

Ocorrência de archaea em reservatório de água doce de região tropical semiárida

O presente trabalho teve como objetivo analisar variações sazonais na composição das comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton, durante três anos consecutivos, e avaliar as possíveis influências de variáveis limnológicas e de fatores climáticos sobre as comunidades procarióticas na coluna de água da Barragem Armando Ribeiro Gonçalves. PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) e DGGE (Eletoforese em gel com gradiente de desnaturação) foram usadas para analisar as composições das comunidades procarióticas heterotróficas do reservatório influenciado por períodos alternados de chuva e estiagem. A abundância do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a riqueza dos amplicons da DGGE foram mais influenciadas pela pluviosidade, pela temperatura da água e pela concentração de fósforo total. A análise de componentes principais (PCA) mostrou fortes correlações entre estes fatores. A análise de correspondência canônica (CCA) revelou diferenças temporais na composição das comunidades de Bactéria e Archaea relacionadas à pluviosidade, ao volume do reservatório, à temperatura e à densidade de bactérias e arqueas, indicando a predominância dos fatores ligados aos eventos de precipitação com influência significativa sobre estrutura dessas comunidades, possivelmente compostas por populações permanentes e populações transitórias que influenciam a qualidade ambiental. O destaque da ocorrência de Archaea no reservatório abre uma nova possibilidade de investigação para futuros estudos sobre as interações das comunidades microbianas e as consequências das suas atividades.

Palavras-chave: Bacterioplâncton; Arqueoplâncton; DGGE.

Occurrence of archaea in a man-made freshwater reservoir of tropical semiarid region

This work aimed to analyze seasonal variations in bacterioplankton and archaeoplankton community composition and evaluate possible influences of limnological and climatic variables on the prokaryotic communities in the water column of the Armando Ribeiro Gonçalves Dam during three consecutive years. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) were used to analyze the compositions of the heterotrophic prokaryotic communities of the reservoir influenced by alternating periods of rain and drought. Bacterial and archaeal abundance, and DGGE bands richness were influenced by pluviosity, water temperature, and total phosphorus (TP). Principal Component Analysis (PCA) showed strong correlations among these variables. Canonical Correspondence Analysis (CCA) evidenced temporal shifts on bacterial and archaeal community composition, associated with the pluviosity, reservoir volume, water temperature, and prokaryotic density. This suggests the predominance of factors associated to precipitation events on microbial community structure, that is probably composed by persistent and transitory populations which may influence the environmental quality, including archaeal populations. Highlight of archaeal occurrence in the reservoir opens a new research view for next studies on the interrelation of microbial communities and consequences of their activities.

Keywords: Bacterioplankton; Archaeoplankton; DGGE.

Topic: **Microbiologia Agrícola e Ambiental**

Received: **10/02/2017**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Approved: **12/04/2017**

Luiz Sodré Neto

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/8809866931227584>
luizsodre@ufcg.edu.br

Mirna Helena Regali-Seleghim

Universidade Federal de São Carlos, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5998337634888263>
seleghim@uol.com.br

Magnólia Fernandes Florêncio Araújo

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/4511989641459455>
magffaraujo@gmail.com

Carlos Alfredo Galindo Blaha

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2307806644081146>
cb.bioinformatica@gmail.com



DOI: 10.6008/SPC2179-6858.2017.003.0001

Referencing this:

SODRÉ NETO, L.; SELEGHIM, M. H. R.; ARAÚJO, M. F. F.; BLAHA, C. A. G.. Ocorrência de archaea em reservatório de água doce de região tropical semiárida. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.8, n.3, p.1-14, 2017. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2179-6858.2017.003.0001>

INTRODUÇÃO

Os reservatórios do semiárido brasileiro, além do potencial hidrelétrico em alguns casos, também são utilizados para fins de abastecimento público, atividades de aquicultura, irrigação e lazer, interferindo fortemente no desenvolvimento social e econômico das cidades abastecidas pelas suas águas. Por outro lado, tais atividades antrópicas nesses ecossistemas não naturais interferem na qualidade da água e podem provocar alterações na dinâmica das comunidades aquáticas.

Muitos reservatórios são eutrofizados e apresentam elevadas concentrações de nutrientes e altas densidades de microrganismos. A eutrofização artificial também proporciona o desenvolvimento das comunidades procarióticas, e o aumento na produção secundária dessas comunidades promove uma diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido na água, comprometendo outras comunidades aquáticas aeróbias e refletindo negativamente na economia e na saúde das populações humanas que usam essas águas.

Elevados índices de doenças de veiculação hídrica registrados (NASCIMENTO et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2016), bem como as eventuais baixas na produção pesqueira, podem estar relacionados às consequências das atividades de uma variedade de microrganismos com elevadas densidades encontradas nesses ambientes (valores médios na ordem de 10^7) normalmente encontradas em ambientes aquáticos eutróficos da região semiárida (BOUVY et al., 1998; ARAÚJO et al., 2007; SODRÉ-NETO et al., 2008).

Atividades microbianas são responsáveis pela maioria dos processos biogeoquímicos na coluna d'água (PERNTHALER et al., 2005) e o conhecimento dos fatores que controlam a composição e diversidade microbiana é importante para o entendimento de como os microrganismos atuam nestes processos (MUSHEGIAN et al., 2011).

Dentre os componentes microbianos do plâncton, as bactérias são abundantes e ecologicamente importantes nos ecossistemas pelágicos (JARDILLIER et al., 2004), tanto nos oceanos quanto em ambientes continentais (LINDSTRÖM et al., 2005). Entretanto, um número relativamente pequeno de grupos bacterianos parece dominar o plâncton dos ambientes de água doce, mesmo daqueles que apresentam grandes diferenças físicas, químicas e biológicas (ZWART et al., 2002).

Além do bacterioplâncton, o arqueoplâncton também é envolvido em vários processos bioquímicos que acontecem em ecossistemas de água doce (ZHANG et al., 2015) e essas comunidades procarióticas são amplamente responsáveis pela parte oxidativa do ciclo do carbono de formas reduzidas de N e S de origem biótica (GIOVANNONI et al., 2012). Os ecossistemas de água doce têm sido revelados como grandes reservatórios de diversidade arqueana (AUGUET et al., 2010) e, considerando este aspecto, Jacob et al. (2011) usaram o termo *Prokaryote Net Production (PNP)* para destacar também a representatividade do Domínio *Archaea* em sua pesquisa, embora as relações entre as comunidades do arqueoplâncton e as variáveis ambientais permaneçam ainda pouco entendidas (YANG et al., 2016).

Estudos moleculares têm sido uma alternativa para avaliar a diversidade procariótica no sentido de saber quem são os organismos presentes numa amostra e quais as suas potenciais funções (BRONNER et al., 2016). Métodos independentes de cultivo, como a DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de

Desnaturação) (MUYZER et al., 1993), associada à PCR, são usados no estudo de comunidades planctônicas em ambientes lênticos (WEVER et al., 2005). Uma vantagem primária do método é a possibilidade de processar múltiplas amostras simultaneamente de forma rápida e econômica (GREEN et al., 2009), além de proporcionar uma visão aceitável das diferenças e similaridades das populações dominantes das comunidades microbianas (LINDSTRÖM e LESKINEN, 2002).

Com base nesse cenário, objetivou-se, neste trabalho, analisar variações sazonais na composição das comunidades microbianas, utilizando PCR/DGGE, e avaliar as possíveis influências de variáveis limnológicas e de fatores climáticos sobre as comunidades procarióticas. A importância da pesquisa é justificada também pelo ineditismo da possível ocorrência de *Archaea* em água destinada ao consumo humano no semiárido.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e amostragem

A Barragem Armando Ribeiro Gonçalves (05°67' S; 36°88' W) é um reservatório eutrófico do semiárido brasileiro, formado pelo barramento do rio Piancó-Piranhas-Assu, destinado a múltiplos usos, com capacidade para armazenar 2,4bi m³ e bacia hidráulica com área de 195Km². O reservatório é responsável pelo suprimento de água para cerca de 400 mil pessoas e para a irrigação de 2500ha de fruticultura. A figura 1 mostra a Bacia hidrográfica em estudo e a localização do ponto de coleta das amostras de água, próximo à parede do reservatório.

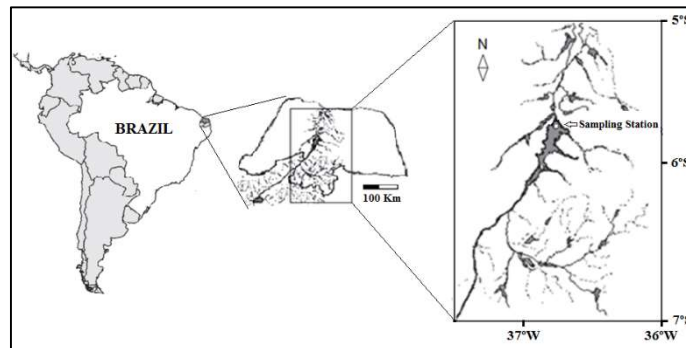


Figura 1: Bacia Hidrográfica do Rio Piranhas-Assu e localização do ponto de coletas na Barragem Armando Ribeiro Gonçalves.

Um total de 11 coletas foi realizado entre março/2010 e março/2012, abrangendo períodos com presença e ausência de chuva. Em cada coleta, uma amostra de água da subsuperfície (0.5m), uma amostra da profundidade máxima (0.5m acima do sedimento), e quatro amostras de profundidades intermediárias foram coletadas com uma garrafa de Van Dorn (5l) e integradas para formar uma amostra da coluna d'água com um volume total de 30l. Alíquotas de volumes variados foram retiradas da amostra integrada para as estimativas de densidade de procariotos heterotróficos e de fitoplâncton. As amostras para as análises moleculares de DNA, especificamente, foram coletadas diretamente da superfície, filtradas, concentradas e armazenadas sob refrigeração.

Extração do DNA das amostras de água

Em cada coleta, um volume total de 100l de água da superfície do reservatório foi filtrado em malhas com 68 μ m e 20 μ m de poro, para a retirada de organismos maiores, e concentrado em frasco âmbar estéril de 1l, acondicionado no gelo até a chegada ao laboratório e processado em até 3h após a coleta. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se o Kit Power Water® DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc. CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, a presença de DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, corado com SYBR Green. A visualização e captura das imagens dos géis foram feitas em sistema de fotodocumentação L-Pix Ex (Loccus biotecnologia) e a quantificação do DNA (ng μ l⁻¹) foi realizada por meio de NanoVue™ Plus Spectrophotometer.

PCR/DGGE

Para a detecção molecular das comunidades do Domínio *Bacteria*, pelo uso de PCR/DGGE, foram usados os primers que amplificam o gene ribossomal 16S rDNA: GC-341f (CCT ACG GGA GGC AGC AG) (MUYZER et al., 1993). e 907r (CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT) (JOULIAN et al., 2001). Para as comunidades do Domínio *Archaea*, também pela amplificação do gene 16S rDNA, os primers usados foram: GC-344f (ACG GGG CGC AGC AGG CGC GA) (STAHL et al., 1991) e 958r (YCC GGC GTT GAM TCC AAT T) (DELONG, 1992). A sequência do grampo GC utilizado foi CGC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G (MUYZER et al., 1993).

As amplificações foram realizadas utilizando-se o kit PCR Master Mix 2X (Promega) contendo *Taq* DNA polymerase (50 unidades mL⁻¹), dNTPs (400 μ M de cada: dATP; dGTP; dCTP; dTTP), MgCl₂ (3mM) e os tampões de reação (pH 8,5) em concentrações ótimas para uma amplificação eficiente das amostras de DNA. Cada reação continha 12,5 μ L de PCR Master Mix, 1 μ L do primer (f), 1 μ L do primer (r), 40ng de DNA e água livre de nuclease em quantidade suficiente para completar 25 μ L de volume final.

As reações de PCR foram submetidas a uma desnaturação inicial de 3min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 1min de desnaturação a 94°C, 1min de anelamento a 55°C e 1min de extensão a 72°C, com uma extensão adicional de 10min a 72°C no final para que fossem completadas as eventuais polimerizações parciais.

Os amplicons de DNA de 550 e 600bp, para domínio *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente, obtidos na PCR, foram submetidos à DGGE em géis de poliacrilamida 6% (GREEN et al., 2009), com gradiente de desnaturação de 15 a 55%, considerando 100% desnaturante uma solução com Ureia 7 M e formamida 40% vol/vol (YU et al., 2004). As eletroforeses dos géis de 160mm de comprimento e 1mm de espessura ocorreram no equipamento DGGE-1001, 250 VDC/ 30 W/ 80 mA/ 70°C, usando tampão TAE 1 X (Tris 40mM [pH 8,0], ácido acético 20mM e EDTA 1mM) sob uma temperatura constante de 60°C e tensão de 75V durante 16h (MUYLAERT et al., 2002). A revelação dos géis foi feita seguindo método de coloração pela prata proposto por Sanguinetti et al. (1994).

Análise de DGGE

As fotografias digitais dos géis de DGGE foram analisadas e os amplicons identificados com o auxílio do software LabImage (Kapelan Bio-Imaging GmbH, Germany). Considerando-se a presença (1) ou ausência (0) de amplicons (bands) nos géis do DGGE, foram construídas matrizes binárias. As similaridades entre os padrões de amplicons dos géis foram quantificadas usando o coeficiente de distância de Bray-Curtis (BUESING et al., 2009) e os coeficientes de similaridades foram usados para a construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) e método de Ward.

Variáveis limnológicas

Variáveis limnológicas, tais como temperatura da água, oxigênio dissolvido (DO) e pH foram medidas *in situ*, com uma sonda multiparamétrica YSI 6820 V2. A transparência da água foi medida com um disco de Secchi e as concentrações de fósforo total (TP) foram determinadas segundo Valderrama (1981). As medições foram realizadas em espectrofotômetro segundo APHA (1998). Os dados de precipitação e de volume do reservatório foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), respectivamente.

Quantificação do Bacterioplâncton, Arqueoplâncton e Fitoplâncton

Amostras de 20mL para a contagem de células procarióticas heterotróficas foram fixadas com formalina tamponada (concentração final de 2%; pH 7,4). Subamostras de 1 a 2mL foram coradas com uma solução de laranja de acridina 0,01% (HOBBIE et al., 1977) e filtradas em membrana preta de polycarbonato (Millipore®, GTBP), com 0,2µm de diâmetro de poro, usando um filtro suporte (Poretics®) de 0,45µm de diâmetro de poro para distribuir as amostras uniformemente.

As soluções utilizadas foram pré-filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2µm. As membranas foram montadas entre lâmina e lamínula, cobertas com óleo de imersão não-fluorescente e contadas em um microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) com aumento de 1250x (espelho dicróico DM500, filtro de excitação BP460-490 e filtro barreira BA5201F). Pelo menos 300 células bacterianas foram contadas por filtro, em 15 a 20 campos microscópicos.

Para análise quantitativa e observação das variações temporais do fitoplâncton foram retiradas alíquotas de 300mL da amostra integrada e fixadas com lugol acético 1%. A quantificação foi realizada seguindo os métodos de Utermöhl (1958) e Lund et al. (1958), utilizando-se um microscópio invertido Olympus IX70.

Analises multivariadas

Análises de componentes principais (PCA) e de correspondência canônica (CCA) foram realizadas para avaliar as possíveis correlações entre variáveis limnológicas e a densidade e diversidade da comunidade

procariótica. Os testes de correlação, as construções dos dendrogramas e as análises multivariadas foram desenvolvidos no software PAST versão 1.91 (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de PCR/DGGE

Fragmentos de DNA do gene 16S rRNA foram amplificados em todas as amostras com os primers GC-341f – 907r (*Bacteria*), enquanto apenas 4 das 11 amostras foram amplificadas com sucesso utilizando-se os primers GC-344f – 958r (*Archaea*). Os géis da DGGE revelaram 71 amplicons diferentes, sendo 43 distribuídas entre as onze amostras de *Bacteria* e 28 entre as quatro amostras de *Archaea*.

Apenas 4 amplicons de *Bacteria* foram detectados em apenas um dos meses de coletas. 5 amplicons ocorreram em todos os meses de coletas. Ocorreram 18 amplicons de *Archaea* em apenas um dos meses, enquanto outros 3 estiveram presentes nos quatro meses em que o Domínio *Archaea* foi detectado. Os demais amplicons, 34 de *Bacteria* e 7 de *Archaea*, foram observadas na maioria dos meses analisados. Os resultados das análises dos géis da DGGE, expressos na forma de eletroferogramas, como se nota nas figuras 2, 3, 4 e 5, que representam a riqueza de amplicons de cada amostra coletada.

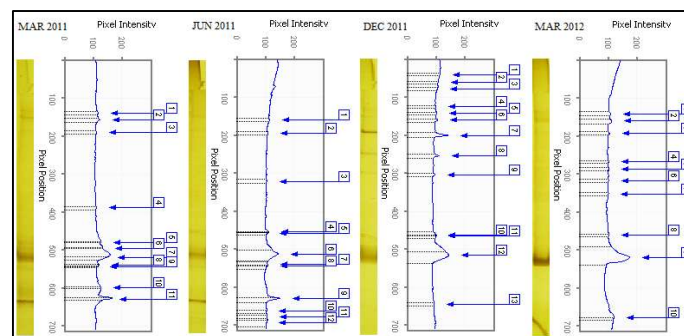


Figura 2: Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades dos amplicons de *Archaea* em cada mês de coleta.

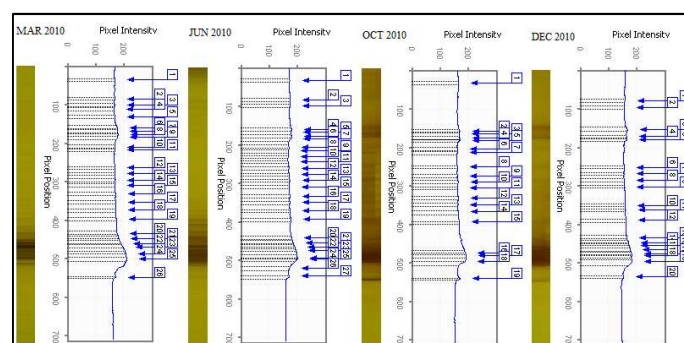


Figura 3: Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades dos amplicons de *Bacteria* em cada coleta.

Os amplicons ocorreram em menor número nos meses de outubro/2010, dezembro/2010, outubro/2011, quando foram registrados os menores valores médios para densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton, concentração de TP e pluviosidade. Por outro lado, nos meses de março/2011 e junho/2011, somando-se os resultados da DGGE de *Bacteria* e *Archaea*, ocorreu a maior riqueza de amplicons, quando as densidades dos organismos e as concentrações de TP também foram mais elevadas, e o reservatório atingiu

o seu volume máximo em função do volume de chuvas concentrado no período. As similaridades entre os amplicons e entre os respectivos meses, representadas na forma de dendrogramas, revelaram predominantemente composições parecidas entre os meses chuvosos e entre os meses de estiagem de cada ano.

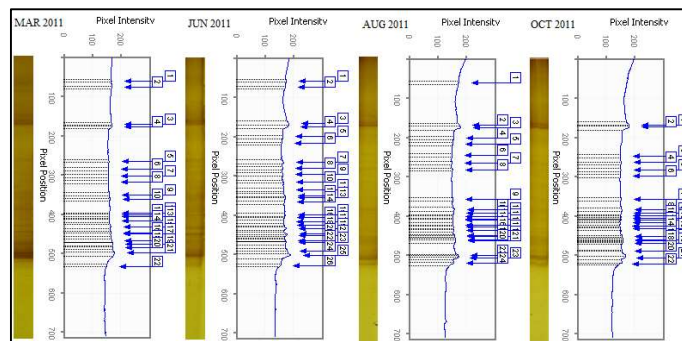


Figura 4: Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades dos amplicons de *Bacteria* em cada coleta.

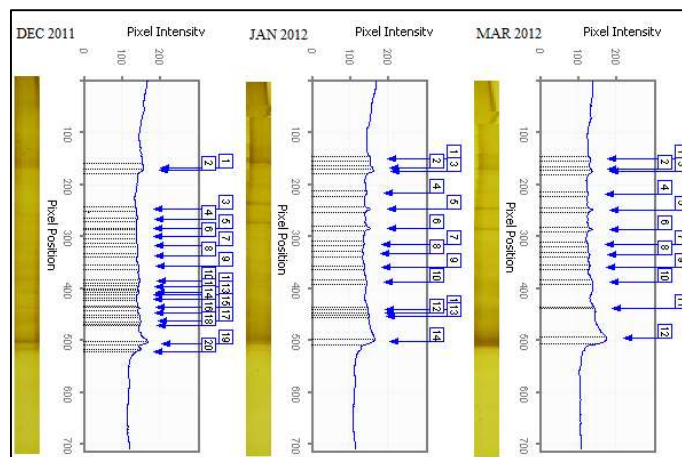


Figura 5: Eletroferogramas com os picos referentes às presenças e intensidades dos amplicons de *Bacteria* em cada coleta.

Na figura 6, os dendrogramas apresentam, de acordo com as distribuições dos amplicons de *Archaea* (A1 – A28), uma distância maior entre os meses de chuva e o mês de estiagem (dezembro/2011), e uma similaridade maior entre junho/2011 e março/2012, mesmo sendo meses com a presença de chuva em anos diferentes. Isto pode indicar uma sazonalidade na composição e uma forte influência das precipitações sobre as populações dominantes desse domínio.

Os dendrogramas da figura 7, baseados nas distribuições dos amplicons de *Bacteria* (B1 – B43), mostram uma maior similaridade entre os meses (distância máxima = 0,45) do que os do domínio *Archaea* (distância máxima = 0,65), e proximidades entre os meses chuvosos e entre os meses de estiagem em um mesmo ano, embora apresentem menores similaridades entre os períodos chuvosos e entre os períodos de estiagem de anos diferentes.

Os perfis de distribuição dos amplicons do DGGE nos períodos avaliados constituem os primeiros dados sobre a composição de comunidade bacteriana e arqueana em reservatórios do semiárido brasileiro. Não há registros de estudos anteriores sobre a composição da comunidade de *Bacteria* e *Archaea* do plâncton, de forma simultânea, em ecossistemas de água doce de região semiárida. Casamayor et al. (2001) e Laque et al. (2010), usando DGGE, também observaram alterações em escala temporal na composição de

comunidades de *Archaea* e de *Bacteria*, respectivamente, mas separadamente e em ambientes sob influência de outros climas.

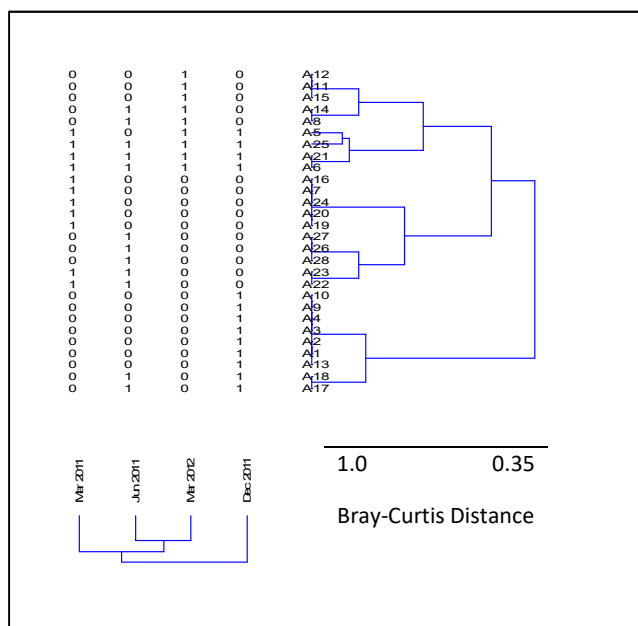


Figura 6: Dendrogramas dos padrões de distribuição das 28 amplicons de *Archaea* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) dos amplicons no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.

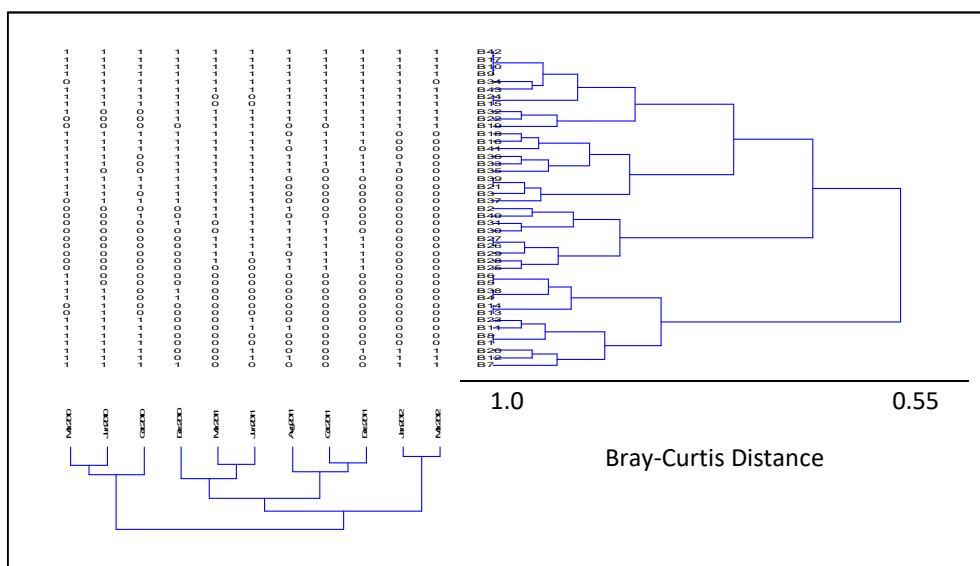


Figura 7: Dendrogramas dos padrões de distribuição das 43 amplicons de *Bacteria* e dos respectivos meses de amostragem. Os agrupamentos hierárquicos foram definidos a partir da presença (1) ou ausência (0) dos amplicons no algoritmo UPGMA, usando o método de Ward com base nas distâncias de Bray-Curtis.

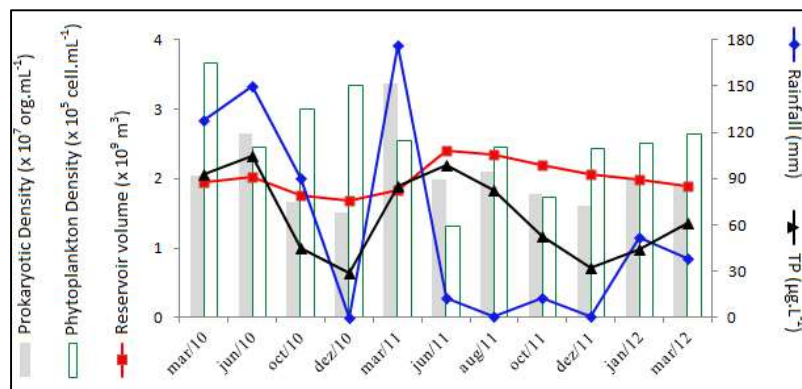
Variáveis limnológicas

A análise das variáveis limnológicas incluiu a densidade dos procariotos heterotróficos, considerando *Bacteria* e *Archaea*, a densidade do fitoplâncton e os eventos de precipitação nos meses de coletas, além da parte físico-química das variáveis que foram usadas para o estudo das relações com as comunidades microbianas detectadas. Tais fatores estão apresentados tabela 1, com os valores mínimos, máximos e médios. As respectivas flutuações nos meses de coletas estão representadas na figura 8.

Tabela 1: Variáveis limnológicas (médias e valores mínimo e máximo) do ponto de coleta das amostras (11 amostragens independentes) de água entre os meses de março de 2010 e março de 2012.

Variável	Média	Mínimo – Máximo
Densidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (10^7 Org mL ⁻¹)	2.06	1.52 – 3.38
Densidade do Fitoplâncton (10^5 Org mL ⁻¹)	2.18	1.17 – 5,60
Fósforo Total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	66.27	29 – 105
Temperatura da água (°C)	28.86	27.6 – 31.7
pH	8.89	8 – 9.64
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	4.99	1.8 – 9.2
Volume do Reservatório ($\times 10^9$ m ³)	2.01	1.691 – 2.4
Pluviosidade (mm)	60.1	0 – 176.1
Transparência da água (m)	0.82	0.6 – 1.2

As densidades médias do bacterioplâncton e arqueoplâncton, na ordem de 10^7 org mL⁻¹, foram mais elevadas nos períodos chuvosos do que nos períodos de estiagem ($p = 0,038$), assim como as concentrações de TP ($p = 0,015$). Os demais fatores não variaram significativamente entre os períodos estudados. Densidades semelhantes foram descritas por Sodré-Neto e Araújo (2008), no mesmo reservatório, e por Araújo e Costa (2007) em outros cinco reservatórios eutróficos da mesma bacia hidrográfica. Em sistemas aquáticos tropicais da África, Bettarel et al. (2006) também encontram valores parecidos para a densidade dos procariotos.

**Figura 8:** Comportamento da densidade do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (Prokaryotic Density ($\times 10^7$ Org mL⁻¹)) e fitoplâncton (phytoplankton density ($\times 10^5$ Cell mL⁻¹)) (colunas), e flutuações no volume do reservatório (Reservoir volume ($\times 10^9$ m³)), pluviosidade (Rainfall (mm)), e fósforo total (TP ($\mu\text{g L}^{-1}$)).

Considerando, também, a presença de *Archaea* no plâncton, assim como no presente trabalho, Casamayor et al. (2001) encontraram densidades similares em lagos temperados da Espanha e Alpes Su cos. Em outras regiões sem influência do clima semiárido, valores de densidades procarióticas inferiores, na ordem 10^6 cells mL⁻¹, foram descritos com frequência mesmo em ambientes de água doce tropicais (ABE et al., 2003; WEVER et al., 2005) ou em diferentes latitudes (ZWISLER et al., 2003; NISHIMURA et al., 2007; NIU et al., 2011).

Em regiões temperadas, a temperatura da água é considerada um fator determinante para mudanças sazonais na estrutura das comunidades procarióticas heterotróficas (LINDSTR M et al., 2005), embora não influencie sozinha as mudanças em curto prazo (MUELLER-SPITZ et al., 2009). Em relação às concentra es m dias do TP, considerado fator limitante no reservatório caracteristicamente eutrófico em estudo, elas são frequentemente superiores a $60\mu\text{g L}^{-1}$ (ESKINAZI-SANT'ANNA et al., 2007; SODRÉ-NETO et al., 2008; COSTA et al., 2009). Eskinazi-Sant'Anna et al. (2007), Sodré-Neto et al., (2008); Costa et al. (2009) também encontraram

valores de pH acima de 8 no reservatório, similares ao pH de outros reservatórios do semiárido (FREIRE et al., 2009).

Análises Multivariadas

A abundância do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a distribuição dos amplicons detectados por PCR/DGGE foram mais influenciadas pela pluviosidade, temperatura da água e concentração de TP, sugerindo um aumento nas atividades microbianas com a chegada do TP alóctone pela chuva, sob temperaturas mais elevadas. Outra explicação para esta correlação seria a chegada de TP e de procaríotos alóctones da bacia de drenagem, aumentando as respectivas concentrações e densidades nos períodos chuvosos e coincidindo com as temperaturas um pouco mais elevadas nestes períodos, já que a temperatura local sofre pouca variação temporal e parece não influenciar isoladamente a estrutura dessas comunidades no semiárido.

Observaram-se fortes correlações entre o TP e o número de amplicons do DGGE nos meses mais chuvosos e entre a densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton e a pluviosidade. Na PCA, ilustrado na figura 9, o componente 1, relacionado à temperatura da água, explicou 39% da variabilidade dos meses estudados e o componente 2, relacionado ao número total de amplicons e ao TP, explicou 32%. O mês de Março/2012 foi menos relacionado à pluviosidade do que março/2010 e março/2011 devido à estiagem prolongada de 2011 para 2012.

Os resultados da PCA indicam uma provável dominância dos fatores ligados aos eventos de precipitação dentre os que influenciaram a composição da comunidade bacteriana e arqueana no reservatório em estudo. A matéria orgânica introduzida pelo rio também contribui para as mudanças na estrutura das comunidades, além dos processos autóctones como as florações do fitoplâncton (NIU et al., 2011).

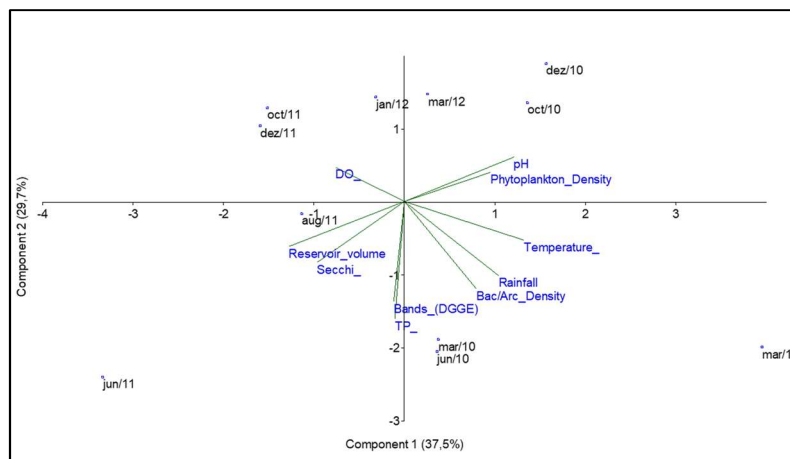


Figura 9: Biplot da PCA evidenciando as correlações entre o número de amplicons do DGGE, as densidades de microrganismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, e as demais variáveis ambientais estudadas. Os componentes 1 e 2 explicam 67,2% da variação dos conjuntos de dados dos meses de coletas.

Em estudo sobre a influência da entrada de água sobre os organismos planctônicos no semiárido espanhol, Angeler et al. (2000) não encontraram correlação significativa entre os eventos de inundação e as bactérias, mas destacaram que o seu crescimento pode ter se dado em função dos nutrientes alóctones

associados à entrada de água. A CCA, conforme se nota na figura 10, baseada nos dados do DGGE e das variáveis ambientais, revelou diferenças temporais na composição da comunidade bacteriana e arqueana mais relacionadas à pluviosidade, ao volume do reservatório, à temperatura e à densidade do bacterioplâncton e arqueoplâncton.

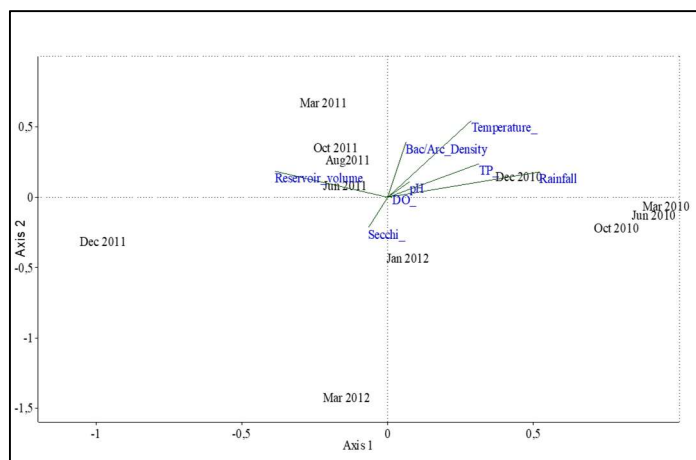


Figura 10: CCA evidenciando o padrão de distribuição dos amplicons do DGGE, indicado pelos meses de amostragem, relacionado às variáveis ambientais Pluviosidade (mm), Temperatura (°C), Densidades do Bacterioplâncton e Arqueoplâncton (Org mL⁻¹), Volume do Reservatório (x 10⁹ m³), pH, DO (mg L⁻¹), Secchi (m) e TP (µg L⁻¹).

Os eixos 1 e 2 apresentaram autovalores elevados em relação aos demais e explicaram 58,5% das variações observadas, sendo o primeiro eixo relacionado positivamente à pluviosidade ($r=0,53$) e negativamente ao volume do reservatório ($r=-0,38$). O segundo eixo foi positivamente relacionado à temperatura ($r=0,55$) e à densidade dos organismos (0,39). Os resultados evidenciaram a influência dos fatores ligados aos períodos chuvosos sobre a estrutura da comunidade e explicaram parte dos agrupamentos dos meses mais similares, em relação aos perfis de amplicons, mostrados na Figura 8.

De todo o conjunto das variáveis estudadas, a pluviosidade influenciou mais na similaridade entre os perfis de distribuição dos amplicons obtidas nos meses de março/2010, junho/2010 e outubro/2010. Nos meses de agosto/2011, outubro/2011 e dezembro/2011 os perfis foram mais influenciados pelo volume do reservatório.

As análises multivariadas mostraram influências de fatores sobre a maior parte da distribuição dos amplicons nos meses estudados. De modo geral, os tamanhos das populações microbianas são controlados por fatores como a competição por diferentes substratos, mortalidade pela incidência de radiação UV, lise viral e predação seletiva, dentre outros fatores 'top down' e 'bottom up' (PERNTHALER et al., 2005). Entretanto, as adaptações ambientais explicam a abundância e a distribuição das assembleias microbianas em múltiplas escalas de estudo (BARBERÁN et al., 2010). Apesar de aparecerem correlações lineares entre algumas variáveis limnológicas isoladas, não houve um padrão de correlação e isto pode indicar uma adaptação de comunidades específicas a diferentes combinações de variáveis que determinam as condições ambientais em um dado momento.

Sugere-se pelos resultados que as comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton são compostas por populações permanentes e populações transitórias que coexistem principalmente nos períodos de chuva. Pode-se inferir também que deve haver uma maior sensibilidade de *Archaea* às variações

ambientais pontuais, aumentando e diminuindo as densidades das populações existentes de acordo com a combinação de fatores em cada momento. A primeira sugestão parece explicar melhor o que acontece em reservatórios, pois nestes sistemas a composição das comunidades é mais influenciada pelo efeito de massa, por meio da entrada de organismos, e menos pelos fatores ambientais locais (LOGUE et al., 2008), apesar de poder haver, também, influência da presença de *Archaea* do sedimento na comunidade planctônica, como no caso das comunidades apresentadas por Fillol et al. (2015) em lagos de água doce da Espanha.

A presença de microrganismos do domínio *Archaea* no plâncton e a sua possível interferência nos valores de densidade procariótica, atribuídos até hoje exclusivamente para *Bacteria* nos reservatórios do semiárido, alertam para a necessidade de investigação da atividade desses organismos e da sua contribuição na biomassa planctônica e conseqüentemente na produção secundária dos reservatórios.

CONCLUSÕES

As análises permitiram inferir que há dois momentos de estabilidade no conjunto de variáveis ambientais do reservatório, um quando o volume de água armazenada é menor e outro quando o volume é maior, e que essas estabilidades são quebradas pelos eventos de chuva e pela perda de água, respectivamente. As comunidades do bacterioplâncton e arqueoplâncton locais, portanto, parecem ter as suas densidades determinadas pelas condições ambientais de cada período, e as suas composições direcionadas pela entrada de populações transitórias com a chuva.

Este trabalho fornece novas informações sobre as respostas dessas comunidades às variações ambientais em reservatórios do semiárido, com destaque para a ocorrência de *Archaea*. Porém, a determinação da importância relativa dos fatores para a estrutura das comunidades em termos de funcionamento dos ecossistemas aquáticos de regiões semiáridas, onde a sazonalidade é regida por estações alternadas de chuva e estiagem, é um grande desafio. Outros estudos com abordagens moleculares, incluindo sequenciamento de fragmentos de DNA do gene 16S rRNA, poderão apresentar os taxa predominantes de *Archaea* e *Bacteria* nos diferentes períodos de chuva e estiagem e esclarecer a influência da entrada de água nos reservatórios sobre as comunidades aquáticas dos reservatórios.

REFERÊNCIAS

- ABE, D. S.; TUNDISI, T. M.; ROCHA, O.; TUNDISI, J. G.. Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hydrobiologia*, v.504, p.67-76, 2003.
- ANGELER, D. G.; ALVAREZ-COBELAS, M.; ROJO, C.; SÁNCHEZ-CARRILLO, S.. The significance of water inputs to plankton biomass and trophic relationships in a semi-arid freshwater wetland (central Spain). *Journal of Plankton Research*, v.22, p.2075-2093, 2000.
- APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Olympia: American Public Health Association, 1998.
- ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, I. A. S.. Comunidades microbianas (bacterioplâncton e protozooplâncton) em reservatórios do semi-árido brasileiro. *Oecologia Brasiliensis*, v.11, p.422-432, 2007.
- AUGUET, J. C.; BARBERÁN, A.; CASAMAYOR, E. O.. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal*, v.4, p.182-190, 2010.
- BARBERÁN, A.; CASAMAYOR, E. O.. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton meta communities. *Aquatic Microbial Ecology*, v.59, p.1-10, 2010.
- BETTAREL, Y.; BOUVY, M.; DUMONT, C.; SIME-NGANDO, C.. Virus-bacterium interactions in water and sediment of west african inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, p.5274-5282, 2006.

- BOUVY, M.; BARROS-FRANÇA, L. M.; CARMOUZE, J. P.. Compartimento microbiano no meio pelágico de 7 açudes do estado de Pernambuco. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v.10, p.93-101, 1998.
- BRONNER, G.; DEBROAS, D.; ENAULT, F.; HUGONI, M.; JOUAN-DUFOURNEL, I.; MARY, I.; RAVET, V.; ROUX, S.; TAÏB, N. **Study of Prokaryotes and Viruses in Aquatic Ecosystems by Metagenetic and Metagenomic Approaches**. Puy-de-Dôme: Springer International Publishing, 2016.
- BUESING, N.; FILIPPINI, M.; BÜRGMANN, H.; GESSNER, M. O.. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v.69, p.84-97, 2009.
- CASAMAYOR, E. O.; MUYZER, G.; PEDRÓS-ALIÓ, C.. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. **Aquatic Microbial Ecology**, v.25, p.237-246, 2001.
- COSTA, I. A. S.; CUNHA, S. R. S.; PANOSSO, R.; ARAÚJO, M. F. F.; MELO, J. L. S.; SANT'ANNA, E. M. E.. Dinâmica de cianobactérias em reservatórios eutróficos do semi-árido do Rio Grande do Norte. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, p.382-401, 2009.
- DELONG, E. F.. Archaea in coastal marine environments. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.89, p.5685-5689, 1992.
- ESKINAZI-SANT'ANNA, E. M.; MENEZES, R.; COSTA, I. A. S.; PANOSSO, R.; ARAÚJO, M. F. F.; ATTAYDE, J. L.. Composição da comunidade zooplânctônica em reservatórios eutróficos do semiárido do Rio Grande do Norte. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, p.410-421, 2007.
- FILLOL, M.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; GICH, F.; BORREGO, C. M.. Diversity of Miscellaneous Crenarchaeotic Group archaea in freshwater karstic lakes and their segregation between planktonic and sediment habitats. **FEMS microbiology ecology**, v.91, n.4, 2015.
- FREIRE, R. H. F.; CALIJURI, M. C.; SANTAELLA, S. T.. Longitudinal patterns and variations in water quality in a reservoir in the semi-arid region of NE Brazil: responses to hydrological and climatic changes. **Acta Limnológica Brasiliensia**, v.21, p.251-262, 2009.
- GIOVANNONI, S. J.; VERGIN, K. L.. Seasonality in ocean microbial communities. **Science**, v.335, p.671-676, 2012.
- GREEN, S. J.; LEIGH, M. B.; NEUFELD, J. D.. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In: TIMMIS, K. N.. **Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds**. Heidelberg: Springer, 2009. p.4137-4158.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D.. Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v.4, n.1, p.1-9, 2001.
- HOOBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S.. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Environmental Microbiology**, v.33, p.1225-1228, 1977.
- JACOB, B.; DANERI, G.; QUIÑONES, R. A.; SOBARZO, M.. Community metabolism, phytoplankton size structure and heterotrophic prokaryote production in a highly productive upwelling zone off northern Chile. **Marine Ecology Progress Series**, v.430, p.23-34, 2011.
- JARDILLIER, L.; BASSET, M.; DOMAIZON, L.; BELAN, A.; AMBLARD, C.; RICHARDOT, M.; DEBROAS, D.. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. **Aquatic Microbial Ecology**, v.35, p.259-273, 2004.
- JOULIAN, C.; RAMSING, N. B.; INGVORSEN, K.. Congruent phylogenies of most common small-subunit rRNA and dissimilatory sulfite reductase gene sequences retrieved from estuarine sediments. **Applied and environmental microbiology**, v.67, n.7, p.3314-3318, 2001.
- LAQUE, T.; FARJALLA, V. F.; ROSADO, A. S.; ESTEVES, F. A.. Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. **Microbial Ecology**, v.59, p.819-829, 2010.
- LINDSTRÖM, E. S.; AGTERVELD, M. P. K. V.; ZWART, G.. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.8201-8206, 2005.
- LINDSTRÖM, E. S.; BERGSTROM, A. K.. Community composition of bacterioplankton and cell transport in lakes in two different drainage areas. **Aquatic Sciences**, v.67, p.210-219, 2005.
- LINDSTRÖM, E. S.; LESKINEN, E.. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. **Microbial Ecology**, v.44, p.1-9, 2002.
- LOGUE, J. B.; LINDSTRÖM, E. S.. Biogeography of bacterioplankton in inland waters. **Freshwater Reviews**, v.1, p.99-114, 2008.
- LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE CREN, E. D.. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. **Hydrobiologia**, v.11, p.143-170, 1958.
- MUELLER-SPITZ, S. R.; GOETZ, G. W.; MCLELLAN, S. L.. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. **FEMS Microbiology Ecology**, v.67, p.511-522, 2009.
- MUSHEGIAN, A. A.; PETERSON, C. N.; BAKER, C. C. M.; PRINGLE, A.. Bacterial diversity across Individual Lichens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.4249-4252, 2011.
- MUYLAERT, K.; VAN DER GUCHT, K.; VLOEMANS, N.; MEESTER, L. D.; GILLIS, M.; VYVERMAN, W.. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4740-4750, 2002.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-

amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

NASCIMENTO, E. D.; MAIA, C. M. M.; ARAÚJO, M. F. F.. Contamination of semiarid potiguar reservoirs by harmful bacteria. **Revista Ambiente & Água**, v.11, n.2, p.414, 2016.

NASCIMENTO, V. S. F.; ARAÚJO, M. F. F.; NASCIMENTO, E. D. D.; SODRÉ-NETO, L.. Epidemiologia de doenças diarreicas de veiculação hídrica em uma região semiárida brasileira. **ConScientiae Saúde**, v.12, n.3, 2013.

NISHIMURA, Y.; NAGATA, T.. Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). **Aquatic Microbial Ecology**, v.48, p.231-240, 2007.

NIU, Y.; SHEN, H.; CHEN, J.; XIE, P.; YANG, X.; TAO, M.; MA, Z.; QI, M.. Phytoplankton community succession shaping bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. **Water Research**, v.45, p.4169-4182, 2011.

PERNTHALER, J.; AMANN, R.. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.440-461, 2005.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS, N. E.; SIMPSON, A. J.. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.914-921, 1994.

SODRÉ-NETO, L.; ARAÚJO, M. F. F.. Spatial and temporal fluctuations in bacterioplankton and correlated abiotic variables in eutrophic environments of the Brazilian semi-arid region. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.20, n.4, p.325-331, 2008.

STAHL, D. A.; AMANN, R. I.. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M.. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p.205-248.

UTERMÖHL, H.. Zur vervollkommung der quantitativen phytolankton-methodik. **Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v.9, p.1-38, 1958.

VALDERRAMA, J. C.. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. **Marine Chemistry**, v.10, p.109-122, 1981.

WEVER, A. D.; MUYLEAERT, K.; VAN DER GUCHT, K.; PIRLOT, S.; COCQUYT, C.; DESCY, J. P.; PLISNIER, P. D.; VYVERMAN, W.. Bacterial Community Composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5029-5037, 2005.

YANG, Y.; DAI, Y.; WU, Z.; XIE, S.; LIU, Y.. Temporal and spatial dynamics of archaeal communities in two freshwater lakes at different trophic status. **Frontiers in microbiology**, v.7, p.1-14, 2016.

YU, Z.; MORRISON, M.. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.4800-4806, 2004.

ZHANG, J.; YANG, Y.; ZHAO, L.; LI, Y.; XIE, S.; LIU, Y.. Distribution of sediment bacterial and archaeal communities in plateau freshwater lakes. **Applied microbiology and biotechnology**, v.99, n.7, p.3291-3302, 2015.

ZWART, G.; CRUMP, B. C.; AGTERVELD, M. P. K.; HAGEN, F.; HAN, S. K.. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, v.28, p.141-155, 2002.

ZWISLER, W.; SELJE, N.; SIMON, M.. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. **Aquatic Microbial Ecology**, v.31, p.211-225, 2003.