Os componentes do meio LB Ágar foram diluídos na água do rio pré-

coletada com pH ajustado em relação ao pH da água do rio Negro, tabela 3. As inoculações foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Após o crescimento dos microrganismos. Em seguida, as colônias foram contadas e separadas por coleta, comparadas para determinar qual amostra seria utilizada para prosseguir com a abordagem molecular. Foram escolhidas as coletas dos períodos de cheia (28/07/2011) e vazante (22/10/2011) do rio Negro.

6.3 Extração do DNA total

Baseado nos resultados dos cultivos em placa, escolheu-se duas das amostras para prosseguir os experimentos. As amostras RN 28/07/2011 (RN2) e RN 22/10/2011 (RN3) foram degeladas em banho de gelo, pesada para a extração do DNA total com o Kit *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc) conforme as orientações do fabricante. Em seguida, o DNA total foi caracterizado pelo sistema de eletroforese, quantificado por Nano-drop (Thermo Scientific®), e armazenado a - 80 °C até o momento de uso para a reação de amplificação.

6.4 Reação de amplificação do gene rRNA 16S

A reação de amplificação foi montada conforme descrito por Crump *et al.* (1999) com algumas modificações. O volume final foi de 25 µL, sendo 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM DNTPs, 5 pMol/µL de cada iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, tampão 10X. Foram usados os iniciadores desenhados pelo grupo de pesquisa (Genética de Microrganismos e Biotecnologia) para as regiões variáveis do rDNA da bactéria *E.coli* com degeneração no forward (tabela 3):

Tabela 3: Iniciadores utilizados para amplificar as regiões variáveis do gene rRNA16S.

340F	16S-LibL-F-MID5	(5'- CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAG TAGACTACTCCTACGGRAGGCAGCAG- 3')
340F	16S-LibL-F-MID6	(5'- CATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCGT CTAGTACTCCTACGGRAGGCAGCAG- 3')
802R	Reverse 16S	(5'- CTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGGGGACT ACCAGGGTATCTAAT- 3')

O qual se ligam, às regiões variáveis V3 e V4 que amplificam fragmentos de DNA de 465 pb do gene rRNA 16S. O termociclo da PCR constituiu de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos e seguido por 34 ciclos de desnaturação das fitas-molde a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos. Finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 2 minutos.

6.5 Purificações dos amplicons

O procedimento de purificação para separar os amplicons dos resíduos de iniciadores foi realizado com 150 µL de cada amostra (RN2 e RN3) que foram submetidos ao sistema de eletroforese Tris-Ácido Bórico-EDTA 1X, gel de agarose 0,9 %, duração de 5 horas a 70 V, corado com Brometo de Etídio. Após a corrida eletroforética, retirou-se do gel de agarose a parte que continha a amostra amplificada com o padrão de 465 pb. Em seguida, os amplicons foram purificados com o *ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), conforme as orientações do fabricante.

6.6 Sequenciamento dos *Amplicons* do gene rRNA 16S

Os amplicons foram sequenciados pela empresa Helixxa (www.helixxa.com.br) em Campinas, estado de São Paulo - Brasil, pela plataforma de alta performance pirosequenciador 454 Roche® FLX (Ronaghi, 2010). Utilizaram-se primers desenhados pelo grupo de pesquisa CAM-UFAM com 6 barcodes (código de barras), adaptadores A (liga-se a esfera) e B (reconhecido pela Taq. DNA Polimerase), a reação de amplificação foi em PCR de emulsão, e os sinais de luz gerados pela enzima Luciferase foram transformados em picos do fluxograma, e as seqüências de nucleotídeos foram montadas.

6.7 Processamento e análise das seqüências

Após o sequenciamento, as bibliotecas foram analisadas utilizando-se o programa Mothur, através do comando “trim.seqs” foram removidas as seqüências menores de que 100 pares de bases das amostras RN2 (cheia) e RN3 (vazante). Após esta etapa de seleção as amostras foram submetidas ao banco de dados Classifier RDPII e por comparação com as sequencias depositadas no banco de dados foram classificadas em nível de gênero.

As seqüências foram limpas com a remoção dos erros e ruídos nas bases geradas na amplificação inicial ou no pirosequenciamento de acordo com o programa PyroNoise e AmpliconNoise e seus algoritimos

(<http://userweb.eng.gla.ac.uk/christopher.quince/Software/PyroNoise.html>) inseridos no programa Mothur com o uso do comando “shhh.flows”. As seqüências de 290 a 380 nucleotídeos foram recuperadas após o controle de qualidade, alinhadas com o comando “align.seqs” do programa Mothur. Calcularam-se as distancias entre OTU's, gerando a matriz de distância e agrupadas em OTU's (unidade taxonômicas operacionais) (Schloss & Handelsman, 2005). Com o agrupamento das seqüências em 97% de similaridade (3% de dissimilaridade) numa mesma OTU para estimar a riqueza de espécies utilizou-se o algoritimo de Chao 1, ACE e a curva de rarefação e para estimar a diversidade, os algoritimos de Shannon e InvSimpson.

Os índices de diversidade de espécies definidos quantitativamente incluem os aspectos de variedade como também medidas de abundância relativa de espécies distribuídas entre as amostras analisadas (Shannon e InvSimpson).

A riqueza de espécies refere-se apenas ao número de espécies presentes em determinada área, os estimadores ACE e Chao 1 são estatisticamente baseados em cobertura amostral, abundancia. A relação de *Singletons* e *Dobletons*, que são representados por número de espécies somente um e dois indivíduos (Chao 1) (Lee & Chao, 1994). Portanto, seguiu-se o tutorial Schloss SOP e as recomendações do autor Schloss no fórum da pagina Wiki (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page) disponibilizado gratuitamente para análise das sequências em processos de controle de qualidade, cálculo dos índices de diversidade, riqueza e a curva de rarefação.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Isolamentos das Unidades Formadoras de Colônias- UFC's

Na tabela 4 é mostrado as variações físicas e químicas do sistema aquático do rio Negro ao longo das coletas e verificou-se que o pH variou entre os períodos de cheia e vazante. Em fevereiro (10/02/2011) inicia-se as precipitações na região norte elevando o nível hidrológico da bacia do Rio Negro.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos do rio Negro no decorrer das coletas.

	pH	Temperatura
RN 22/12/2010	5.3	28 °C
RN 10/02/2011	4.7	27 °C
RN 28/07/2011	5	28 °C
RN 22/10/2011	5.3	32 °C
RN 18/01/2012	4.9	30 °C

De acordo com o boletim de número 25 (29/07/2011) informou que o nível do Rio Negro estava a 27,70 metros no período de cheia, já o boletim número 36 (27/10/2011) relatou que o nível hidrológico do Rio Negro estava a 17,71 metros no período de vazante de acordo com a régua linimétrica da estação fluvial do Rio Negro em Manaus – AM (Companhia de Pesquisa e Recurso Minerais - CPRM e Serviço Geológico do Brasil).

O comportamento da estação climática a cheia em julho da bacia do Rio Negro altera o pH em decorrência da lixiviação do solo de florestas alagadas e várzeas que conseqüentemente são os principais doadores de íons metálicos, matéria orgânica de origem animal e vegetal em suspensão para o sistema aquático. As variações da temperatura deste ecossistema estão diretamente relacionadas com os ventos e as precipitações do período. E este período é distinto das demais fases sazonais em conseqüência da diluição das macromoléculas e micromoléculas orgânicas, sais minerais e íons metálicos.

Em outubro pico da vazante diminui a concentração de elementos majoritários, compostos orgânicos, em consequência da mudança da estação climática com a redução da precipitação e menor nível hidrográfico do rio Negro comparado como o período de cheia, mas este período é favorável pelo fator de concentração dos compostos orgânicos presentes em leitos reduzidos de água da bacia do Rio Negro.

Os isolados do rio Negro são observados na figura 3 com diversidade morfológica de cor e tamanho, são visualizadas colônias de cor amarela, roxa, cinza, berbe, branca. Tamanho de 2 milímetros a 10 milímetros, e crescem horizontalmente sobrepondo as outras colônias ao redor, em consequência da divisão celular rápida estimulada por busca de nutrientes no meio de cultura Laurie Bertani (LB ¼).

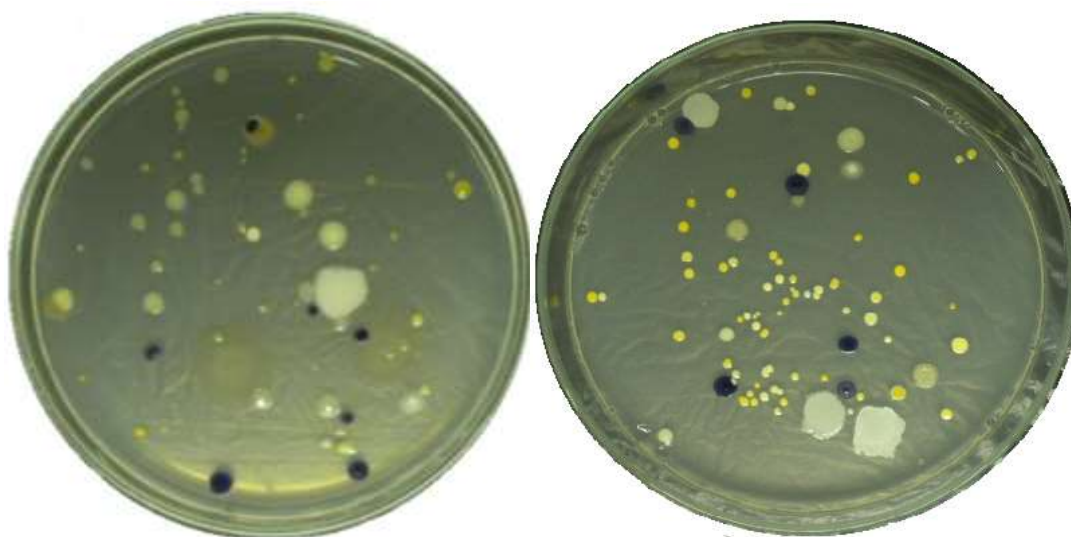


Figura 3: Unidades Formadoras de Colônias do rio Negro 23/01/2012 cultivados em LB ¼.

São mostrados na tabela 5 os resultados da soma unidades formadoras de colônias totais (UFC das profundidades das) por pontos (vertical) de cada coleta do Rio Negro e observa-se que o ponto 3 da coleta de 22/10/2011 contém o maior número de colônias isoladas 122.620 por mL e as menores quantidades foram observadas no ponto 2 da coleta de 28/07/2011 com 460 UFC/mL.

Tabela 5: Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL das amostras do rio Negro em pontos.

Isolados/mL					
Pontos	RN 22/12/2010	RN 10/02/2011	RN 28/07/2011	RN 22/10/2011	RN 18/01/2012
P1	5180	1500	640	48400	9180
P2	5560	2840	460	15400	5200
P3	8860	1220	740	122620	6420
P4	10880	1240	500	53900	5400

Na tabela 6 são verificados os resultados das somas dos pontos por profundidades do isolados do rio Negro (horizontal), no qual, as profundidades de 0.2 metros, 5 metros e 10 metros contém em média 91.137 UFC/mL, sendo a maior quantidade de isolados observados no decorrer das coletas, e a quantidade mínima foi de 32.732 UFC/mL na profundidade de 20 metros.

Tabela 6: Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL das amostras do rio Negro em profundidades.

Profundidades	Total de UFC's/mL em profundidades
0.20 metros	94250
5 metros	90004
10 metros	89158
20 metros	32732

Tendo como referencial as colônias isoladas de *Chromobacterium violaceum* em períodos sazonais do nível hidrológico do rio Negro na tabela 7 foram verificados os resultados da soma das profundidades por pontos e o ponto 2 da coleta de 22/10/2011 contém 2.980 UFC/mL de *C. violaceum*. Sendo que, a maior quantidade de isolados de *C. violaceum* foram observadas no ponto 4 das coletas de 22/10/2011 com 3.060 UFC/mL e 10/02/2011 com 4.840 UFC/mL (figura 5).

Tabela 7: Isolados de *Chromobacterium violaceum* das amostras do rio Negro por ponto e quantidade total/mL.

Isolados de <i>Chromobacterium violaceum</i> /mL					
Pontos	RN 22/12/2010	RN 10/02/2011	RN 28/07/2011	RN 22/10/2011	RN 18/01/2012
P1	540	1720	80	1580	620
P2	1120	2180	60	2980	360
P3	660	3960	100	1500	400
P4	560	4840	80	3060	960

Foram observados na tabela 8 que os resultados da soma de todos os pontos dos isolados de *C. violaceum* por profundidade (horizontal) a 20 metros foram de 9.500 UFC/mL, a menor quantidade de isolados de *C. violaceum* registrados foram de 4540 UFC/mL a 0.2 metros.

Tabela 8: Isolados de *Chromobacterium violaceum* das amostras do rio Negro por profundidade e quantidade total/mL.

Profundidades	Total de <i>Chromobacterium v.</i> /mL
0.2 metros	4540
5 metros	6700
10 metros	6620
20 metros	9500

Os resultados das Unidades Formadoras de Colônias totais demonstram que as condições do ecossistema aquático do rio Negro a 20 metros de profundidade são desfavoráveis para a microbiota bacteriana, em consequência da falta de luz solar devido à transparência do rio Negro de 1.30 a 2.90 metros (Santos & Ferreira, 1999) de profundidade e baixa concentração de oxigênio atmosférico, favorecendo as microaerófilas anaeróbicas facultativas.

De acordo com os resultados dos isolados de *C. violaceum* observados no período de 22/10/2011 e profundidades de 5 metros, 10 metros e 20 metros, mostra que os componentes minerais, pH e temperatura do sistema aquático do rio Negro auxiliaram o crescimento celular de *Chromobacterium violaceum*, este perfil foi encontrado na coleta de 22/12/2010, período de início das precipitações (figura 5).

As condições descritas por Souza (2008) do ecossistema aquático do Rio Negro foram pH (5.33), temperatura (31,5 °C), oxigênio dissolvido (5,40 mg/L), condutividade elétrica (9,8 µS/cm), elementos majoritários (Sódio 0.180 mg/L, Potássio 0.350 mg/L, Cálcio 0.307 mg/L, Ferro 0.160 mg/L) no período da vazante são favoráveis para o crescimento celular, composição e estruturação da comunidade bacteriana Henneke & De Lange (1999).

O período de cheia (28/07/2011) do sistema aquático do rio Negro que não foi favorável ao crescimento celular das UFC totais e *Chromobacterium violaceum* está relacionado com o aumento do nível hidrológico do rio, no qual, indicam à diluição das células da microbiota aquática, estas células voltaram a colonizar o rio na fase da vazante (22/10/2011), período de concentração celular e condições físico-químicas ideais para as atividades metabólicas e divisão celular.

As varias observações feitas pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Tecnologia do DNA na última década indicam que os isolados de *Chromobacterium violaceum* em relação às outras bactérias cultiváveis em meio de crescimento LB varia muito nas diferentes coletas em períodos sazonais do nível hidrológico do rio Negro (Astolfi-Filho, S. dados não publicados), este trabalho confirma a hipótese de variação das UFC totais e *C. violaceum* em diferentes períodos sazonais do rio Negro.

Stetzenbach *et al.*, (1986), relatam que o pequeno diâmetro de colônia isoladas de água de poço é o reflexo da adaptação de UFC em meio de cultivo diluídas com baixa concentração de nutrientes, conseqüentemente causa a redução do tamanho das células isoladas.

Portanto, Henneke & De Lange (1999); Fong *et al.*, (1993), concluíram que a estrutura da comunidade bacteriana aquática é determinada por salinidade, concentração de material orgânico, disponibilidade de elementos traços, temperatura e pH.

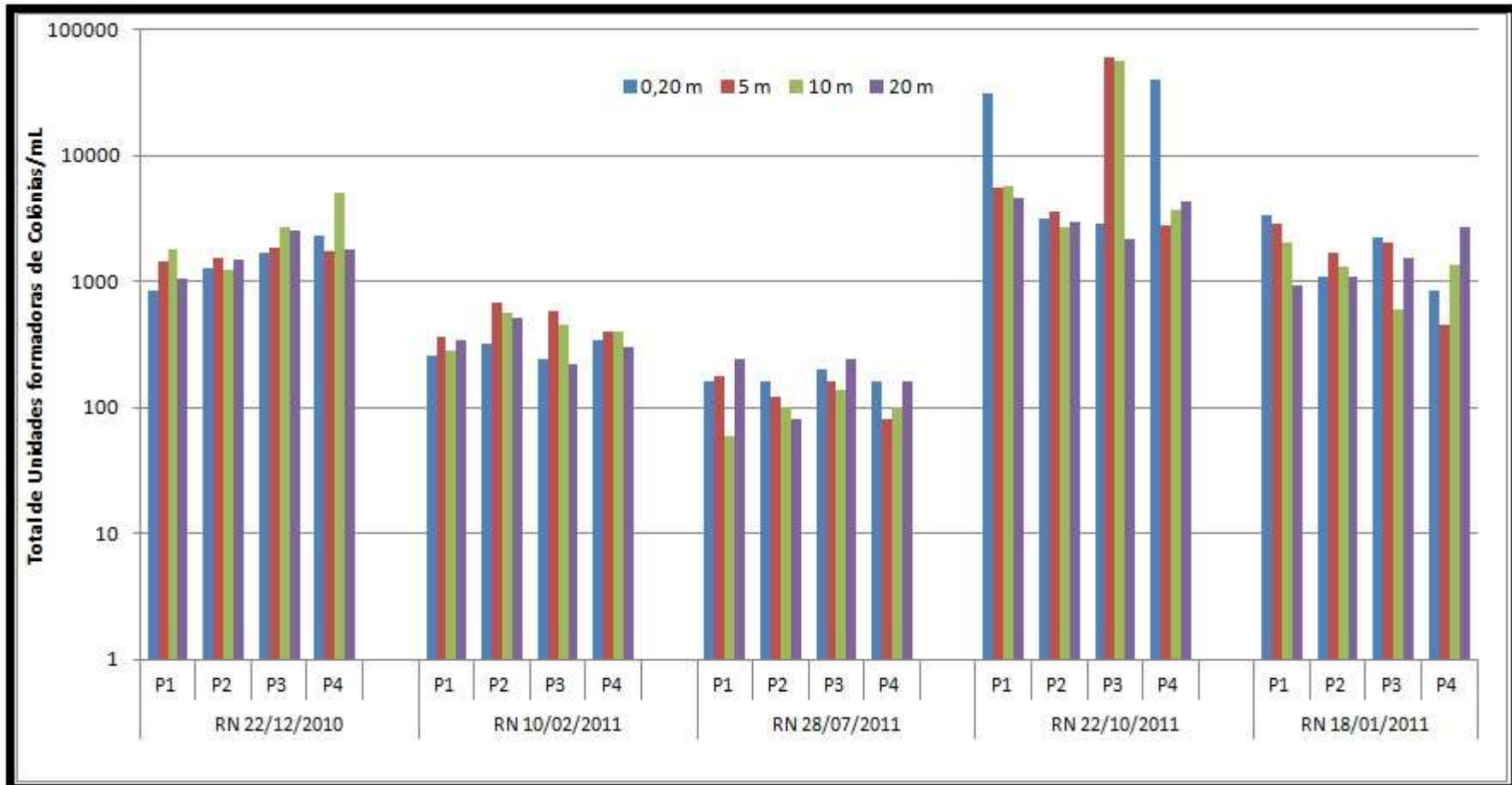


Figura 4: Total de Unidades Formadoras de Colônias por mL do rio Negro em períodos sazonais do nível hidrológico.

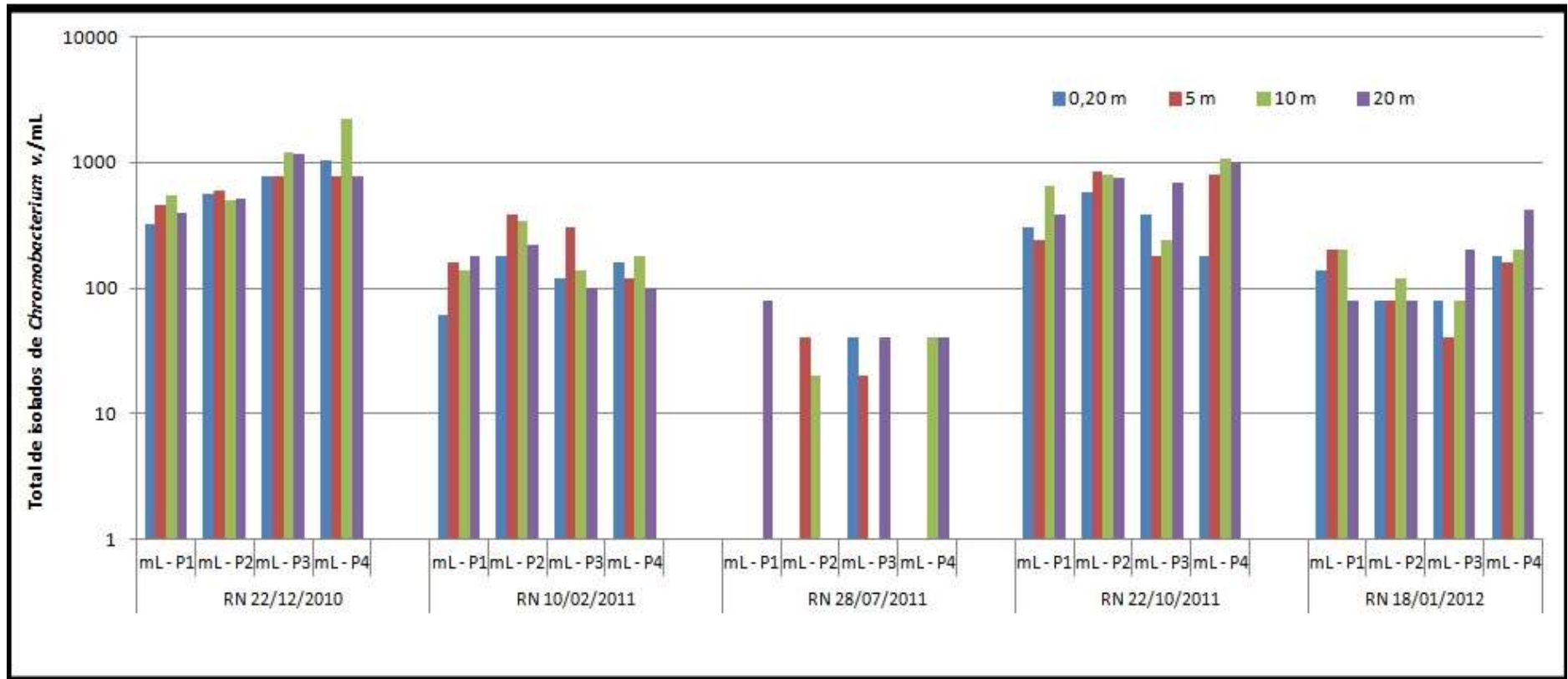


Figura 5: Total de *Chromobacterium violaceum* isoladas por mL em períodos sazonais do nível hidrológico do rio Negro com meio de cultura LB 1/4.

7.2 Abordagem Molecular

Depois das análises dos dados de cultivo, as amostras RN2 (28/07/2011) e RN3 (22/10/2011) foram escolhidas em consequência da diferença do número de isolados das amostras do rio Negro.

7.2.1 Extração de DNA total e quantificação

A figura 6 mostra o perfil eletroforético do DNA extraído com o Kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc) e analisado em gel de agarose 0.8 %. Como pode ser observado o DNA está puro, íntegro e perfil de DNA metagenômico com alto peso molecular. Por espectrofotometria (Nano-drop) calculou-se as seguintes concentrações das amostras de DNA:

RN2 (130 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e RN3 (100 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$).

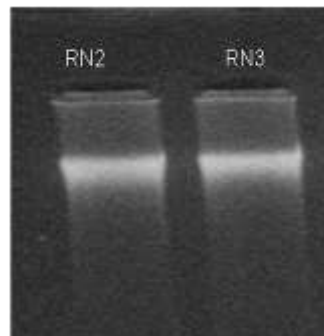


Figura 6: Perfil eletroforético do DNA total extraído das amostras RN2 e RN3 do rio Negro em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de etídio, 18/01/2012.

7.2.2 Amplificação do rDNA de bactérias

Observa-se na figura 7 o perfil eletroforético da amplificação das amostras (RN2 e RN3), que se gerou amplicons de 527 pares de base, sugerindo que os primers anelaram na posição correta produzindo amplicons com tamanho esperado.

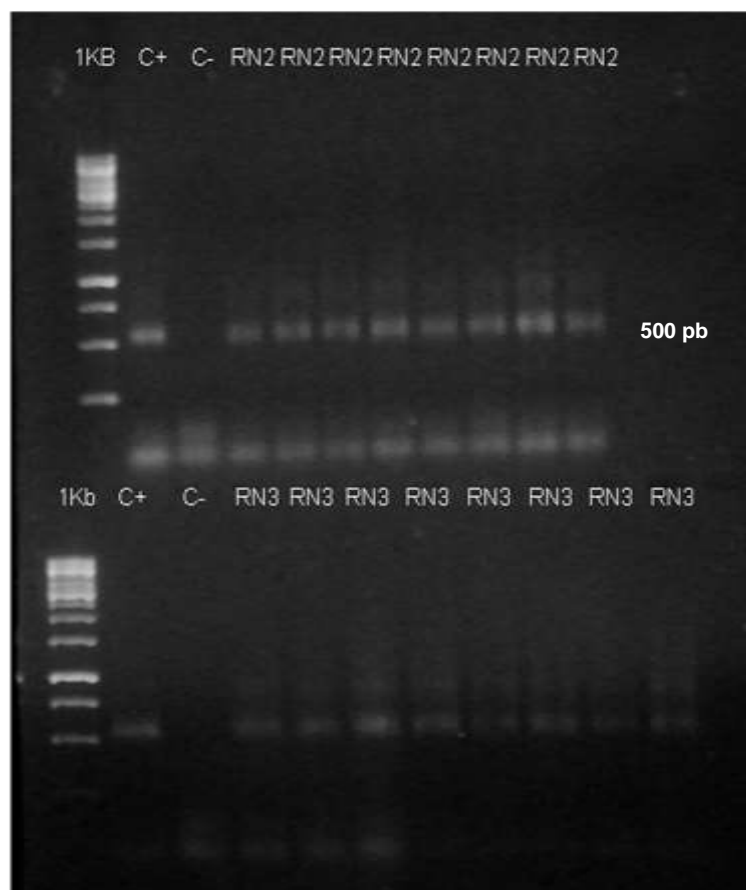


Figura 7: Perfil eletroforetico dos Amplicons do gene rRNA 16S das amostras do rio Negro (RN2 e RN3) em agarose 0.8 % corado com brometo de etídio. Ladder DNA 1Kb Promega, 24/02/2012. C+ controle positivo, C- controle negativo da reação.

7.2.3 Purificação dos Amplicons

O sistema de eletroforese foi montado em gel de agarose 0.9 %, em consequência do tamanho dos amplicons de 465 pares de base e mais 62 pares de base dos primers totalizando 527 pares de base, mostrado na figura 10 e 11, o perfil eletroforetico das amostras do rio Negro (RN2 e RN3), onde o amplicons maiores ficaram na parte superior do corte e abaixo do corte visualiza-se os primers da sobra da reação de amplificação (figura 8 e 9).

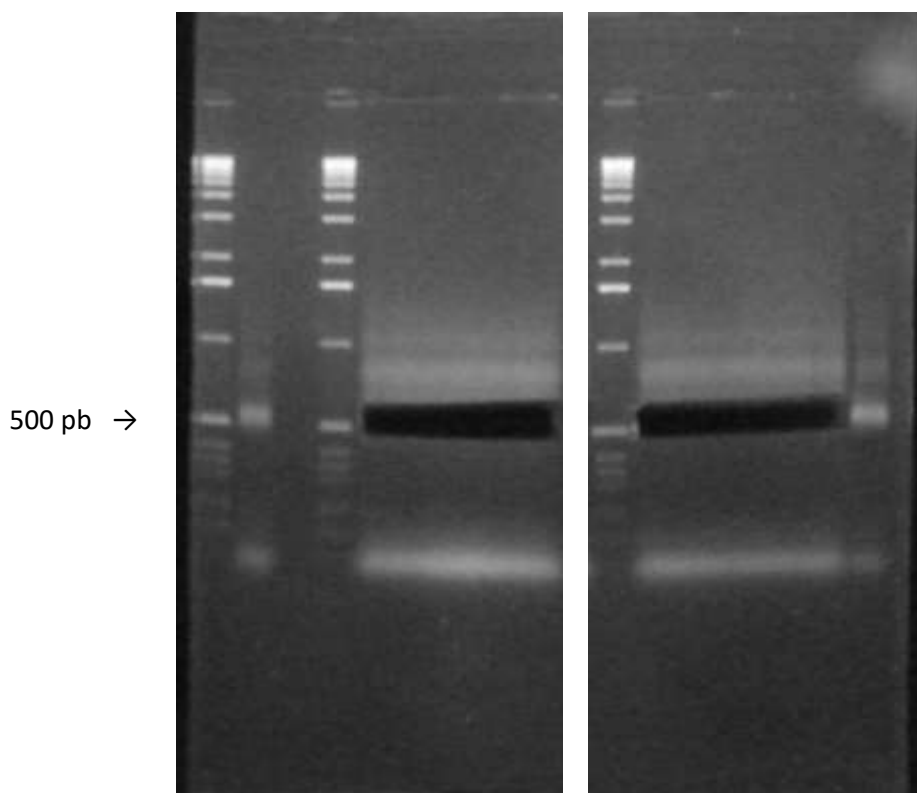


Figura 8: Perfil eletroforético do DNA purificado da amostra RN2 do rio Negro em gel de agarose 0.9 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb Invitrogen, 26/03/2012.

Figura 9: Perfil eletroforético do DNA purificado da amostra RN3 do rio Negro em gel de agarose 0.9 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb Invitrogen, 27/03/2012.

7.2.4 Quantificação dos *Amplicons* purificados

Os amplicons foram quantificados em gel de agarose e confirmado por Nanodrop (Termo®), RN2 (900 ng) e RN3 (864 ng), visualizado na figura 10.

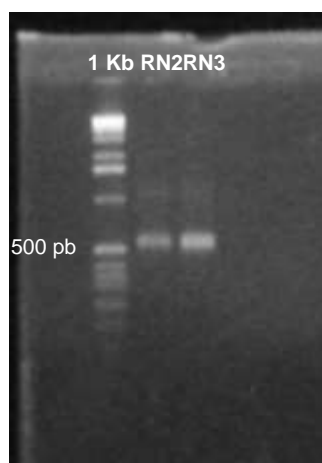


Figura 10: Perfil eletroforético da quantificação dos amplicons purificados das amostras (RN2 e RN3), em gel de agarose 0.8 % corado com brometo de etídio, Ladder DNA 1Kb Invitrogen, no dia 27/03/2012.

7.2.5 Sequenciamento dos Amplicons do gene rRNA 16S

Na tabela 9 e 10 são mostrados os resultados obtidos no sequenciamento dos amplicons em plataforma de nova geração 454 FLX Roche®. As amostras, RN2 têm 117.767 sequências com tamanho médio de 240 nucleotídeos. Observa-se que 114.823 sequências têm 479 nucleotídeos correspondendo 97.5 % do total (tabela 9) e RN3 com 121.905 sequências de tamanho médio de 231 números de bases, mostra que 118.858 sequências têm tamanho de 479 números de bases e equivale a 97.5 % do total (tabela 10). O tamanho das sequências cobre as regiões V3 (posição 400 pb – 480 pb do gene rRNA 16S de *E.coli*) e V4 (posição 600 pb – 660 pb do gene rRNA 16S de *E.coli*) apresentados na figura 11, demonstrando o sucesso da estratégia do desenho dos primers.

Tabela 9: Sumário dos resultados do sequenciamento da amostra RN2 (RN 28/07/2011) do rio Negro.

	Start	End	NBases	Ambigs	Polymer	NumSeqs
Minimum:	1	39	39	0	2	1
2.5%-tile:	1	41	41	0	3	2.945
25%-tile:	1	89	89	0	4	29.442
Median:	1	159	159	0	5	58.884
75%-tile:	1	438	438	0	6	88.326
97.5%-tile:	1	479	479	1	7	114.823
Maximum:	1	963	963	15	31	117.767
Mean:	1	240	240	0.028268	4.97542	
Total Seqs:	117.767					

Tabela 10: Sumário dos resultados do sequenciamento da amostra RN3 (RN 22/10/2011) do rio Negro.

	Start	End	NBases	Ambigs	Polymer	NumSeqs
Minimum:	1	39	39	0	2	1
2.5%-tile:	1	41	41	0	3	3.048
25%-tile:	1	87	87	0	4	30.477
Median:	1	118	118	0	5	60.953
75%-tile:	1	431	431	0	6	91.429
97.5%-tile:	1	479	479	0	7	118.858
Maximum:	1	766	766	11	31	121.905
Mean:	1	231	231	0.023215	4.95994	
Total Seqs:	121.905					

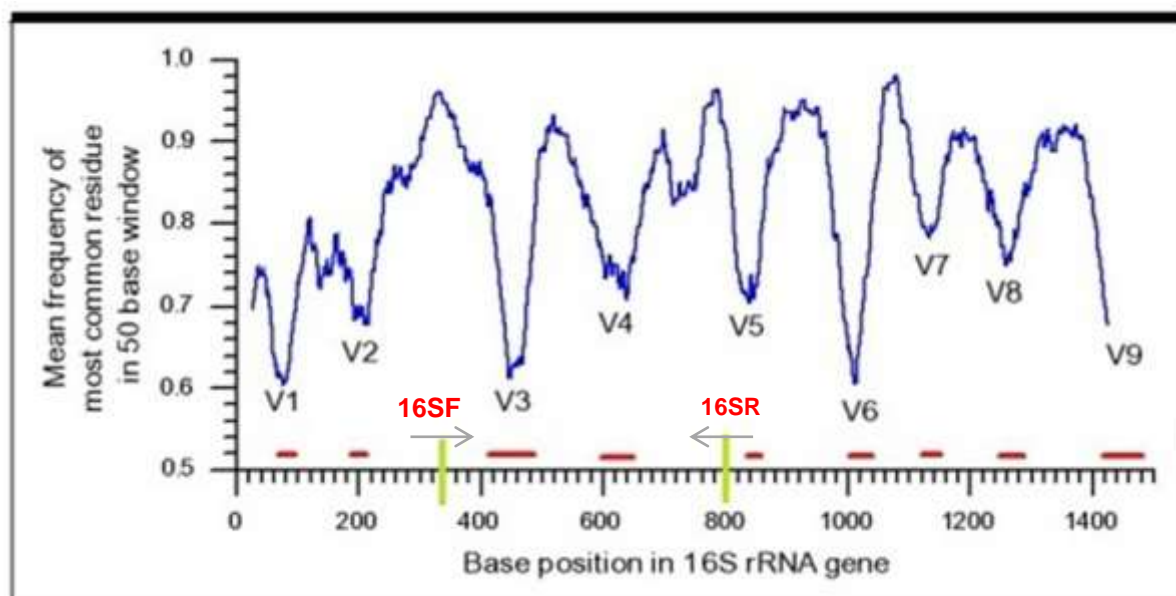


Figura 11: Mapa das regiões hipervariáveis variáveis V1 a V9 do gene rRNA 16S de *E. coli*.

Fonte: www.bioinformatics-toolkit.org/help/topics/pervariableRegions.html

7.2.6 Análise da diversidade das comunidades microbianas

7.2.7 Análise taxonômica

As comparações das sequências das bibliotecas, RN2 (cheia) com 100.000 sequências de tamanho de 100 pares de bases a 963 pares de bases e RN3 (vazante) com 100.000 sequências de tamanho de 100 pares de bases a 766 pares de bases das amostras obtidas neste trabalho realizadas através do banco de dados RDPII (Cole *et al.*, 2009) (Ribossomal Database Project – Projeto Banco de dados RNA Ribossomal 16S) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e pelo programa Classifier RDPII (RDP Hierarchy), que apresenta precisão de 98% de similaridade na classificação taxonômica de acordo como o Manual de Bergeys (Garrity *et al.*, 2004) (Wang *et al.*, 2007). O algoritmo do programa Classifier RDPII foi atualizado, surgindo o RDPX com níveis de confiabilidade elevados e consistentes.

O tamanho das sequências foram ajustadas pelo programa Mothur para evitar um esforço desnecessário na análise comparativa das bibliotecas do rio Negro (RN2 e RN3), com o objetivo de classificar em nível de gênero.

De acordo com o resultado da análise das bibliotecas do rio Negro pelo programa MultiClassifier do RDPX, todas as sequências pertencem ao Domínio bactéria com 100% de precisão e confiabilidade.

O programa MultiClassifier do RDPX mostrou que as sequências não classificadas foram 21% para a biblioteca RN2 (cheia) e 18% para a biblioteca RN3 (vazante). Verificou-se que o filo Proteobacteria é predominante em RN2 (cheia) com 81,6% e RN3 (vazante) 79,5% do total de filós.

Os números de sequências que representam os filós Actinobacteria, Thermotogae, Firmicutes e Proteobacteria nas bibliotecas do rio Negro (RN2 e RN3) foram encontradas diferenças mínimas em quantidade (tabela 11) e porcentagens entre os períodos sazonais (figura 14). No entanto, verifica-se na tabela 11 a ausência do filotipo Fibrobacteres no período de vazante (RN3), presença na cheia (RN2).

Nota-se que os filótipos identificados por similaridade de sequências representam os filós WS3, TM7, Chlorobi, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia e Bacteroidetes, Chlamydiae, Fusobacteria (tabela 11). São predominantes na fase sazonal da vazante com o dobro ou mais números de representantes destes filós, comparado com a cheia. Os filós adaptados à cheia do rio são Acidobacteria, Cyanobacteria/Chloroplast e Spirochaetes, foram dominantes no maior nível hidrológico do rio Negro.

De acordo com o resultado de classificação em nível de gênero pelo MultiClassifier do RDPX das bibliotecas do rio Negro (RN2 e RN3), observam-se que os gêneros *Polynucleobacter*, *Curvibacter*, *Aquitelea*, *Chromobacterium*, *Steroidobacter*, *Acinetobacter*, *Methylocapsa*, *Melittangium*, *Sediminibacterium*, *Flavisolibacter*, são predominantes no período de vazante e os gêneros *Steroidobacter*, *Gp3*, *Aciditerrimonas*, *Branchymonas*, *Lampropedia*, *Limnohabitans*, *Leptothrix*, *Undibacterium*, *Kerstesia*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylocaldum*, *Methylosarcina*, *Methylobacter*, *Legionella*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylovirgula*, *Methylopila*, *Pedomicrobium*, *Rhodoplanes*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Dongia*, *Telmatospirillum*, *Phenylobacterium*, *Rhizomicrobium*, *Bdellovibrio*, *Novosphingobium*, *Lacibacter*, *Mucilaginibacter*, *Ohtaekwangia*,

Bryobacter, *Geothrix*, *Holophaga*, *Acidobacterium*, *Bacillariophyta*, são predominante na fase cheia (tabela 14 - Apêndice).

Os resultados obtidos pela abordagem Molecular confirmam as observações das análises das cultiváveis que as variações sazonais do nível hidrológico do rio Negro influenciam a estrutura e composição da comunidade microbiana do sistema aquático da bacia do rio Negro, demonstrando que a hipótese é verdadeira, a comunidade microbiana do rio Negro varia em diferentes períodos sazonais, tais como cheia e vazante.

A comparação dos resultados do cultivo dependente e cultivo independente (Abordagem Molecular), mostra que o gênero *Chromabacterium* não é quantitativamente e nem qualitativamente representativo da totalidade observada na tabela 14 (Apêndice), confirmando as observações de Wagner *et al.*, (1993) e Felske *et al.*, (1999).

Estudo realizado nos rios Negro e Solimões, registaram a dominância do gênero *Polynucleobacter* na biblioteca do rio Negro e alguns representantes no rio Solimões (Peixoto *et al.*, 2011), estas observações estão de acordo com os resultados registrados na tabela 14 (Apêndice), demonstrando o domínio do gênero *Polynucleobacter* no rio Negro em diferentes períodos sazonais.

Ghai *et al.*, (2011), estudaram a comunidade de microrganismo da coluna de água do rio Solimões por abordagem Metagenômica. Obtiveram 1.153.502 sequências com tamanho de 325 pares de bases por pirosequenciamento, encontraram filotipos de Actinobacteria e Proteobacteria em abundância, o gênero *Polynucleobacter sp.* predominou dentro do domínio bactéria, este resultado corroboram com o presente trabalho.

Tabela 11: Filotipos classificados das bibliotecas do rio Negro pelo programa MultiClassifier do RDPX.

Filos	RN2 Cheia	RN3 Vazante
Actinobacteria	6043	5791
Proteobacteria	64452	65175
Bacteroidetes	4510	8183
Firmicutes	281	252
Acidobacteria	3178	1964
Verrucomicrobia	12	29
Cyanobacteria/Chloroplast	332	274
Nitrospira	20	37
Gemmatimonadetes	54	140
Chlamydiae	54	93
Chloroflexi	4	5
Spirochaetes	6	1
Armatimonadetes	11	16
Thermotogae	1	1
Fusobacteria	1	7
TM7	3	6
Chlorobi	2	7
WS3	1	10
Fibrobacteres	1	0
Não classificadas	21033	18009
Total	78967	81991

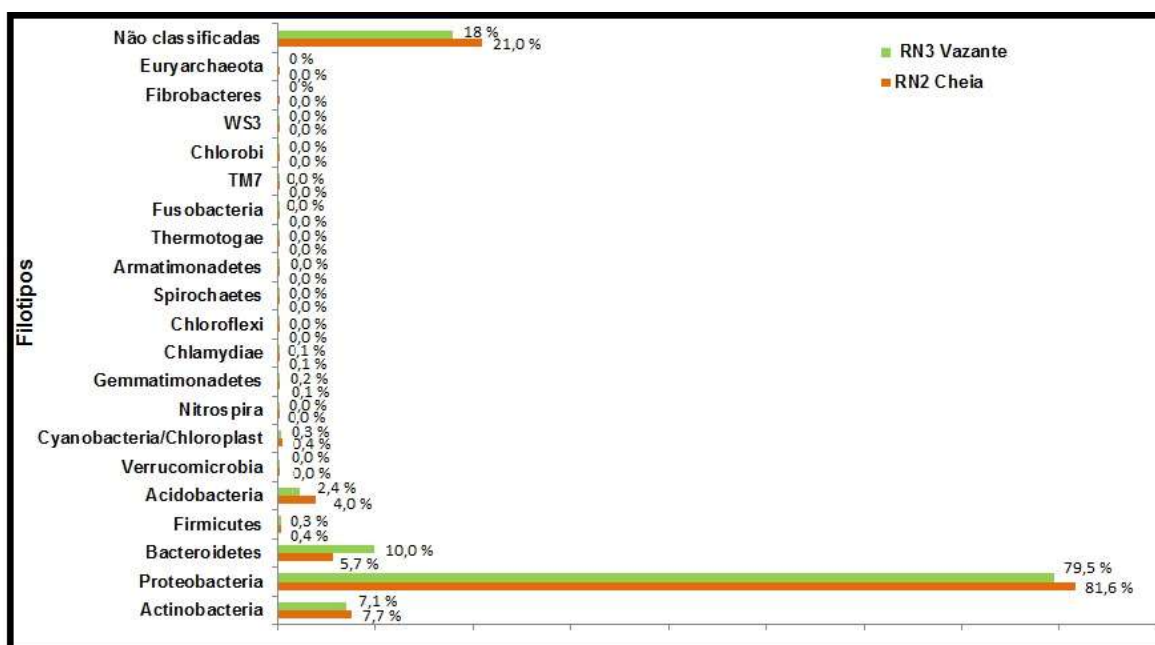


Figura 12: Porcentagem de bactérias pertencentes aos filos das bibliotecas do rio Negro classificadas pelo programa MultiClassifier do RDPX.

7.2.8 Análise da Riqueza e Diversidade de OTU's

De acordo com as análises do programa Mothur foram gerados 95 OTU's (RN2) (tabela 12 - Apêndice) de 12.506 sequências recuperadas das 117.769 (tabela 9) sequências da biblioteca (cheia), após os comandos de controle de qualidade do software (Schloss & Handelsman, 2005). Foram observados na tabela 12 (Apêndice) as OTU's classificadas e os expressivos filos foram Acidobacteria, classe Acidobacteria_Gp3, ordem Acidobacteria_Gp3, família cidobacteria_Gp3_family_incertainae_sedis, gênero *Gp3* (OTU18 com 976 sequências) e Proteobacteria, classe Betaproteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero *Polynucleobacter* (OTU15 com 288 sequências) (tabela 12 – Apêndice) e 100% de similaridade com as sequências de referência do bando de dados RDPII disponibilizada livremente na página do programa Mothur (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page).

Já na biblioteca RN3 foram visualizados 121 OTU's de 14.188 sequências reabilitadas de 121.905 sequências (tabela 10) obtida após o sequenciamento e distribuídas em OTU's (tabela 13 - Apêndice) e as abundantes foram do filo Acidobacteria, classe Acidobacteria_Gp3, ordem Acidobacteria_Gp3, família

Acidobacteria_Gp3_family_incertae_sedis, gênero *Gp3* (OTU22 com 653 sequências) e o filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero *Polynucleobacter* (OTU14 com 652 sequências).

A classificação em nível de gêneros pelo programa Mothur (tabela 13 e 14 - Apêndice) confirma os resultados obtidos pelo programa RDP X (tabela 15 - Apêndice), demonstra que os gêneros *Polynucleobacter* e *Gp3* são dominantes nos períodos de cheia e vazante do rio Negro.

Através do método de rarefação com similaridade de 97% foi observado na biblioteca da vazante (RN3) do rio Negro maior riqueza de espécies através da quantidade de OTU's superior ao período de cheia (RN2) e a tendência da curva não demonstra uma estabilização e dentro do contexto é necessário um esforço amostral maior para o registro do número total de espécies destes períodos sazonais do rio Negro (figura14).

Os resultados gerados pelo programa Mothur dos índices de diversidade InvSimpson e Shannon demonstraram maior diversidade de espécies bacteriana no período de vazante (RN3) da microbiota aquático do rio Negro indicando uma distribuição uniforme de espécies do período de vazante comparado como o período de cheia (RN2) (figura 13).

Os índices de riqueza de espécies Chao 1 e ACE demonstraram que o período de vazante é rico em número de espécies bacterianas comparado com o período de cheia, o primeiro estimador é baseado no conceito de cobertura de espécies abundante, e segundo estimador é baseado em abundância de espécies (figura 13).

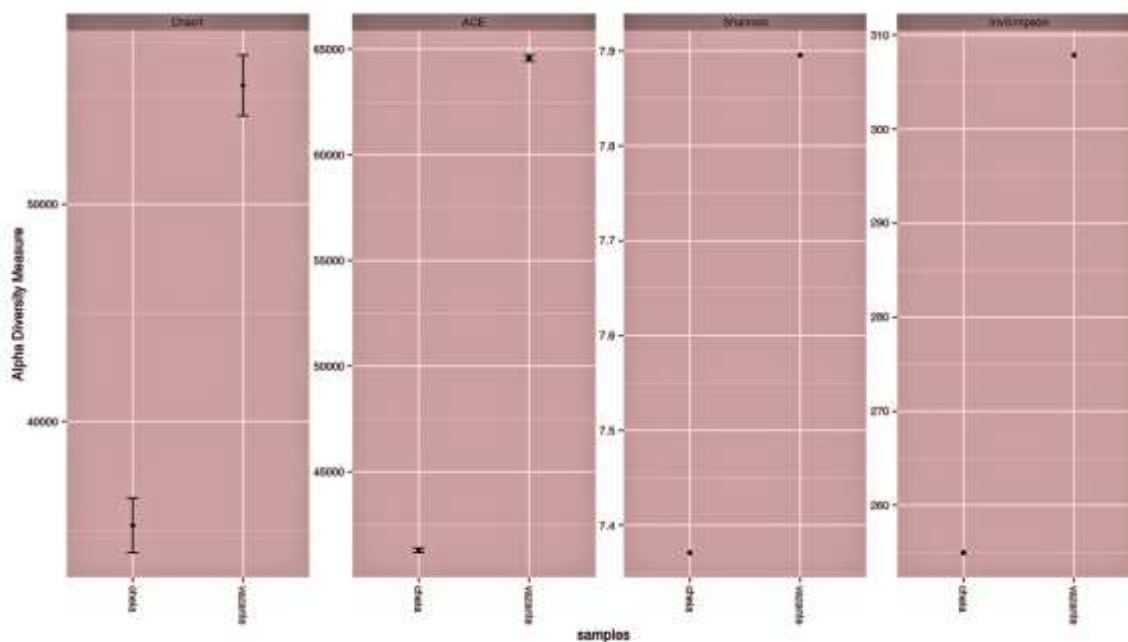


Figura 13: Índice de diversidade e riqueza de espécies das amostras do rio Negro no período de cheia (RN2 27/07/2011) e vazante (RN3 22/10/2011) de 2011, calculado pelo programa Mothur.

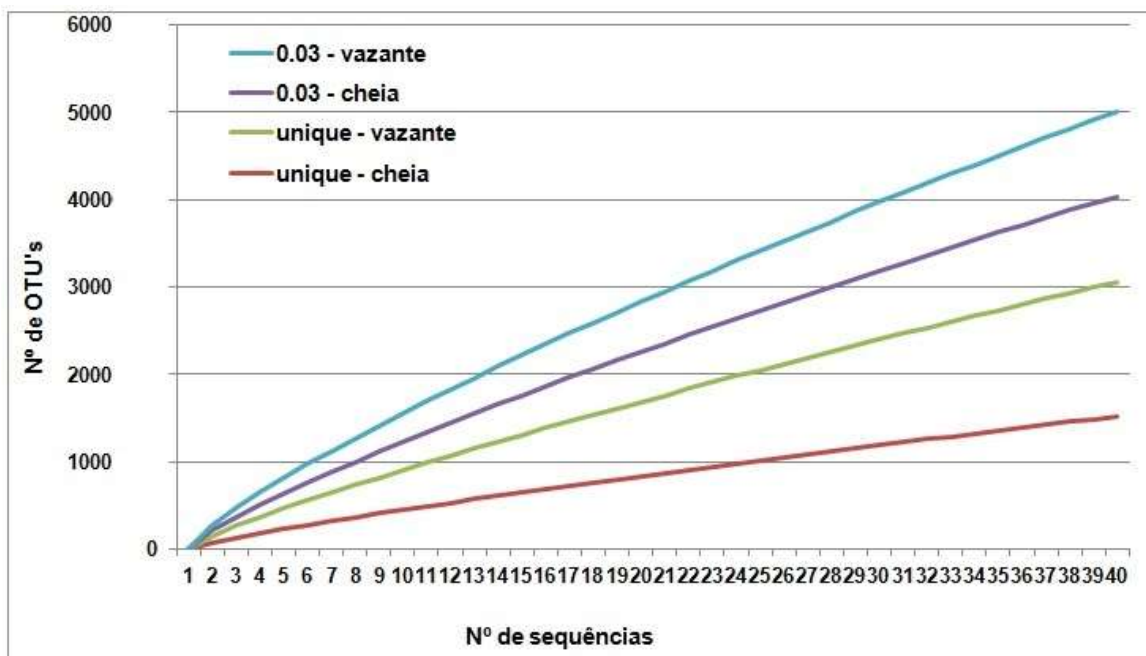


Figura 14: Curva de rarefação de OTU's das bibliotecas do rio Negro no período de cheia (RN2 27/07/2011) e vazante (RN3 22/10/2011).

8 Conclusões

Do presente trabalho pode-se concluir:

- Os isolados (UFC's totais) por unidade de volume diminuem muito no período da cheia (RN2 -28/01/2011) devido principalmente a efeito de diluição.
- O período que apresentou menor número de UFC's de *Chromobacterium violaceum* por unidade de volume foi também o de cheia (RN2 -28/01/2011)
- O gênero *Chromobacterium* não representa a totalidade de microrganismo no cultivo dependente.
- Os índices de Simpson e Shannon apontam que a vazante (RN3 – 22/10/2011) contém maior diversidade de espécies.
- O índice de ACE demonstra que a cheia (RN2 – 27/07/2011) é rica em espécies, mas o índice de Chao 1 confirma maior riqueza de espécies no período de vazante (RN3 – 22/10/2011) e mínima a diferença entre os índices das bibliotecas.
- O rio Negro contém dois *Taxa* dominantes em períodos diferentes, o gênero *Polynucleobacter* dominante no período da vazante (RN3), o gênero *Gp3* dominante no período da cheia (RN2) com 100% de similaridade. calculado pelo Mothur, os gêneros podem conter funções ecológicas importantes não descritas na literatura. Portanto, devem ser estudados exhaustivamente para descobrir novas biomoléculas com potencial biotecnológico.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amann, R.; Ludwig, W. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 555-565.

Azevedo, J.L. 2008. A teoria Genética da Adaptação. In: Genética de Microrganismos. 2^o Edição Revista e Ampliada. Editora UFG, Goiânia, Brasil. p 64-65.

Barbosa, H.R. & Torres. B.B. 1998. Microbiologia Básica. Editora Atheneu. São Paulo. 196p. 1998.

Barns, S.M.; Fundyga, R.E.; Jeffries, M.W.; Pace, N.R. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91: 1609-1613.

Benetti, M.F.; Mounier, S.; Filizola, N.; Benaim, J.; Seyler, P. 2003. Carbon and metal concentrations, size distributions and fluxes in major river of the Amazon basin. *Hydrological Processes*. 17: 1363-1377.

Bohannon, B.J.M. & Hughes, J. 2003. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current Opinion in Microbiology*. 6: 282-287.

Borém, A.; Vieira, M.L.C. 2005. In: Glossário de Biotecnologia. Editora folha de Viçosa. Viçosa, MG. 27. pp 183.

Brummer, I.H.M.; Felske, A.; Wagner-Dobler, I. 2003. Diversity and Seasonal Variability of β -Proteobacteria in biofilms of polluted River: Analysis by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Cloning. *Applied and Environmental Microbiology*. V69(8): 4463-4473.

Carvalho, M.C.C.G.; Silva, D.C.G. 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural, Santa Maria*. 40(3): 735-744.

Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E.; Fish, J.; Chai, B.; Farris, R.J.; Kulam-Syed-Mohideen, A. S.; McGarrel, D.; Marsh, T.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. Vol. 37, Database issue, D141-D145.

Cottrell, M.T.; Waidner, L.A.; Yu, L.; Kirchman, D.L. 2005. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from Delaware River. *Environmental Microbiology*. 7 (12): 1883-1895.

Crump, B.C.; Armbrust, E.V.; Baross, J.A. 1999. Phylogenetic Analysis of particle-attached and free-living bacteria communities in the Columbia river; Its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and environmental microbiology*. 65(7): 3192-3204.

Dias, S.C.; 2004. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. V26(4): 373-379.

Felsenstein, J. P. 2007. Phylogeny Inference Package. Version 3.67. Seattle: Department of Genetics, *University of Washington*.

Felske, A.; Wolterink, A.; Van Lis, R.; De Vos, W.M.; Akkermans, A.D.L. 1999. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 137-145.

Fong, P., Zedler, J.B., Donohoe, R.M. 1993. Nitrogen vs. Phosphorus limitation of algal biomass in shallow costal lagoons. *Limnology and Oceanography*. 38(5), 906-923.

Fox, G.E.; Magrum, L.J.; Balch, W.E.; Wolfe, R.S.; Woese, C.R. 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proce. Natl. Acad. Sci. USA*. V74(10): 4537-4541.

Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Liburun, T.G. Taxonomic outline of prokaryotes. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Release 5.0.2. ed. *New York: Springer*, 2004.

Gevers, D.; Cohan, F.M.; Lawrence, J.G.; Spratt, B.G.; Coenye, T.; Feil, E.J.; Stackebrandt, E.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Thompson, F.L.; Swings, J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 1733-1739.

Ghai, R.; Valera, F.R.; McMahon, K.D.; Toyama, D.; Rinke, R.; Oliveira, T.C.S.; Garcia, J.W.; Miranda, F.P.; Silva, F.H. 2011. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon River. *Plos One*. 6(8): e2375, 1-12. Doi:10.1371/journal.pone.0023785.

Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4): 669-685.

Handelsman, J. 2005. Sorting out metagenomes. *Nature Biotechnology*. 23(1): 38-39.

Head, I.M.; Sauders, J.R.; Pickup, J. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: A decade of ribosomal rRNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecology*. V3: 1-21.

Henneke, E. & De Lenge, G.J. 1999. The distribution of DOC and POC in the water column and brines of the tyro and Bannock Basins. *Marine Chemistry*. 31: 113-122.

Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. 1998. Impacto of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180: 4765-4774.

Hungria, M.; Astolfi-Filho, S.; Chueire, L.M.O.; Nicolás, M.F.; Santos, E.B.P.; Bulbol, M.R.; Souza-Filho, A.; Assunção, E.N.; Germano, M.G.; Vasconcelos, A.T.R. 2005. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from Black water environments in the Brazilian Amazon. *Letters in Applied Microbiology*. (41): 17-32.

Huse, S.M.; Huber, J.A.; Morrison, H.G.; Sogin, M.L.; Welch, D.M. 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*. 8(7): R143, (doi:10.1186/gb-2007-8-7-r143).

Kemp, P.F. & Aller, J.Y. 2004. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology*. 47: 161-177.

Kenzaka, T.; Yamaguchi, N.; Prapagdee, B.; Mikami, E.; Nasu, M. 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. 47(4): 353-361.

Lee, S.M. & Chao, A. 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics*. (50): 88-97.

Local de origen do Dawnload do programa e tutorial do Mothur disponibilizado por Schloss, P. D.; Handelsman, J. 2005 – (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page).

Ludwig, W.; Bauer, S.H.; Held, I.; Kirchhof, G.; Schulze, R.; Huber, I.; Spring, S.; Hartmann, A.; Schleifer, K.H. 1997. Detection and in situ identification of representative of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology Letters*. 153: 181-190.

Macrae, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 77-82.

Maslin, M.A.; Durham, E.; Burns, S.J.; Platzmam, E.; Grootes, P.; Greig, S.E.J.; Nadeau, M.-J.; Schleicher, M.; Pflaumann, U.; Lomax, B.; Rimington, N. 2000. Palaeoreconstruction of the Amazon River freshwater and sediment discharge using sediments recovered at site 942 on the Amazon fan. *Journal of Quaternary Science*. 15(4): 419-434.

Moreira-Turcq, P.; Seyler, P.; Guyot, J.L.; Etcheber, H. 2003. Exportation of organic carbon from the Amazon River and its main tributaries. *Hydrological Processes*. 17: 1329-1344.

Peixoto, J.C.C.; Leomil, L.; Souza, J.V.; Peixoto, F.B.S.; Astolfi-Filho, S. 2011. 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*. 10 (4): 3783-3793.

Praça, L.B.; Morinaga, C.; Medeiros, P.T.; Melatti, V.M.; Martins, E.S.; Dumas, V.F.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. 2009. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* coletadas em solos do oeste baiano. *Universitas: Ciência da Saúde, Brasília*, 2(7): 1-18.

Rai, H.; Hill, G. 1978. Bacteriological studies on Amazonas, Mississippi and Nile waters. *Arch. Hydrobiol.* 81(4): 445-461.

Rettori, D.; Durán, N. 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 14: 685-688.

Ricklefs, R.E. 2001. As variações no Ambiente físico. In: A economia da Natureza. 5ª Edição University of Missouri – St. Louis, Editora Guanabara Koogan S.A. p50-90

Robe, P.; Nalin, R.; Capellano, C.; Vogel, T.M.; Simonet, P. 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*. 39: 183-190.

Ronaghi, M. 2010. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*. 11: 3-11.

Saliot, A.; Mejanelle, L.; Scribe, P.; Fillaux, J.; Pepe, C.; Jabaud, A.; Dagaut, J. 2001. Particulate organic carbon, sterols, fatty acids and pigments in the Amazon river system. *Biogeochemistry*. 53: 79-103.

Sanger, F.; Brownlee, G.G.; Barrell, B.G. 1965. A Two-dimensional Fractionation Procedure for Radioactive Nucleotides. *J. Mol. Biol.* 13: 373-398.

Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H. (Eds). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. *Editora da Universidade de São Paulo*, São Paulo, Brasil. p 345-349.

Schloss, P. D.; Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(3): 1501–1506.

Schloss, P.D. 2010. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S r RNA gene-base studies. *Plos Comput Biol* 6(7): e1000844, 1-16. Doi:10.1371/journal.pcbi1000844).

Sioli, H. 1975. Amazon Tributaries and Drainage Basins. In F.B. Golley & E. Medina (eds): Tropical ecosystems. *Trends in Terrestrial and Aquatic Research.* Springer Verlag, New York, 199 – 213.

Sioli, H. 1976. A limnologia na região Amazônica Brasileira. *Anais do I Encontro Nacional de Limnologia e Pesca Continental.* 153 - 169.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. Cap. 5 pp. 129 – 163. *The Amazon. Limnology and Landscape ecology of a mighty tropical river and its basin.* ISBN 90 – 6193 – 108 – 8. Dr. W. Junk Publishers, Boston, Lancaster. Printed in the Netherlands.

Sorgin, M.L.; Morrison, H.G.; Huber, J.A.; Welch, D.M.; Huse, S.M.; Neal, P.R.; Arrieta, J.M.; Herndi, G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *PNAS.* V103(32): 12115-12120.

Sousa, A.K.F. 2008, Variação sazonal e espacial da concentração de elementos-traços nos rio Urucu, Solimões e Negro – Amazônia Ocidental, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 229 páginas.

Stetzenbach, L.D.; Kelley, L.M.; Sinclair, N.A. 1986. Isolation, identification, and growth of well-water bacteria. *Ground Water.* 24(1): 6-10.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2005. Microbiologia Ambiental. In: Microbiologia. 8ª Edição. *Editora Artmed*, Porto Alegre, Rio Grande do sul, Brasil. p 764-777.

Vasconcelos, A.T.R.; *et al.* (Brazilian National Genomic Project Consortium). 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability Brazilian National Genome Project Consortium. *Proceedings of the National Academy of Sciences fo the USA - PNAS*. 100 (20): 11660-11665.

Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedye, J.M.; Cole, J.R. 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequence into new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(16): 5261-5267.

Wagner, M.; Amann, R.; Lemmer, H.; Schleifer, K.H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(5): 1520-1525.

White, J.R.; Navlakha, S.; Nagarajan, N.; Ghodsi, M.R.; Kingsford, C.; Pop, M. 2010. Alignment and clustering of phylogenetic markers – implications for microbial diversity studies. *BioMed Central Bioinformatics*. 11:152, 1-10.

Woese, C.R. & Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary Kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V74(11): 5088-5090.

Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V87: 4576-4579.

APÊNDICE

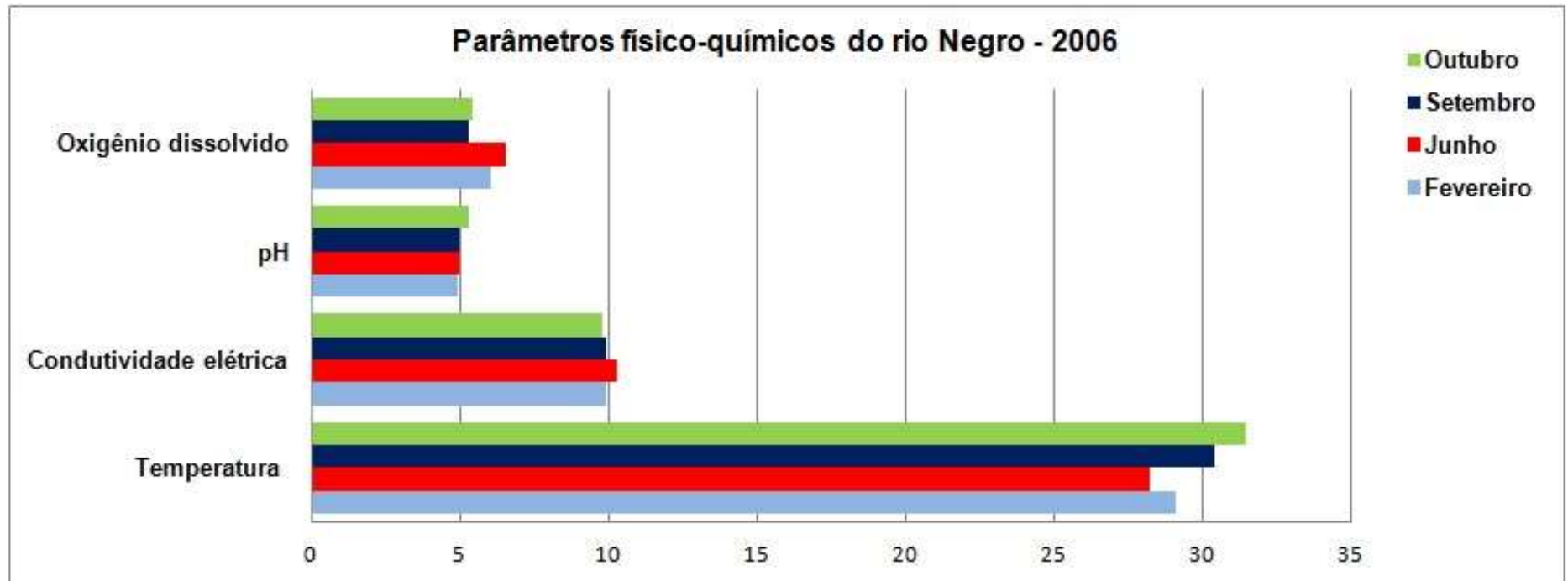


Figura 15: Parâmetros Físico-químicos do rio Negro coletados em 2006. Fonte: Souza, A.K.F., 2008, dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas.

Tabela 12: Agrupamento em OTU's de gêneros classificadas pelo programa Mothur da biblioteca RN2 (27/07/2011).

OTU	Size	Taxonomy RN2 Cheia
Otu01	1270	Bacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu02	1142	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu03	1132	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu04	1170	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);unclassified(100);
Otu05	273	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);unclassified(100);
Otu06	8	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);Cystobacteraceae(100);Anaeromyxobacter(100);
Otu07	456	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu08	2065	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);unclassified(100);
Otu09	682	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu10	118	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu11	18	Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp3(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu12	521	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);unclassified(100);
Otu13	43	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);Methylomonas(100);
Otu14	354	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu15	288	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Polynucleobacter(100);
Otu16	25	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Sphingobacteriaceae(100);Mucilagibacter(100);
Otu17	23	Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu18	976	Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp3(100);Acidobacteria_Gp3_(100);Acidobacteria_Gp3_family_(100);Gp3(100);
Otu19	230	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu20	1	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu21	1	Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);lamiaceae(100);lamia(100);

- Otu22** 8 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu23** 91 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Curvibacter(100);
- Otu24** 184 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);unclassified(100);
- Otu25** 87 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);unclassified(100);
- Otu26** 320 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu27** 57 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);Phenylobacterium(100);
- Otu28** 1 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Solirubrobacterales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu29** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Rhodospirillaceae(100);Magnetospirillum(100);
- Otu30** 91 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Beijerinckiaceae(100);unclassified(100);
- Otu31** 56 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu32** 12 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);Acidimicrobiaceae(100);Ilumatobacter(100);
- Otu33** 56 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Rhodospirillaceae(100);unclassified(100);
- Otu34** 9 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);unclassified(100);
- Otu35** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Bradyrhizobiaceae(100);unclassified(100);
- Otu36** 91 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu37** 28 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu38** 7 Bacteria(100);"Gemmatimonadetes"(100);Gemmatimonadetes(100);Gemmatimonadales(100);Gemmatimonadaceae(100);Gemmatimonas(100);
- Otu39** 13 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Holophagae(100);Holophagales(100);Holophagaceae(100);unclassified(100);
- Otu40** 59 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);unclassified(100);
- Otu41** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Legionellales(100);Legionellaceae(100);Legionella(100);
- Otu42** 7 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylocystaceae(100);unclassified(100);
- Otu43** 6 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Sphingobacteriaceae(100);unclassified(100);
- Otu44** 76 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylocystaceae(100);Methylocystis(100);
- Otu45** 14 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp1(100);Acidobacteria_Gp1_order_incertae_sedis(100);Acidobacteria_(100);Gp1(100);

- Otu46** 15 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
- Otu47** 3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);unclassified(100);
- Otu48** 33 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Bdellovibrionales(100);Bdellovibrionaceae(100);Bdellovibrio(100);
- Otu49** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Kozakia(100);
- Otu50** 12 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Holophagae(100);Holophagales(100);Holophagaceae(100);Geothrix(100);
- Otu51** 10 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);unclassified(100);
- Otu52** 11 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp2(100);Acidobacteria_Gp2_order_i(100);Acidobacteria_Gp2_(100);Gp2(100);
- Otu53** 6 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);Methylococcus(100);
- Otu54** 33 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);Parasegetibacter(100);
- Otu55** 18 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);Cystobacteraceae(100);unclassified(100);
- Otu56** 9 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Sporichthyaceae(100);Sporichthya(100);
- Otu57** 47 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);Aquitalea(100);
- Otu58** 1 Bacteria(100);"Chloroflexi"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu59** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);Methyloversatilis(100);
- Otu60** 3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);Hyphomicrobium(100);
- Otu61** 4 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Rhodospirillaceae(100);Telmatospirillum(100);
- Otu62** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Hydrogenophaga(100);
- Otu63** 26 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Bacteroidetes"_(100);"Bacteroidete"_(100);"Bacteroidetes" _incertae_(100);Ohtaekwangia(100);
- Otu64** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);Methylosarcina(100);
- Otu65** 32 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Roseococcus(100);
- Otu66** 2 Bacteria(100);"Nitrospira"(100);"Nitrospira"(100);"Nitrospirales"(100);"Nitrospiraceae"(100);Nitrospira(100);
- Otu67** 116 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Limnohabitans(100);
- Otu68** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu69** 1 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);

Otu70	8 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu71	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Xanthobacteraceae(100);unclassified(100);
Otu72	5 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);unclassified(100);
Otu73	3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilales(100);Methylophilaceae(100);unclassified(100);
Otu74	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Xanthobacteraceae(100);Pseudolabrys(100);
Otu75	1 Bacteria(100);"Chlamydiae"(100);Chlamydiae(100);Chlamydiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu76	2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);unclassified(100);
Otu77	1 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);Ferruginibacter(100);
Otu78	3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu79	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Bradyrhizobiaceae(100);Bosea(100);
Otu80	1 Bacteria(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteriales"(100);"Fusobacteriaceae"(100);Cetobacterium(100);
Otu81	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);Methylobacter(100);
Otu82	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfuromonadales(100);Geobacteraceae(100);Geobacter(100);
Otu83	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Beijerinckiaceae(100);Methylovirgula(100);
Otu84	1 Bacteria(100);"Armatimonadetes"(100);Armatimonadetes_gp5_class_(100);Armatimonadetes_gp5_(100);Armatimonadetes_gp5_gp5(100);
Otu85	2 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Holophagae(100);Holophagales(100);Holophagaceae(100);Holophaga(100);
Otu86	1 Bacteria(100);Firmicutes(100);Clostridia(100);Clostridiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu87	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);Polyangiaceae(100);unclassified(100);
Otu88	1 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp7(100);Acidobacteria_Gp7_order_incertae_sedis(100);Acidobacteria_Gp7;Gp7(100);
Otu89	1 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Microbacteriaceae(100);unclassified(100);
Otu90	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfuromonadales(100);Geobacteraceae(100);unclassified(100);
Otu91	3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfuromonadales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu92	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);Novosphingobium(100);
Otu93	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiales_incertae_sedis(100);Aquabacterium(100);

- Otu94** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);Sphingomonas(100);
- Otu95** 1 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Micrococcaceae(100);Renibacterium(100);

12.506

Tabela 13: Agrupamento em OTU's de gêneros classificadas pelo programa Mothur da biblioteca RN3 (22/10/2011).

OTU	Size	Taxonomy RN3 Vazante
Otu001	1599	Bacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu002	728	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu003	893	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu004	1371	Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);unclassified(100);
Otu005	1879	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);unclassified(100);
Otu006	243	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu007	818	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);unclassified(100);
Otu008	1	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Paracraurococcus(100);
Otu009	1408	Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu010	199	Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);

Otu011 397 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu012 313 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu013 825 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu014 456 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Polynucleobacter(100);
Otu015 122 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu016 396 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Beijerinckiaceae(100);unclassified(100);
Otu017 18 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);Phenylobacterium(100);
Otu018 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Kozakia(100);
Otu019 34 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);unclassified(100);
Otu020 127 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Ralstonia(100);
Otu021 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilales(100);Methylophilaceae(100);unclassified(100);
Otu022 652 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp3(100);Acidobacteria_Gp3_order_incertain_seGp3_family_;Gp3(100);
Otu023 132 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);Aquitalea(100);
Otu024 10 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);unclassified(100);
Otu025 281 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Moraxellaceae(100);Acinetobacter(100);
Otu026 67 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);unclassified(100);
Otu027 105 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu028 233 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Curvibacter(100);
Otu029 62 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Limnohabitans(100);
Otu030 7 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);Sediminibacterium(100);
Otu031 39 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu032 14 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Comamonas(100);
Otu033 39 Bacteria(100);"Gemmatimonadetes"(100);Gemmat_(100);Gemmatimonadales(100);Gemmatimonadaceae(100);Gemmatimonas(100);
Otu034 57 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);unclassified(100);

- Otu035** 1 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Pseudonocardiaceae(100);Umezawaea(100);
- Otu036** 36 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);unclassified(100);
- Otu037** 68 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);unclassified(100);
- Otu038** 21 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp2(100);Acidobacteria_Gpis(100);Acidobacteria_Gp2_f(100);Gp2(100);
- Otu039** 20 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp3(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu040** 9 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);Novosphingobium(100);
- Otu041** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);Zoogloea(100);
- Otu042** 10 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Bacteroidetes"_iis(100);"Bacteroidetes"_incertae_sedis_order_incetae_se(100);Ohtaekwangia(100);
- Otu043** 20 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu044** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);Pedomicrobium(100);
- Otu045** 3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Beijerinckiaceae(100);Methylovirgula(100);
- Otu046** 1 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Cytophagaceae(100);unclassified(100);
- Otu047** 8 Bacteria(100);"Armatimonadetes"(100);Armatimonadetes_s(100);Armatimonadetes_gp5_100;Armatimonadetes_gp5(100);
- Otu048** 33 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu049** 10 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Myxococcales(100);Cystobacteraceae(100);Anaeromyxobacter(100);
- Otu050** 3 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);"Acidimicrobineae(100);Aciditerrimonas(100);
- Otu051** 6 Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu052** 27 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Hyphomicrobiaceae(100);Filomicrobium(100);
- Otu053** 3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfuromonadales(100);Geobacteraceae(100);Geobacter(100);
- Otu054** 24 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp1(100);Acidobacteria_Gp1_(100);Gp1(100);
- Otu055** 5 Bacteria(100);TM7(100);TM7_class_incetae_sedis(100);TM7_order_(100);TM7_genus_incetae_sedis(100);
- Otu056** 2 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu057** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Legionellales(100);Coxiellaceae(100);Aquicella(100);
- Otu058** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Thiotrichales(100);Thiotrichales_incetae_sedis(100);Caedibacter(100);

Otu059	3 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Holophagae(100);Holophagales(100);Holophagaceae(100);Geothrix(100);
Otu060	2 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Sphingobacteriaceae(100);unclassified(100);
Otu061	3 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);Parasegetibacter(100);
Otu062	11 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Sphingobacteriaceae(100);Mucilaginibacter(100);
Otu063	2 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);Cryomorphaceae(100);unclassified(100);
Otu064	3 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu065	6 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Methylococcales(100);Methylococcaceae(100);unclassified(100);
Otu066	1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu067	6 Bacteria(100);"Nitrospira"(100);"Nitrospira"(100);"Nitrospirales"(100);"Nitrospiraceae"(100);Nitrospira(100);
Otu068	1 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp6(100);Acidobacteria_Gp6_order_incertain_sedis(100);Acidobacteria_Gp6_Gp6(100);
Otu069	12 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Chitinophagaceae(100);Ferruginibacter(100);
Otu070	7 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Roseomonas(100);
Otu071	50 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Rhodospirillaceae(100);unclassified(100);
Otu072	2 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp5(100);Acidobacteria_Gp5_order_incertain_sedis(100);Acidobacteria_Gp5(100);
Otu073	10 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);unclassified(100);
Otu074	1 Bacteria(100);"Verrucomicrobia"(100);Subdivision3(100);Subdivision3_order_incertain_sedis(100);3_genus_incertain_sedis(100);
Otu075	65 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);Acidimicrobiaceae(100);Ilumatobacter(100);
Otu076	10 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylocystaceae(100);unclassified(100);
Otu077	12 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiaceae(100);Burkholderia(100);
Otu078	1 Bacteria(100);Firmicutes(100);Bacilli(100);Bacillales(100);Bacillaceae_1(100);Bacillus(100);
Otu079	3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Sinobacteraceae(100);Steroidobacter(100);
Otu080	5 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);Sphingomonadaceae(100);Sphingomonas(100);
Otu081	5 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
Otu082	9 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Bdellovibrionales(100);Bdellovibrionaceae(100);Bdellovibrio(100);

- Otu083** 1 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);Flavobacteria(100);"Flavobacteriales"(100);Flavobacteriaceae(100);Planobacterium(100);
- Otu084** 27 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Acidimicrobiales(100);Acidimicrobiaceae(100);unclassified(100);
- Otu085** 6 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Bradyrhizobiaceae(100);unclassified(100);
- Otu086** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Xanthomonadaceae(100);Lysobacter(100);
- Otu087** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Comamonadaceae(100);Roseateles(100);
- Otu088** 2 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Holophagae(100);Holophagales(100);Holophagaceae(100);unclassified(100);
- Otu089** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylobacteriaceae(100);Methylobacterium(100);
- Otu090** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rickettsiales(100);Rickettsiaceae(100);unclassified(100);
- Otu091** 4 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Methylocystaceae(100);Methylocystis(100);
- Otu092** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Caulobacterales(100);Caulobacteraceae(100);Brevundimonas(100);
- Otu093** 1 Bacteria(100);Firmicutes(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu094** 3 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Sporichthyaceae(100);Sporichthya(100);
- Otu095** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Xanthobacteraceae(100);Pseudolabrys(100);
- Otu096** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Legionellales(100);Legionellaceae(100);Legionella(100);
- Otu097** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Methylophilales(100);Methylophilaceae(100);Methylotenera(100);
- Otu098** 3 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Pseudomonadales(100);Pseudomonadaceae(100);Pseudomonas(100);
- Otu099** 28 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Roseococcus(100);
- Otu100** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfuromonadales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu101** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Oxalobacteraceae(100);Oxalicibacterium(100);
- Otu102** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Alcaligenaceae(100);Dexia(100);
- Otu103** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Gammaproteobacteria(100);Xanthomonadales(100);Sinobacteraceae(100);unclassified(100);
- Otu104** 1 Bacteria(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteriales"(100);"Fusobacteriaceae"(100);unclassified(100);
- Otu105** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhizobiales(100);Bradyrhizobiaceae(100);Bradyrhizobium(100);
- Otu106** 1 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp7(100);Acidobacteria_Gp7_orde(100);Acidobacteria_Gp7_family;Gp7(100);

- Otu107** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Deltaproteobacteria(100);Desulfovibrionales(100);Desulfovibrionaceae(100);unclassified(100);
- Otu108** 5 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Rhodocyclales(100);Rhodocyclaceae(100);unclassified(100);
- Otu109** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Neisseriales(100);Neisseriaceae(100);Chromobacterium(100);
- Otu110** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Alcaligenaceae(100);unclassified(100);
- Otu111** 1 Bacteria(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteria"(100);"Fusobacteriales"(100);"Fusobacteriaceae"(100);Cetobacterium(100);
- Otu112** 1 Bacteria(100);"Chlamydiae"(100);Chlamydiae(100);Chlamydiales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu113** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Sphingomonadales(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu114** 1 Bacteria(100);"Verrucomicrobia"(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);unclassified(100);
- Otu115** 1 Bacteria(100);"Actinobacteria"(100);Actinobacteria(100);Actinomycetales(100);Microbacteriaceae(100);unclassified(100);
- Otu116** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiales_(100);Aquabacterium(100);
- Otu117** 1 Bacteria(100);"Bacteroidetes"(100);"Sphingobacteria"(100);"Sphingobacteriales"(100);Cytophagaceae(100);Arcicella(100);
- Otu118** 1 Bacteria(100);"Acidobacteria"(100);Acidobacteria_Gp11(100);Acidobacteria_Gp1_(100);Acidobacteria_Gp11_family_(100);Gp11(100);
- Otu119** 2 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Acetobacteraceae(100);Granulibacter(100);
- Otu120** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Alphaproteobacteria(100);Rhodospirillales(100);Rhodospirillaceae(100);Azospirillum(100);
- Otu121** 1 Bacteria(100);"Proteobacteria"(100);Betaproteobacteria(100);Burkholderiales(100);Burkholderiales_incertae_sedis(100);unclassified(100);

Tabela 14: Classificação em nível de gênero pelo MultiClassifier do RDPX das bibliotecas do rio Negro.

Gênero	RN2	RN6
	Cheia	Vazante
Microcella	1	1
Leifsonia	0	3
Terracoccus	10	120
Ornithinibacter	0	6
Renibacterium	9	1
Brevibacterium	1	0
Haloactinobacterium	0	1
Sporichthya	49	14
Fodinicola	1	8
Blastococcus	0	3
Angustibacter	1	0
Mycobacterium	4	2
Williamsia	0	2
Umezawaea	0	2
Longispora	0	2
Nocardioides	0	1
Ilumatobacter	70	332
Ferrimicrobium	2	0
Aciditerrimonas	292	190
Iamia	24	11
Conexibacter	4	7
Thermoleophilum	2	4
Euzebya	1	1
Diaphorobacter	579	533
Curvibacter	1142	2335

Brachymonas	429	68
Pelomonas	17	26
Limnohabitans	1052	513
Comamonas	419	501
Albidiferax	41	0
Lamproedia	94	14
Simplicispira	17	3
Pseudacidovorax	15	11
Hydrogenophaga	10	46
Xenophilus	12	164
Caenimonas	12	19
Ramlibacter	5	28
Malikia	1	2
Schlegelella	2	15
Acidovorax	6	7
Kinneretia	2	18
Tepidicella	1	0
Roseateles	2	2
Caldimonas	0	1
Macromonas	0	1
Ottowia	0	2
Polaromonas	0	3
Hylemonella	0	1
Polynucleobacter	2554	3401
Paucimonas	23	73
Burkholderia	1	142
Wautersia	2	7
Ralstonia	6	823
Limnobacter	1	4
Chitinimonas	1	0
Cupriavidus	0	3
Leptothrix	159	64

Thiobacter	14	9
Ideonella	5	21
Aquabacterium	25	55
Rubrivivax	1	9
Mitsuaria	4	4
Aquicola	4	2
Piscinibacter	1	2
Rivibacter	1	10
Paucibacter	1	1
Xylophilus	1	0
Tepidimonas	1	1
Inhella	0	7
Methylibium	0	1
Undibacterium	518	187
Oxalobacter	10	52
Herminiimonas	1	1
Oxalicibacterium	53	284
Duganella	11	3
Herbaspirillum	1	15
Naxibacter	0	1
Collimonas	0	2
Azohydromonas	5	12
Derxia	12	16
Bordetella	4	2
Kerstesia	11	5
Parapusillimonas	0	1
Zoogloea	31	36
Sulfuritalea	67	66
Denitratisoma	8	2
Georgfuchsia	11	7
Azonexus	11	8
Sterolibacterium	3	4

Methyloversatilis	2	0
Uliginosibacterium	1	1
Azovibrio	10	6
Dechloromonas	4	5
Azospira	5	6
Ferribacterium	0	4
Azoarcus	0	1
Aquitalea	776	1134
Chromobacterium	12	86
Pseudogulbenkiania	33	63
Vitreoscilla	1	0
Vogesella	2	16
Chitiniphilus	1	0
Leeia	0	2
Paludibacterium	0	1
Nitrospira	50	40
Methylothera	115	152
Methylobacillus	1	13
Methylovorus	3	3
Sulfuricella	2	1
Thiobacillus	1	1
Methylococcus	952	25
Methylomonas	211	5
Methylocaldum	10	1
Methylosarcina	10	0
Methylovulum	4	0
Methylomicrobium	1	0
Methylobacter	6	0
Methylosoma	1	0
Steroidobacter	2949	2305
Nevskia	2	0
Stenotrophomonas	8	0

Lysobacter	0	1
Thiopfundum	71	103
Thiohalophilus	3	1
Thiohalobacter	0	2
Arenicella	0	1
Pseudomonas	23	51
Azomonas	4	1
Serpens	1	0
Azorhizophilus	0	4
Azotobacter	0	2
Acinetobacter	2	1399
Perlucidibaca	1	4
Alkanindiges	0	35
Enhydrobacter	0	1
Alkalilimnicola	1	1
Enterobacter	1	1
Leclercia	5	5
Plesiomonas	1	0
Escherichia/Shigella	0	5
Rahnella	0	1
Legionella	24	4
Aquicella	0	6
Coxiella	0	1
Beggiatoa	1	0
Piscirickettsia	0	1
Caedibacter	0	1
Aeromonas	0	21
Methylosinus	32	2
Methylocystis	188	14
Methylopila	42	12
Methylovirgula	222	148
Methylocella	372	800

Methylocapsa	28	115
Beijerinckia	326	589
Filomicrobium	31	90
Pedomicrobium	17	1
Hyphomicrobium	48	102
Blastochloris	9	6
Methylorhabdus	4	9
Rhodoplanes	10	4
Prosthecomicrobium	1	0
Rhodomicrobium	1	1
Devosia	0	1
Angulomicrobium	0	1
Bosea	19	12
Agromonas	11	12
Salinarimonas	4	6
Oligotropha	11	11
Rhodoblastus	5	2
Bradyrhizobium	2	9
Nitrobacter	1	2
Azorhizobium	1	0
Pseudolabrys	33	49
Xanthobacter	1	0
Ancylobacter	0	1
Bauldia	3	2
Amorphus	1	0
Vasilyevaea	0	1
Methylobacterium	1	6
Phyllobacterium	2	2
Ensifer	1	0
Parvibaculum	0	2
Roseococcus	42	35
Belnapia	4	6

Roseomonas	87	151
Acidisphaera	77	62
Tanticharoenia	14	9
Granulibacter	22	26
Ameyamaea	88	55
Asaia	35	10
Acidicaldus	12	3
Rhodopila	48	24
Neoasaia	2	2
Rubritepida	3	3
Kozakia	4	1
Acidisoma	27	22
Rhodovarius	11	6
Stella	3	2
Neokomagataea	1	0
Paracraurococcus	0	2
Dongia	271	85
Telmatospirillum	22	4
Skermanella	25	2
Magnetospirillum	3	3
Phaeospirillum	6	0
Azospirillum	3	4
Pelagibius	1	0
Desertibacter	1	0
Brevundimonas	17	10
Phenylobacterium	445	248
Caulobacter	2	3
Asticcacaulis	1	4
Hellea	0	1
Rhizomicrobium	205	102
Elioraea	1	0
Orientia	27	47

Rickettsia	8	20
Neorickettsia	1	0
Sphingosinicella	2	4
Blastomonas	14	21
Novosphingobium	50	39
Sphingomonas	3	12
Sandaracinobacter	0	4
Sandarakinorhabdus	0	1
Erythromicrobium	1	0
Porphyrobacter	1	0
Erythrobacter	0	4
Rhodobacter	1	0
Agaricicola	3	0
Catellibacterium	0	1
Kiloniella	0	9
Bdellovibrio	486	77
Bacteriovorax	4	1
Kofleria	71	103
Phaselicystis	45	51
Byssovorax	22	52
Chondromyces	6	17
Anaeromyxobacter	47	38
Cystobacter	2	0
Melittangium	30	0
Archangium	1	0
Myxococcus	0	1
Desulfoglaeba	1	0
Desulfacinum	1	0
Desulfovirga	0	1
Syntrophobacter	0	1
Syntrophus	2	0
Smithella	2	5

Geothermobacter	2	1
Geobacter	14	17
Pelobacter	1	0
Syntrophorhabdus	2	2
Desulfarculus	0	1
Desulfovibrio	0	1
Sulfurimonas	3	0
Sulfuricurvum	1	0
Dehalospirillum	1	2
Sediminibacterium	900	1093
Parasegetibacter	251	448
Lacibacter	41	24
Ferruginibacter	88	112
Hydrotalea	34	32
Segetibacter	10	12
Niabella	3	3
Terrimonas	12	94
Flavisolibacter	5	101
Filimonas	5	9
Niastella	8	11
Flavitalea	1	16
Flaviumibacter	1	8
Mucilaginibacter	198	55
Nubsella	27	48
Solitalea	2	10
Cesiribacter	9	16
Meniscus	1	4
Arcicella	0	4
Haliscomenobacter	2	28
Ohtaekwangia	65	53
Prolixibacter	0	1
Fluviicola	4	26

Owenweeksia	1	1
Wandonia	1	2
Lishizhenia	0	2
Planobacterium	134	183
Myroides	1	0
Elizabethkingia	8	0
Chryseobacterium	0	6
Cloacibacterium	0	1
Paludibacter	2	3
Bacteroides	1	3
Alistipes	1	0
Prevotella	0	4
Hallella	0	1
Anaerobacter	0	4
Clostridium sensu stricto	0	3
Dethiobacter	1	0
Falsibacillus	1	0
Bacillus	6	2
Marinococcus	1	0
Fontibacillus	0	15
Bryobacter	342	265
Gp3	2292	1393
Geothrix	81	21
Holophaga	11	3
Gp1	54	50
Acidobacterium	21	1
Granulicella	1	0
Terriglobus	2	1
Edaphobacter	0	1
Gp7	8	3
Gp2	34	30
Gp15	4	3

Gp5	4	6
Gp11	2	5
Gp13	2	4
Gp12	1	2
Gp16	1	0
Gp6	0	8
Gp24	0	1
Gp22	0	5
Gp23	0	1
Opiritatus	2	1
Subdivision3_genera_incertae_sedis	7	19
Spartobacteria_genera_incertae_sedis	1	0
Verrucomicrobium	0	2
Bangiophyceae	44	31
Bacillariophyta	128	83
Cryptomonadaceae	20	21
Chlorarachniophyceae	4	2
GpIV	0	2
GpVI	0	1
Nitrospira	20	35
Gemmatimonas	54	140
Neochlamydia	12	26
Parachlamydia	7	21
Simkania	5	10
Dehalogenimonas	2	2
Turneriella	1	0
Treponema	2	0
Armatimonadetes_gp5	11	16
Cetobacterium	1	6
TM7_genera_incertae_sedis	3	6
Chlorobaculum	1	0