

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**DISTRIBUIÇÃO DA ABUNDÂNCIA,  
ATIVIDADE E DIVERSIDADE  
BACTERIANA AO LONGO DE UMA BAÍA  
TROPICAL POLUÍDA  
(BAÍA DE GUANABARA, RJ, BRASIL)**

**Alessandra Silva Morilla Gonzalez**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UFRJ

DISTRIBUIÇÃO DA ABUNDÂNCIA, ATIVIDADE E DIVERSIDADE  
BACTERIANA AO LONGO DE UMA BAÍA TROPICAL POLUÍDA  
(BAÍA DE GUANABARA, RJ, BRASIL)

Alessandra Silva Morilla Gonzalez

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadores: Leda Mendonça-Hagler  
Rodolfo Paranhos

Rio de Janeiro  
Maio de 2007

DISTRIBUIÇÃO DA ABUNDÂNCIA, ATIVIDADE E DIVERSIDADE BACTERIANA  
AO LONGO DE UMA BAÍA TROPICAL POLUÍDA (BAÍA DE GUANABARA, RJ,  
BRASIL)

Alessandra Silva Morilla Gonzalez

Orientadores: Leda Mendonça-Hagler e Rodolfo Paranhos

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia,  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro –  
UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em  
Microbiologia.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Ulysses Garcia Casado Lins

---

Prof. Orlando Bonifácio Martins

---

Prof. Vinícius Fortes Farjalla

---

Prof. Leda Cristina Mendonça-Hagler

---

Prof. Fernando Portela Camara

Rio de Janeiro

Maior de 2007

Dedico essa Tese à minha família

## **Agradecimentos**

A Deus, por tudo o que Ele tem me proporcionado e por Ter sido tão perfeito na construção da natureza.

Aos meus orientadores Leda Mendonça-Hagler e Rodolfo Paranhos por contribuírem enormemente para a minha formação profissional. Obrigada pelo apoio, incentivo, por fazerem de tudo para que essa tese pudesse ser realizada e por terem confiado em mim.

Ao Dr. Ricardo Pilz Viei Tj3bua i( m)Tj12 0 0 12 433528983 603.79993 TensParaeda as bibliot

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da UFRJ por minha aceitação ao programa de pós-graduação. Agradeço também aos professores desse instituto pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas. Também sou grata à Safira e Luciana, secretárias da pós-graduação e à Dilma, bibliotecária do IMPPG, pela atenção e ajuda dispensadas.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Grupamento de Salvamento Aéreo do Aeroporto Internacional do Rio de Janeiro (INFRAERO-SAR33) pelo transporte de lancha até o ponto de coleta da Praia de Ramos.

À Escola de Educação Física do Exército (ECFE) por permitirem as coletas na enseada da Urca.

À ASTROMARÍTIMA e aos oficiais e tripulantes do Navio Astro-Garoupa pela ajuda nas coletas ao longo dos transects.

Ao Laboratório Johanna Döbereiner do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ pelos materiais usados durante os procedimentos de biologia molecular.

Ao Laboratório de Genoma do Dept. Bioquímica da UERJ, sob responsabilidade do Dr. Rodolpho Albano, pelo sequenciamento gênico.

Ao Laboratório de Limnologia da UFRJ, sob responsabilidade do Dr. Francisco Esteves, pelo uso do cintilador líquido.

Ao Dr. Jean Louis Valentin do Dept. de Biologia Marinha da UFRJ por sua ajuda com a análise de correspondência.

Ao Dr. Orlando Bonifácio Martins pela oportunidade de poder freqüentar seu laboratório e aprender sobre biologia molecular.

À Dr. Luciana Andrade por suas valiosas sugestões para o documento escrito, pela revisão do abstract e por toda a ajuda e atenção que tem me dado durante todos esses anos de trabalho em conjunto.

Ao Rogério Paranhos por sua ajuda, bate-papo e por manter os computadores e as impressoras sempre em perfeita ordem.

Ao Dr. Newton Gomes, pelos “primers” para o gene *amoA*.

À Dr. Maysa Clementino por seu auxílio durante a realização desse estudo, pelas suas sugestões e pelas conversas sempre muito bem humoradas.

Mais que um agradecimento, quero deixar aqui registrado todo o meu respeito, carinho e admiração pelas minhas grandes amigas e irmãs escolhidas Bruna Tovar Faro e Karla Danila Colóia de Carvalho, e pelos meus grandes e queridos amigos Raul Almeida Cunha, Fernando Neves Pinto e Marcel Gonçalves. Obrigada pela amizade de vocês, pelo apoio

irrestrito, pelas conversas, palavras de carinho, conforto e incentivo, pelos desabafos, pela dedicação, pela alegria, pelos risos, pela solidariedade e companheirismo. Obrigada por vocês estarem sempre presentes em minha vida, nos bons e maus momentos. Obrigada por vocês sempre caminharem ao meu lado, me estimulando, valorizando os meus acertos e corrigindo as minhas falhas.

Ao Pluft, pelo silêncio, carinho e companhia constante. Ao Bethoween, por sua companhia, por seu amor incondicional, por sua alegria e por toda a confusão que cria. Eu amo muito vocês.

Aos meus pais José Antonio e Nanci, à minha avó Paquita e às minhas irmãs Rafaela e Juliana pelo amor incondicional, pela imensa generosidade, pela paciência, dedicação e apoio durante toda a minha vida. Agradeço muito a vocês, pois sei que a cada vitória que essa carreira puder me proporcionar, vocês estarão por trás dela como sempre estiveram em cada momento de minha vida. Eu amo vocês.

Quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que essa tese pudesse ser realizada. Vocês me ajudaram a conquistar uma importantíssima etapa de minha vida. Muito obrigada.

Gonzalez, Alessandra Silva Morilla

Distribuição da abundância, atividade e diversidade bacteriana ao longo de uma baía tropical poluída (Baía de Guanabara, RJ, Brasil)/Alessandra Silva Morilla Gonzalez. – Rio de Janeiro: UFRJ/IMPPG, 2007.

xviii, 110f.: il.; 29,5 cm.

Orientadores: Leda Mendonça-Hagler e Rodolfo Paranhos

Tese (doutorado) – UFRJ/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/Programa de Pós-graduação em Microbiologia, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 111-127.

1. Oceanografia biológica. 2. Bactérias. 3. Citometria em fluxo. 4. Incorporação de <sup>3</sup>H-leucina. 5. Genes marcadores. 6. Ciclo do nitrogênio. I. Mendonça-Hagler, L.; Paranhos, R. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Programa de Pós-graduação em Microbiologia. III. Título.

## **Resumo**

**DISTRIBUIÇÃO DA ABUNDÂNCIA, ATIVIDADE E DIVERSIDADE BACTERIANA AO LONGO DE UMA BAÍA TROPICAL POLUÍDA (BAÍA DE GUANABARA, RJ, BRASIL)**

Alessandra Silva Morilla Gonzalez

Orientadores: Leda Mendonça-Hagler & Rodolfo Paranhos

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Há concordância geral de que os organismos procarióticos exercem um importante papel na ciclagem biogeoquímica e na cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos. A baía de Guanabara é um ecossistema estuarino que vêm sendo submetido a um acelerado processo de a bunância

Bactérias Firmicutes e *Cytophaga* foram predominantemente encontradas nas áreas mais internas da baía. A maior riqueza bacteriana foi observada nas regiões de maior influência oceânica onde *Synechococcus* e delta-Proteobacterias foram encontradas. Os dados de nutrientes indicaram uma maior concentração de amônia nas águas mais internas da baía. O oposto foi observado nas regiões oceânicas oligotróficas, onde o nitrato foi a forma predominante de nitrogênio. Tais resultados evidenciaram a ocorrência do processo de nitrificação ao longo desse corpo d'água enquanto que a presença de bactérias oxidantes de amônia foi confirmada pela amplificação do gene *amoA* na enseada da Urca. Dessa forma, o presente estudo contribui para um maior entendimento a respeito da baía de Guanabara fornecendo informações relevantes sobre os parâmetros microbiológicos, genes marcadores, ciclagem biogeoquímica e fatores ambientais desse ecossistema.

Palavras-chave: Baía de Guanabara, bactérias, citometria em fluxo, incorporação de <sup>3</sup>H-leucina, genes marcadores, ciclo do nitrogênio

Rio de Janeiro

Maio de 2007

## **Abstract**

**BACTERIOPLANKTON ABUNDANCE, ACTIVITY AND DIVERSITY IN A TROPICAL POLLUTED BAY (GUANABARA BAY, RJ, BRAZIL)**

Alessandra Silva Morilla Gonzalez

Orientadores: Leda Mendonça-Hagler & Rodolfo Paranhos

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Program

microbiological parameters, genes markers, biogeochemical cycling and environmental factors.

Key-words: Guanabara Bay, bacteria, flow cytometry, <sup>3</sup>H-leucine incorporation, marker genes, nitrogen cycle

Rio de Janeiro

Maio de 2007

## Sumário

	Página
Capa	I
Folha de rosto	II
Folha de aprovação	III
Dedicatória	IV
Agradecimentos	V
Ficha catalográfica	VIII
Resumo	IX
Abstract	XI
Sumário	XIII
Lista de figuras	XVI
Lista de tabelas	XVIII
Lista de abreviaturas	XIX
1 – Introdução	1
1.1 – Estudo das comunidades bacterianas	8
1.1.1 – Abundância bacteriana	8
1.1.2 – Atividade bacteriana	10
1.1.3 – Diversidade bacteriana	12
2 – Área de estudo	16
3 - Hipótese	22
4 – Objetivos	22
5 - Metodologia	23
5.1 – Campanhas e estratégias amostrais	23
5.1.1 – Coletas ao longo dos “transects”	23
5.1.2 – Coletas mensais	25
5.2 – Análises em laboratório	26
5.2.1 – Parâmetros físicos e químicos	26
5.2.2 – Abundância bacteriana	27
5.2.3 – Atividade bacteriana	28
5.2.4 – Diversidade bacteriana	29
5.2.4.1 – Extração do DNA ambiental	30
5.2.4.2 – Purificação do DNA ambiental	31
5.2.4.3 – Amplificação do DNA bacteriano através de PCR	31
5.2.4.4 – Purificação dos produtos de PCR	32
5.2.4.5 – Obtenção de células competentes	32
5.2.4.6 – Ligação do inserto ao vetor de clonagem	33
5.2.4.7 – Transformação e clonagem dos produtos de PCR	34
5.2.4.8 – Seleção dos clones e construção das bibliotecas	34
5.2.4.9 – Obtenção de DNA plasmidial	35
5.2.4.10 – Sequenciamento gênico	36
5.2.4.11 – Diversidade e análise filogenética	37
5.3 – Análise estatística	37
6 - Resultados	40
6.1 – Coletas ao longo dos “transects”	40
6.1.1 – Parâmetros físicos e químicos	40
6.1.1.1 – Temperatura da água	40
6.1.1.2 – Salinidade	40



6.2.3 – Análise estatística	78
6.2.3.1 – Relação entre bactérias e fatores bióticos e abióticos - Correlação de Spearman	78
6.2.3.2 – Análise de Componentes Principais (ACP)	80
7 - Discussão	83
7.1 – Caracterização ambiental e microbiológica	83
7.2 – Diversidade bacteriana	96
7.1 – Presença de gene relacionado ao processo de nitrificação	107
8 - Conclusões	110
Referências Bibliográficas	111
Publicações relacionadas à Tese	128

## Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Representação esquemática dos componentes da alça microbiana	6
Figura 2	Ciclo biogeoquímico do nitrogênio	7
Figura 3	Mapa da baía de Guanabara, sua bacia de drenagem, área metropolitana do Rio de Janeiro e estações estudadas durante as coletas mensais	21
Figura 4	Mapa da baía de Guanabara com as estações de coleta localizadas ao longo dos “transects”	39
Figura 5	Resultados de temperatura da água, salinidade e oxigênio dissolvido obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	41
Figura 6	Resultados de clorofila <i>a</i> obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	43
Figura 7	Resultados de MPS obtidos ao longo do “transect” de 2003	43
Figura 8	Resultados de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	45
Figura 9	Resultados de ortofosfato, fósforo total e silicato obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	47
Figura 10	Resultados de abundância de bactérias totais, HNA e LNA obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	51
Figura 11	Percentuais de bactérias HNA e LNA, e resultados de atividade bacteriana obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 e 2003	52
Figura 12	Gel de agarose com o DNA extraído das amostras coletadas ao longo do “transect” realizado na BG no ano de 2003	53
Figura 13	Gel de agarose com os produtos de PCR obtidos a partir dos DNAs extraídos das amostras coletadas na BG durante o “transect” realizado no ano de 2003	54
Figura 14	Curvas de rarefação comparando as bibliotecas 16S rRNA obtidas no canal da Maré e nas estações BI e 5K	55
Figura 15	Relações filogenéticas obtidas entre as seqüências 16S de eubactérias presentes no canal da Maré e nas estações BI e 5K	56
Figura 16	Análise de Correspondência (AC) realizada entre os dados de diversidade de eubactérias e as variáveis ambientais analisadas na BG durante o transect de 2003	59
Figura 17	Resultados de temperatura da água, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, clorofila <i>a</i> e MPS obtidos durante as coletas mensais	65
Figura 18	Resultados de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato e nitrogênio total obtidos durante as coletas mensais	67
Figura 19	Resultados de ortofosfato, fósforo total e silicato obtidos durante as coletas mensais	69
Figura 20	Resultados de abundância de bactérias totais, HNA, LNA e atividade bacteriana obtidos durante as coletas mensais	73
Figura 21	Percentuais de bactérias HNA e LNA obtidos durante as	

Figura 22	Gel de agarose com o DNA extraído da amostra coletada na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004	75
Figura 23	Gel de agarose com os produtos de PCR obtidos a partir do DNA extraído da amostra coletada na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004	75
Figura 24	Relações filogenéticas obtidas entre as seqüências do gene <i>amoA</i> das bactérias oxidantes de amônia presentes na enseada da Urca	77
Figura 25	Análise de Componentes Principais (ACP) realizada com os dados dos parâmetros físicos, químicos e biológicos analisados na BG durante as coletas mensais	81

## Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Número de seqüências e percentuais de ocorrência dos diferentes grupos bacterianos encontrados no canal da Maré e nas estações BI e 5K durante a campanha realizada ao longo do “transect” no ano de 2003	57
Tabela 2	Matriz de correlação de Spearman obtida com os dados físicos, químicos e biológicos adquiridos durante os “transects” de 2002 e 2003	60
Tabela 3	Média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação, número de dados, e valores mínimos e máximos dos parâmetros físicos e químicos obtidos durante as coletas mensais	70
Tabela 4	Média, desvio padrão, número de dados, e valores mínimos e máximos de abundância de bactérias totais, HNA e LNA, e atividade bacteriana obtidos durante as coletas mensais	76
Tabela 5	Matriz de correlação de Spearman obtida com os dados físicos, químicos e biológicos adquiridos durante as coletas mensais	79
Tabela 6	Coordenadas das variáveis nos eixos fatoriais da análise de componentes principais	82

## Lista de Abreviaturas

MOD – Matéria Orgânica Dissolvida

MOP – Matéria Orgânica Particulada

BG – Baía de Guanabara

NOP – Nitrogênio Orgânico Particulado

NOD – Nitrogênio Orgânico Dissolvido

HNA – “high nucleic acid content cells” (células com alto conteúdo aparente de ácidos nucleicos)

LNA – “low nucleic acid content cells” (células com baixo conteúdo aparente de ácidos nucleicos)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

FISH – Hibridização “in situ” com sondas fluorescentes

ATP – Adenosina trifosfato

LPS – Lipopolissacarídeos

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

<sup>3</sup>H-ade - <sup>3</sup>H-adenina

<sup>3</sup>H-TdR - <sup>3</sup>H-timidina

<sup>3</sup>H-leu - <sup>3</sup>H-leucina

PCR – Reação em cadeia de polimerase

DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

SSU rRNA – “small subunit rRNA” (RNA ribossomal da sub-unidade pequena dos ribossomos)

NCBI – National Center for Bioinformatics and Information

DDBJ – DNA Data Bank of Japan

RDP II – Ribosomal Database Project II

AMO – Amônia monooxigenase

HAO – Hidroxilamina oxidoreductase

APA – Área de Proteção Ambiental

OD – Oxigênio Dissolvido

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

MPS – Material Particulado em Suspensão  
PBS – Tampão fosfato salina  
TCA – Ácido tricloroacético  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
TAE – Tris acetato EDTA  
TE – Tris cloreto EDTA  
DO – Densidade Ótica  
IPTG – Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo  
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo  
GET – Glicose anidra, EDTA e Tris  
OTUs – Unidades Taxonômicas Operacionais

## 1 – Introdução

O reconhecimento das bactérias como sendo de extrema importância para o desenvolvimento e equilíbrio dos ecossistemas aquáticos tem modificado significativamente a visão da ecologia do plâncton (Pomeroy, 1974). Esses microorganismos exercem um papel fundamental nos principais ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, fósforo, entre outros) sendo de grande importância para a manutenção da qualidade ambiental (Troussellier *et al.*, 2002). Tal importância vem despertando um crescente interesse para a aquisição de informações sobre a abundância, atividade, distribuição, composição e dinâmica das comunidades bacterianas, informações essas que vêm contribuindo para ampliar o conhecimento existente a respeito dos distintos corpos d'água (Cole *et al.*, 1988; Turley & Makie, 1994; Clarke & Leakey, 1996; Robarts *et al.*, 1996; Zubkov *et al.*, 1998; Gasol & del Giorgio, 2000; Troussellier *et al.*, 2002; Servais *et al.*, 2003; Corzo *et al.*, 2005).

As bactérias são caracterizadas por apresentar uma grande diversidade metabólica, condição que as tornam aptas a ocupar diversos nichos ecológicos (Xu, 2006). Critérios baseados nas fontes de energia e de carbono são utilizados para classificar tais microrganismos. As bactérias são denominadas fototróficas ou quimiotróficas, quando utilizam respectivamente, a luz ou compostos químicos como fonte de energia. Por sua vez, os microrganismos são classificados como autotróficos ou heterotróficos quando adquirem carbono a partir de compostos inorgânicos ou orgânicos, respectivamente.

As bactérias heterotróficas são organismos de dimensões picométricas (0,2 a 2,0  $\mu\text{m}$ ) que atuam de forma fundamental na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Pomeroy, 1974; Azam *et al.*, 1983). Esses microorganismos constituem uma parcela substancial da biomassa e da abundância planctônica total desses ambientes, sendo de extrema importância para o equilíbrio ecológico. Os trabalhos pioneiros realizados por Pomeroy (1974) e Azam *et al.* (1983) demonstraram que as bactérias heterotróficas exercem um importante papel na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. Esses microorganismos apresentam a capacidade de transformar compostos orgânicos particulados disponíveis no ambiente em matéria orgânica dissolvida (MOD) (Carlson & Ducklow, 1996). A MOD representa a principal reserva de carbono orgânico desses sistemas e é consumida como fonte de energia enquanto as bactérias absorvem nutrientes do ambiente (Cole *et al.*, 1988). Dessa forma, as bactérias heterotróficas são consideradas importantes produtores secundários uma vez que apresentam a capacidade de utilizar entre 5 e 50% do carbono fixado liberado como MOD (Larsson & Hagstrom, 1982). Cabe ressaltar, que em alguns ambientes a produção

bacteriana é tão elevada que pode alcançar aproximadamente 30% da produção primária total (Cole *et al.*, 1988).

Os compostos orgânicos citados acima encontram-se principalmente na forma de carboidratos, aminoácidos, lipídeos e peptídeos, podendo apresentar origem alóctone (produtos de origem terrestre, poluição doméstica e industrial) e/ou autóctone (excretas metabólitos de animais, organismos senescentes ou mortos, substâncias produzidas e liberadas pelas algas, produtos resultantes da lise viral e da pastagem zooplanctônica) (Azam & Cho, 1987; Wikner *et al.*, 1999). Apesar de serem capazes de consumir compostos orgânicos de várias origens, existem evidências na literatura de que as bactérias heterotróficas utilizam principalmente como fonte de energia os produtos eliminados durante as etapas iniciais do processo fotossintético fitoplanctônico (Hoch & Kirchman, 1993). Por utilizarem cerca de 40% da produção fitoplanctônica, esses microorganismos são considerados os principais consumidores primários dos ecossistemas aquáticos (Cole *et al.*, 1988).

Ao ser incorporada no protoplasma celular das bactérias, a MOD é convertida em matéria orgânica particulada (MOP), passando a fazer parte da biomassa bacteriana. A transferência de energia e MOP para os níveis tróficos superiores da cadeia alimentar ocorre através do consumo das bactérias por ciliados e flagelados heterotróficos (Sherr & Sherr, 1988; Sanders *et al.*, 1992). Esses protistas servem de alimento para o microzooplâncton, que por sua vez é consumido por organismos de níveis tróficos mais altos (Azam *et al.*, 1983; Sherr & Sherr, 1988). Dessa forma, uma grande parte da energia disponível no ambiente flui através de um caminho paralelo até alcançar a cadeia alimentar clássica. Esse caminho é formado por microorganismos autotróficos e heterotróficos e é denominado alça microbiana ou “microbial loop” (Figura 1) (Azam *et al.*, 1983). Além disso, uma grande quantidade de matéria orgânica que devido as suas pequenas dimensões não estaria disponível para os organismos de níveis tróficos superiores, passa a se integrar via produção de biomassa bacteriana, na cadeia alimentar dos sistemas aquáticos (Azam *et al.*, 1983). Portanto, é possível perceber que as bactérias heterotróficas constituem um importante elo entre a MOD e os organismos de níveis tróficos superiores (Roland & Cole, 1999).

Dados disponíveis na literatura vêm demonstrando que as comunidades bacterianas presentes nos diversos ambientes aquáticos encontram-se submetidas à influência constante de inúmeros fatores bióticos e/ou abióticos do meio. Esses fatores influenciam a abundância, a distribuição, a composição e o tamanho dos microorganismos presentes nesses corpos d’água (Billen *et al.*, 1990). Mecanismos de controle bacteriano por deficiência de substratos orgânicos e/ou inorgânicos (Hoch & Kirchman, 1993; Pomeroy *et al.*, 1995; Murrell, 2003)

ou por condições adversas do meio, como por exemplo, a temperatura (Shiah *et al.*, 2000), a salinidade (Solic & Krstulovic, 1992) e a incidência luminosa (Aas *et al.*, 1996; Chróst & Faust, 1999) são denominados fatores “bottom-up” (descendentes) de regulação (Billen *et al.*, 1990). Por sua vez, a predação pelos protistas (Simek *et al.*, 1990; Pernthaler, 2005) assim como a lise celular pela ação viral (Fuhrman & Noble, 1995; Guixa-Boixareu *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 2004) são classificados mecanismos “top-down” (ascendentes) de controle bacteriano (Billen *et al.*, 1990).

Vários estudos têm demonstrado a extrema importância do controle viral sobre as populações bacterianas presentes nos diversos meios aquáticos. De acordo com Fuhrman (1999), a mortalidade causada pela lise viral gera pequenos fluxos entre a MOD e as comunidades bacterianas, dificultando a transferência de matéria e energia da alça microbiana para os níveis mais altos da cadeia alimentar. Os vírus bacteriófagos induzem a mortalidade bacteriana, criando um pequeno ciclo de carbono no qual a MOD assimilada pelas bactérias é liberada após a lise celular e metabolizada por outras bactérias, condição que conseqüentemente aumenta as taxas de respiração do ambiente (Azam & Worden, 2004). Trabalhos realizados por Weinbauer & Peduzzi (1995) indicaram que em certas ocasiões, tais como em altas abundâncias populacionais, a mortalidade bacteriana pode ser preferencialmente induzida pela ação viral. Por exemplo, os vírus são responsáveis pela perda de 10 a 50% das bactérias totais presentes nas águas superficiais. Por sua vez, em ambientes inadequados a sobrevivência da maioria dos protistas, tais como regiões com baixas concentrações de oxigênio, os vírus respondem por aproximadamente 50 a 100% da mortalidade bacteriana (Fuhrman, 1999). A descoberta de que os vírus são capazes de provocar importantes impactos sobre os ciclos biogeoquímicos fez com que eles fossem incluídos nos estudos sobre a alça microbiana.

Além de participarem da cadeia alimentar, as bactérias heterotróficas também desempenham um importante papel na decomposição de substâncias orgânicas (Azam *et al.*, 1983). Estes microrganismos remineralizam e disponibilizam nutrientes inorgânicos para o ambiente (Azam & Cho, 1987), que são rapidamente captados pela comunidade microbiana e utilizados para a realização de suas atividades metabólicas (Fogg, 1995). É possível perceber, portanto, que a degradação da matéria orgânica via ação bacteriana acaba influenciando fortemente a produtividade primária dos ecossistemas aquáticos.

A decomposição aeróbica e anaeróbica da matéria orgânica pelas bactérias heterotróficas resulta na quebra hidrolítica das proteínas em aminoácidos. Durante o processo de amonificação, os grupamentos amina são removidos e convertidos em compostos

nitrogenados reduzidos, tais como o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e a amônia ( $\text{NH}_3$ ). A oxidação biológica destes compostos a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é principalmente realizada por dois grupos filogeneticamente distintos de bactérias quimiolitotróficas (Cébron *et al.*, 2003) e denomina-se nitrificação (Bothe *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que esse processo também é realizado por Archaea Crenarchaeota (Könneke *et al.*, 2005), por bactérias heterotróficas, tais como, *Pseudomonas putida* (Daum *et al.*, 1998) e *Alcaligenes faecalis* (Otte *et al.*, 1999) e por fungos do gênero *Aspergillus* (Moreira & Siqueira, 2002; Hwang *et al.*, 2004). Na nitrificação quimiolitotrófica, o processo é realizado por membros dos dois grupos atuando em sequência, porque nenhum deles é capaz de realizar sozinho a completa oxidação da amônia. Diferentemente das bactérias autotróficas, os microorganismos nitrificantes heterotróficos apresentam a capacidade de realizar todas as etapas da nitrificação. Apesar dessa capacidade, a contribuição desses microorganismos para o processo global é muito pequena, sendo portanto, de pouca significância ecológica (Moreira & Siqueira, 2002).

As bactérias nitrificantes quimiolitotróficas estão presentes no solo (Prosser & Embley, 2002) e nos ecossistemas aquáticos marinhos, estuarinos e dulcícolas (Voytek & Ward, 1995; Hastings *et al.*, 1998; O'Mullan & Ward, 2005), tendo sido também encontradas em diversos ambientes extremos, tais como, o gelo da Antártica (Arrigo *et al.*, 1995), as fontes hidrotermais (Golovatcheva, 1976) e lagos alcalinos (Sorokin & Kuenen, 2005). As bactérias nitrificantes são caracterizadas pela capacidade de utilizar a energia contida em compostos inorgânicos dissolvidos para a realização de suas atividades metabólicas. A transformação de íon amônio/amônia a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e a conversão do nitrito a nitrato são realizadas, respectivamente, pelas bactérias oxidantes de amônia (Kowalchuk & Stephen, 2001) e de nitrito (Grommen *et al.*, 2005) e representam processos extremamente importantes para o ciclo global do nitrogênio (Figura 2) (Rotthauwe *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). As bactérias oxidantes de amônia se enquadram no grupo das Beta e das Gama-Proteobacteria, incluindo os gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosococcus* (Head *et al.*, 1993; Cébron *et al.*, 2003). Por sua vez, as bactérias oxidantes de nitrito fazem parte dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* e *Nitrospina* (Hovanec *et al.*, 1998; Cébron *et al.*, 2003) pertencentes as Alfa, Gama e Delta-Proteobacteria.

Há concordância geral na literatura que o nitrogênio representa um dos elementos mais importantes no metabolismo dos ecossistemas aquáticos (Esteves, 1998; Ye & Thomas, 2001; Moreira & Siqueira, 2002), sendo utilizado por todos os organismos para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e açúcares aminados. Quando presente em baixas concentrações, este elemento inorgânico acaba atuando como um fator limitante da produtividade primária,

ação que conseqüentemente afeta toda a cadeia trófica. De acordo com O'Mullan & Ward (2005), a nitrificação é muito importante nos ambientes aquáticos porque relaciona a mineralização da matéria orgânica à denitrificação, um processo que provoca a perda de nitrogênio do sistema pela produção de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) a partir do nitrato. Além disso, os microorganismos nitrificantes ainda competem com os produtores primários pela utilização da amônia. Essa competição exerce um papel crucial na remoção deste elemento do sistema evitando por consequência a eutrofização dos corpos d'água (Prosser & Embley, 2002).

Portanto, é possível perceber que a nitrificação é um processo especialmente importante nos ambientes aquáticos submetidos a grandes descargas de nitrogênio pela ação antrópica, como é o caso da baía de Guanabara (BG). Problemas nesse processo acabam dificultando a ciclagem global do nitrogênio e favorecendo a degradação dos corpos d'água. Cabe ainda ressaltar, que embora a nitrificação represente um processo central na ciclagem do nitrogênio poucos são os estudos disponíveis na literatura a respeito das bactérias nitrificantes e sua relevância ecológica. Dentre esses estudos, pode-se destacar o trabalho de O'Mullan & Ward (2005) que avaliou a variabilidade temporal e espacial das bactérias oxidantes de amônia em Monterey Bay, na Califórnia. Por sua vez, Cébron *et al.* (2003) determinaram a influência da descarga dos efluentes de uma planta de tratamento de esgotos nas taxas de nitrificação e na composição da comunidade de bactérias nitrificantes presentes ao longo do rio e do estuário do rio Sena, na França. As diferenças existentes entre as comunidades de bactérias oxidantes de amônia do grupo das Beta-Proteobacteria encontradas na água e nos sedimentos do lago Duich, na Escócia, foram estudadas por Freitag & Prosser (2004). Cébron & Garnier (2005) investigaram a distribuição e as proporções das bactérias oxidantes de nitrito dos gêneros *Nitrobacter* e *Nitrospira* ao longo do rio Sena, um ambiente fortemente impactado por esgotos domésticos. A influência do oxigênio e da salinidade na composição da comunidade de bactérias oxidantes de amônia do estuário Schelde, que drena a área norte da França, a Bélgica e a Holanda, foi verificada por Bollmann & Laanbroek (2002). Por sua vez, as taxas de nitrificação ao longo do rio Rhone, França, foram determinadas por Feliatra & Bianchi (1993). É interessante ressaltar que a grande maioria dos dados existentes na literatura é proveniente de ambientes temperados, destacando-se dessa forma a extrema necessidade da realização de estudos sobre nitrificação em sistemas tropicais.

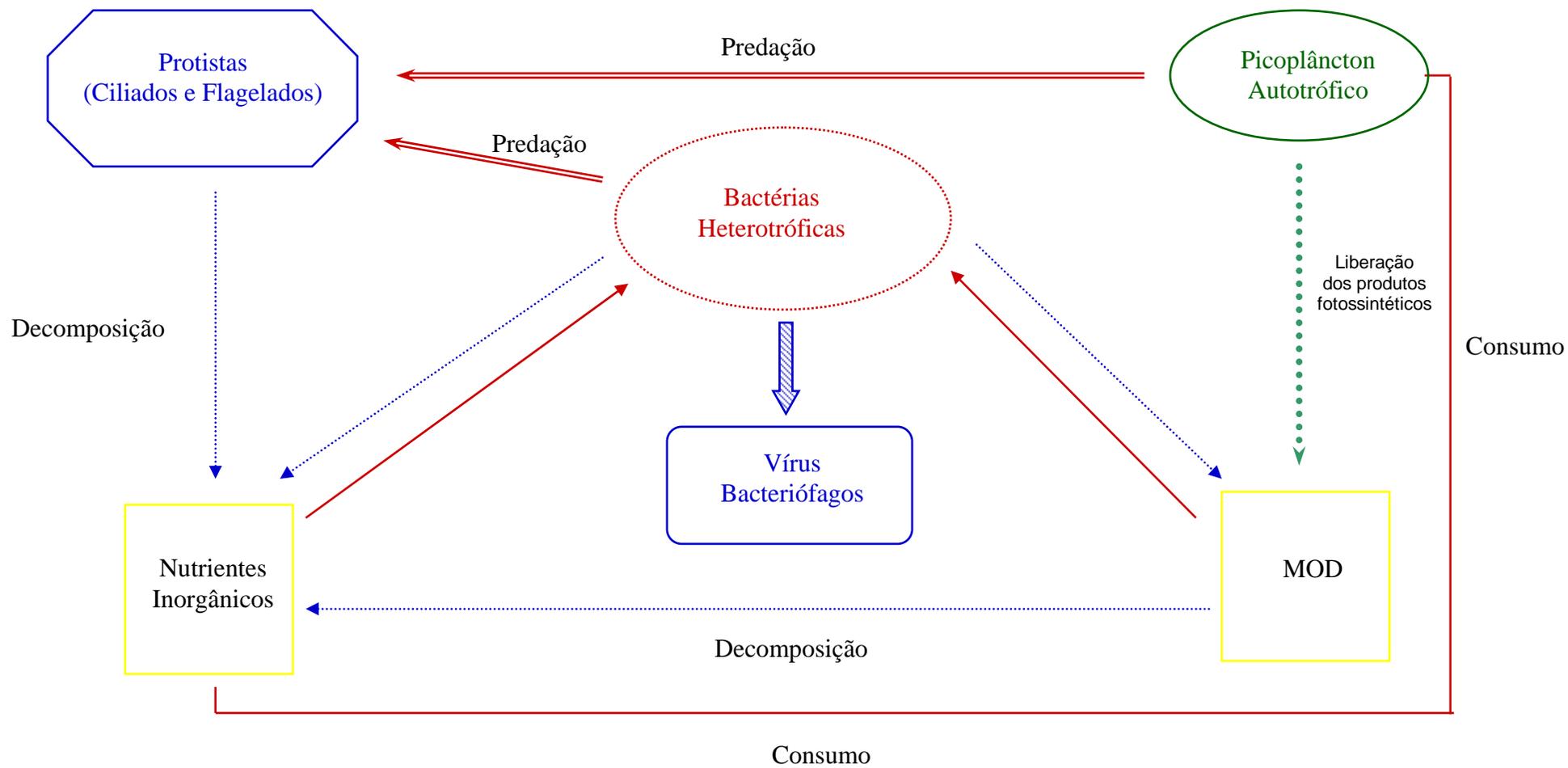


Figura 1: Representação esquemática dos componentes da alça microbiana.

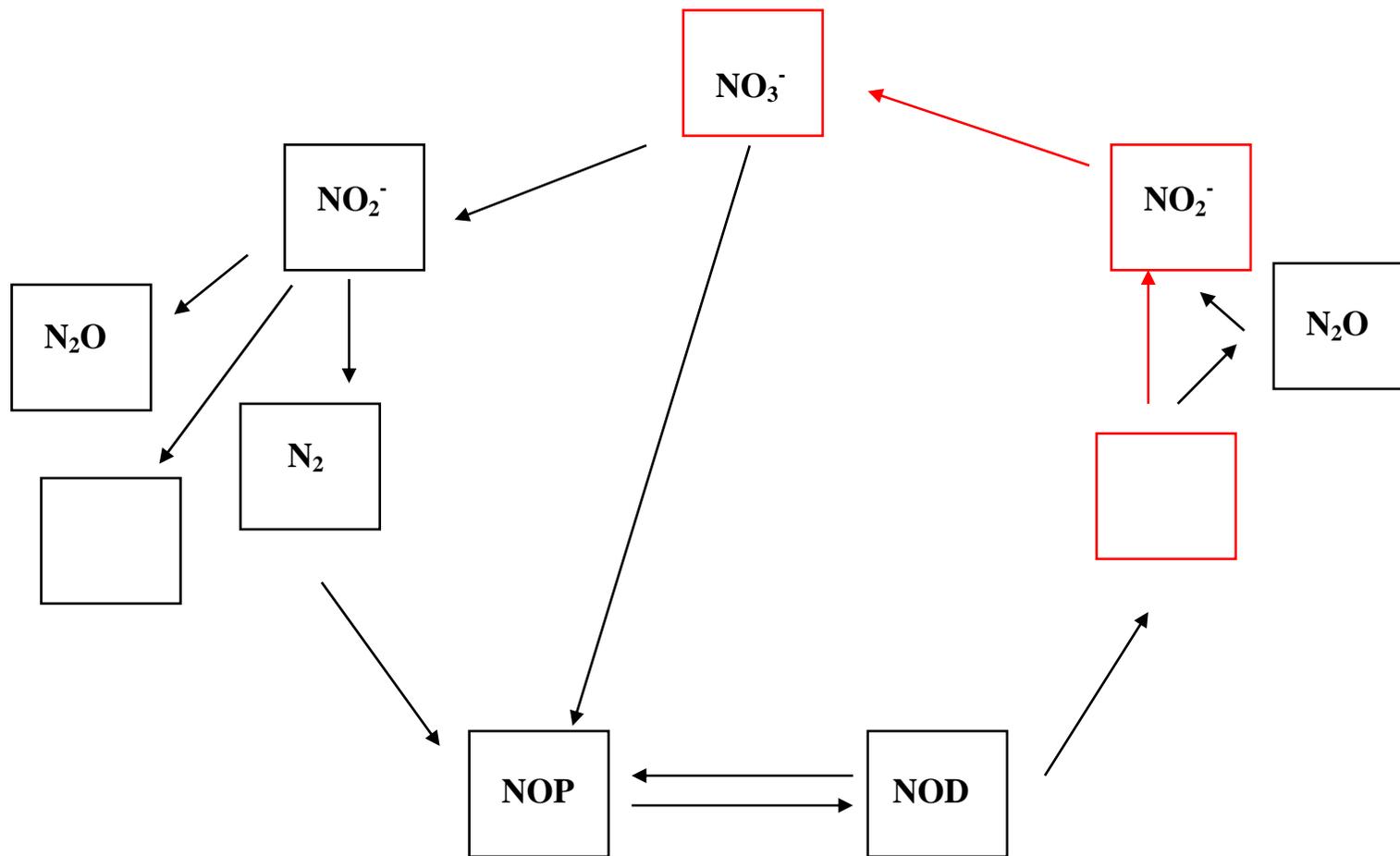


Figura 2: Ciclo biogeoquímico do nitrogênio. 1 – Decomposição; 2 – Amonificação; 3 – Nitrificação; 4 – Denitrificação; 5 – Fixação; 6 – Assimilação de nitrogênio reduzido; 7 – Assimilação de NOD. Adaptação de Libes (1992).

## 1.1 – Estudo das comunidades bacterianas

### 1.1.1 – Abundância bacteriana

A determinação da abundância bacteriana é essencial para a compreensão da estrutura e dinâmica dos ecossistemas aquáticos. Um grande número de trabalhos sobre esse parâmetro microbiológico foi realizado com base nas técnicas de isolamento e cultivo de microorganismos (Zobell, 1946). As técnicas de cultivo são consideradas métodos indiretos de análise que permitem a determinação da abundância e/ou presença de bactérias capazes de se multiplicarem, sob condições de laboratório, em meios de cultura artificiais. Por serem ricos em nutrientes, e portanto, inicialmente desenvolvidos para a realização de análises clínicas, os meios de cultura muitas vezes acabam limitando o desenvolvimento das bactérias ambientais. A presença de células viáveis porém não cultiváveis e o pouco conhecimento existente a respeito das condições de crescimento adequadas para a maioria dos microorganismos, faz com que as bactérias cultiváveis representem apenas uma pequena parcela (cerca de 1%) do número de bactérias totais presentes nos sistemas aquáticos (Joux & Lebaron, 1995; Porter *et al.*, 1996). Avanços na microscopia de epifluorescência, na citometria em fluxo e na tecnologia de corantes fluorescentes também vêm contribuindo para que os conhecimentos nessa área sejam ampliados (Lebaron *et al.*, 1994).

A citometria em fluxo, pioneiramente desenvolvida para a área de imunologia (Shapiro, 2003), representa um método direto de análise que vem sendo bastante utilizado para a realização de estudos sobre os aspectos ecológicos das comunidades picoplantônicas (Sieracki *et al.*, 1995; Jacquet *et al.*, 1998; Zubkov *et al.*, 1998; Troussellier *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2004; Corzo *et al.*, 2005). Essa técnica considera a fluorescência, o tamanho e a forma de células marcadas através de vários fluorocromos disponíveis comercialmente, como princípio básico para a aquisição de dados de abundância bacteriana. É uma metodologia que vêm demonstrando ser bastante adequada para avaliar a distribuição espaço-temporal (Zubkov *et al.*, 1998; Gin *et al.*, 1999; Paranhos *et al.*, 2001; Troussellier *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2006), a sobrevivência (Lebaron & Joux, 1994; Monfort & Baleux, 1994; Barcina *et al.*, 1997) e a viabilidade (Porter *et al.*, 1995; Joux & Lebaron, 1997) das populações picoplantônicas, visto que possibilita a determinação dos parâmetros bioecológicos de um modo rápido e preciso (Lebaron *et al.*, 1998). Estudos têm demonstrado que a citometria em fluxo também apresenta um grande potencial para identificação de táxons bacterianos presentes em comunidades mistas (Amann *et al.*, 1990). Nesse caso, a citometria

em fluxo é utilizada em associação com a marcação filogenética de células com oligonucleotídeos específicos de rRNA através de FISH (hibridização “in situ” com sondas fluorescentes) (Wallner *et al.*, 1993; Sekar *et al.*, 2004).

Além das vantagens citadas acima, essa técnica ainda permite que as características óticas e de fluorescência de cada célula sejam usadas em conjunto para determinar a presença de diferentes sub-grupos bacterianos. De acordo com Trousselier *et al.* (1999), essa distinção populacional pode ser facilmente evidenciada devido a grande capacidade dos fluorocrom

diferentes sub-grupos bacterianos presentes nos ecossistemas aquáticos a fim de se obter uma maior compreensão sobre a dinâmica, diversidade, filogenia, controle e significância ecológica desses microorganismos. Na BG, as contagens de bactérias totais, HNA e LNA já foram realizadas por Paranhos *et al.* (2001), Paranhos (2002) e Andrade *et al.* (2003).

### 1.1.2 – Atividade bacteriana

O reconhecimento da biomassa bacteriana como um importante parâmetro para o estudo da ecologia microbiana, fez com que vários métodos fossem descritos nas últimas décadas para que se pudesse avaliar a atividade desses microorganismos (Azam *et al.*, 1983; Bratbak, 1985). Diversas metodologias químicas têm sido usadas para estimar a atividade bacteriana dos ecossistemas aquáticos, entre elas, as técnicas de quantificação dos teores de adenosina trifosfato (ATP) (Sorokin & Lyutsarev, 1978) e de lipopolissacarídeos (LPS) (Watson *et al.*, 1977) presentes nas células desses organismos. Técnicas de microscopia, tais como a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) (Bowden, 1977), e a microscopia de epifluorescência (Francisco *et al.*, 1973; Porter & Feig, 1980; Paul, 1982) também têm sido muito utilizadas para determinação da atividade bacteriana.

Atualmente, as técnicas de maior sucesso têm sido aquelas baseadas na incorporação de traçadores radioativos em componentes celulares bacterianos (Cole *et al.*, 1988; Kirchman & Mitchell, 1982; Paerl & Merkel, 1982; Jorgensen, 1992; Servais, 1992). Dentre essas metodologias, pode-se destacar as técnicas de incorporação de  $^3\text{H}$ -adenina ( $^3\text{H}$ -ade) (Karl, 1979) e  $^3\text{H}$ -timidina ( $^3\text{H}$ -TdR) (Fuhrman & Azam, 1982), que se baseiam na proporcionalidade entre as sínteses de RNA e DNA, respectivamente, e as taxas de divisão celular. Dessa forma, a atividade avaliada através desses métodos é expressa em termos do aumento do número de bactérias no ambiente. Ambos os procedimentos analíticos vêm sendo constantemente utilizados em vários trabalhos ecológicos (Iriberry *et al.*, 1990; Crump & Baross, 1996; Chróst & Faust, 1999; Shiah *et al.*, 2000; Dixon & Turley, 2001; Troussellier *et al.*, 2002; Wieltschnig *et al.*, 2003; Van Mooy *et al.*, 2004).

Uma outra metodologia bastante relevante, que também é fundamentada na utilização de radiomarcadores, é a técnica de incorporação de  $^3\text{H}$ -leucina ( $^3\text{H}$ -leu) proposta por Kirchman *et al.* (1985). Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para estimar as taxas de síntese protéica como um parâmetro de avaliação da produção bacteriana de diversos ambientes aquáticos dulcícolas (Pakulski *et al.*, 1995; Furtado *et al.*, 2001; Bastviken & Tranvik, 2001), marinhos (Pomeroy *et al.*, 1995; Carlson & Ducklow, 1996; Servais *et al.*,

2003; Church *et al.*, 2004; Malmstrom *et al.*, 2005) e estuarinos (Hoch & Kirchman, 1993; Sañudo-Wilhelmey & Taylor, 1999; Roland & Cole, 1999; Troussellier *et al.*, 2002; Murrell, 2003). Como avaliam a síntese de proteínas, as taxas de atividade obtidas através dessa metodologia acabam conseqüentemente demonstrando o aumento da biomassa celular do bacterioplâncton presente nesses ambientes.

A técnica de incorporação de  $^3\text{H}$ -leucina leva em consideração que as proteínas são os principais componentes macromoleculares das células bacterianas, chegando a alcançar cerca de 70% do seu peso seco (Simon & Azam, 1989). Também tem como princípio, que a leucina disponível no ambiente tende a ser utilizada e incorporada diretamente nas proteínas bacterianas ao invés de ser metabolizada e ressintetizada “de novo” por esses microrganismos. Esse método ainda leva em consideração que a leucina adicionada em concentrações nanomolares é captada somente pelas bactérias, e que a fração molar desse aminoácido é constante em uma ampla variedade de proteínas (Simon & Azam, 1989). De acordo com Simon & Azam (1989), o percentual de leucina nas proteínas bacterianas alcança 7,3%, enquanto que a razão do peso seco de carbono nas proteínas desses organismos é de 0,86. Tais características fazem com que os fatores de conversão necessários para transformar as taxas de incorporação de  $^3\text{H}$ -leucina em produção de carbono bacteriano sejam bastante constantes. Essa constância representa uma das vantagens do método.

Com base no que foi exposto acima é possível perceber que as mudanças nas taxas de incorporação de  $^3\text{H}$ -leucina pelas bactérias heterotróficas indicam apenas a ocorrência de alterações nas taxas de síntese protéica, não implicando em qualquer mudança nos níveis de leucina das proteínas desses organismos. Como a síntese de proteínas depende de compostos absorvidos do ambiente, a atividade bacteriana conseqüentemente irá variar de acordo com a disponibilidade de nutrientes e de matéria orgânica capazes de serem utilizados por esses microrganismos nos ecossistemas aquáticos. Por sua vez, a maior disponibilidade de tais substratos está relacionada com o nível de eutrofização encontrado nos corpos d’água. Dessa forma, as taxas de produção de biomassa bacteriana devem ser conseqüentemente maiores em sistemas com alto grau de poluição orgânica, tal como a BG. Essa relação entre atividade bacteriana e nível de eutrofização já foi descrita anteriormente por Gonzalez *et al.* (2000), Paranhos *et al.* (2001), Paranhos (2002) e Andrade *et al.* (2003) para esse ecossistema costeiro.

Como pode ser observado, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura que enfatizam a atividade das bactérias heterotróficas presentes na BG. Portanto, cabe ressaltar a extrema necessidade da realização de estudos que objetivam avaliar e monitorar esse

parâmetro microbiológico a fim de se obter um maior entendimento sobre a dinâmica e funcionamento desse corpo d'água.

### **1.1.3 – Diversidade bacteriana**

Um grande esforço também tem sido empregado a fim de se obter informações sobre a diversidade e a composição taxonômica das bactérias presentes nos ecossistemas aquáticos (Höfle & Brettar, 1995; Benlloch *et al.*, 1996; Wise *et al.*, 1997; Cottrell & Kirchman, 2000; Hagström *et al.*, 2000; Kelly & Chistoserdov, 2001; Kirchman *et al.*, 2001; Moeseneder *et al.*, 2001; Kemp & Aller, 2004a; Cottrell *et al.*, 2005). Uma maior aquisição de dados sobre diversidade bacteriana ocorreu após o desenvolvimento de métodos baseados em biologia molecular para identificação e classificação de microrganismos (Pedrós-Alió, 2006). Dessa forma, a aplicação de técnicas básicas de bioquímica e biologia molecular em estudos ambientais vem esclarecendo assuntos considerados anteriormente como inacessíveis. Tais metodologias baseiam-se na manipulação de ácidos nucléicos para determinação dos diferentes genótipos bacterianos, destacando-se entre elas, a reação em cadeia de polimerase (PCR); a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993); a clonagem e o sequenciamento gênico; e a identificação celular com probes fluorescentes específicos – hibridização “in situ” com sonda fluorescente (FISH) (Amann *et al.*, 1995).

Durante os últimos 15 anos, estudos moleculares baseados na sequência do gene que codifica a subunidade menor dos ribossomos têm ampliado o conhecimento a respeito da diversidade microbiana (Pedrós-Alió, 2006). Por exemplo, o “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Garrity, 2001) utiliza árvores SSU rRNA como base para avaliar as relações filogenéticas existentes entre os microrganismos. Apesar disso, grande parte da diversidade microbiana ainda não foi descrita, por que culturas puras dos microrganismos também são necessárias para se definir uma espécie (Pedrós-Alió, 1993). O gene ribossomal 16S vem sendo extensivamente empregado em estudos de filogenia com aplicação em ecologia molecular microbiana, por representar uma molécula evolutivamente conservada presente em todas as bactérias (Stahl & Amann, 1991). Além disso, este gene ainda é constituído de bases nucleotídicas variáveis, possuindo regiões características para grupos ou espécies bacterianas, condições que conseqüentemente facilitam o desenho de iniciadores reino-específicos, gênero-específicos e até mesmo, espécie-específicos (Woese, 1987). Cabe ressaltar que as propriedades do gene ribossomal 16S possibilitaram a criação de uma base de dados muito grande (National Center for Bioinformatics and Information – NCBI –

<http://www.ncbi.nih.gov>; DNA Data Bank of Japan – DDBJ – <http://www.ddbj.nig.ac.jp>; Ribosomal Database Project II – RDP II – <http://rdp.cme.msu.edu>) (Macrae, 2000), cujo acesso permite comparações dos resultados obtidos, gerando uma alta confiabilidade nas análises. Dessa forma é possível perceber que a bioinformática representa uma ferramenta bastante poderosa e necessária para a realização de trabalhos envolvendo biologia molecular. A utilização do gene 16S rDNA tem se mostrado bastante vantajosa, pois além de permitir a determinação da diversidade de eubactérias, ainda pode ser aplicado como um ótimo marcador filogenético (Heuer *et al.*, 2001). Assim, o gene ribossomal 16S tornou-se um parâmetro muito útil para ser usado em estudos sobre dinâmica de populações bacterianas em função de variações ambientais (Lindström, 2000; Trusova & Gladyshev, 2002; Horner-Devine *et al.*, 2003).

Além das aplicações citadas acima, o gene ribossomal 16S também pode ser utilizado em estudos sobre grupos de bactérias que realizam determinadas funções nos ecossistemas, como por exemplo, as bactérias nitrificantes (Voytek & Ward, 1995; Stephen *et al.*, 1996; Bano & Hollibaugh, 2000; Bothe *et al.*, 2000; Freitag & Prosser, 2004; O’Mullan & Ward, 2005). Vários trabalhos disponíveis na literatura sobre esses microrganismos têm sido realizados com base nos métodos tradicionais de cultivo e nas análises de imunofluorescência (Ford *et al.*, 1980; Ward & Carlucci, 1985; Saraswat *et al.*, 1994). Apesar da importância, tais metodologias normalmente geram resultados que não representam a real diversidade e abundância das bactérias nitrificantes presentes nos ambientes. O crescimento lento, as dificuldades de cultivo, isolamento e identificação, e os baixos números populacionais desses microrganismos em relação à abundância bacteriana total justificam o exposto acima (McCaig *et al.*, 1994; Voytek & Ward, 1995; Ward *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). Dessa maneira, o desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares baseadas no gene 16S têm contribuído para o recente progresso no conhecimento das bactérias nitrificantes e dos processos que controlam as transformações no ciclo do nitrogênio, uma vez que possibilitam a detecção, identificação e quantificação desses microrganismos de um modo mais rápido e preciso.

Embora seja de grande importância, a adequação do gene 16S rDNA para a detecção de bactérias nitrificantes vem sendo questionada (Rotthauwe *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). Tem sido demonstrado que sequências do gene ribossomal 16S desses microrganismos apresentam alta similaridade com sequências de outras bactérias, tais como a bactéria fototrófica *Rhodocyclus purpureus* e a oxidante de ferro *Gallionella ferruginea* (Bothe *et al.*, 2000). Dessa forma, iniciadores “específicos” para o gene 16S rDNA podem alinhar com o material genético de organismos filogeneticamente relacionados às bactérias nitrificantes, mas

que na realidade apresentam fisiologia e ecologia bastante diferentes. De acordo com Rotthauwe *et al.* (1997) e Bothe *et al.* (2000), o gene 16S rDNA é muito útil para análises da estrutura das comunidades bacterianas enquanto que genes que codificam enzimas chave são alvos mais adequados em estudos sobre os aspectos funcionais e/ou ecológicos de tais organismos.

Durante o processo de oxidação da amônia, duas enzimas co-dependentes são utilizadas: a amônia monooxigenase (AMO) que catalisa a oxidação da amônia (NH<sub>3</sub>) a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) e a hidroxilamina oxidoreductase (HAO) que atua na oxidação da hidroxilamina a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Rotthauwe *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). A oxidação do nitrito a nitrato é catalisada pela enzima nitrito oxidase (Bothe *et al.*, 2000). A enzima AMO é constituída por 3 sub-unidades: AMO-A, AMO-B e AMO-C que possuem, respectivamente, 27 a 30 kDa (Hyman & Arp, 1992), 38 a 43 kDa (Calvo & Garcia-Gil, 2004) e 31 kDa (Klotz *et al.*, 1997). Essas sub-unidades são codificadas, respectivamente, pelos genes *amoA*, *amoB* e *amoC*, que em conjunto formam o operon funcional *amo* (Sayavedra-Soto *et al.*, 1998).

O gene *amoA* é responsável por codificar o sítio ativo da enzima e tem se mostrado bastante adequado para ser utilizado em estudos ambientais (Purkhold *et al.*, 2000; Horz *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 2002; Cébron *et al.*, 2003; O'Mullan & Ward, 2005). Iniciadores específicos que amplificam esse gene em reações de PCR encontram-se disponíveis na literatura (Rotthauwe *et al.*, 1997; Horz *et al.*, 2000). Segundo O'Mullan & Ward (2005), o gene *amoA* apresenta duas vantagens sobre o 16S, sendo por isso mais adequado para comparar a diversidade genética entre as bactérias nitrificantes. Primeiramente, o gene *amoA* codifica a proteína diretamente envolvida na oxidação da amônia. Além disso, as taxas de divergência no *amoA* excedem aquelas do 16S rRNA, permitindo conseqüentemente uma maior resolução das diferenças genéticas nas populações naturais. Apesar da existência de iniciadores de PCR específicos para bactérias oxidantes de amônia, até o presente momento ainda não existem disponíveis na literatura iniciadores específicos para os genes funcionais das oxidantes de nitrito (Cébron *et al.*, 2003). Dessa forma, estudos sobre tais microrganismos baseiam-se na utilização do gene ribossomal 16S (Cébron *et al.*, 2003).

Cabe ainda ressaltar que apesar das técnicas moleculares citadas acima estarem sendo crescentemente aplicadas em projetos de caracterização ambiental, poucas têm sido as tentativas feitas para relacionar a composição da comunidade bacteriana aos parâmetros físicos, químicos e biológicos dos ecossistemas aquáticos (Lindström, 2000). Dessa forma, poucas são as informações disponíveis na literatura a respeito de quais fatores podem influenciar a composição do bacterioplâncton presente em tais ambientes. Estudos

experimentais realizados em ambientes dulcícolas e marinhos têm demonstrado que a disponibilidade de nutrientes pode influenciar fortemente a composição, a dinâmica e a distribuição da comunidade de bactérias aquáticas (Muyzer & Smalla, 1998). Sugere-se então, que em sistemas com diferentes graus de eutrofização, tal como a BG, ocorram variações distintas desses parâmetros biológicos.

Pelo exposto acima é possível perceber a grande necessidade da realização de estudos que objetivam avaliar a diversidade da comunidade de eubactérias e de bactérias nitrificantes presentes na baía. A construção de bibliotecas 16S de eubactérias e *amoA* de bactérias nitrificantes presentes em tal ambiente contribuirá significativamente para uma maior compreensão das funções ecológicas e das relações filogenéticas existentes entre esses microrganismos. Cabe ainda ressaltar que a construção dessas bibliotecas, de caráter inédito para a BG, ainda contribuirá para um maior entendimento sobre a dinâmica e processos desse corpo d'água.

## 2 – Área de estudo

A BG (22°57' e 22°41' S; 43°02' e 43°16' W) é um importante corpo d'água situado no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 3). Este ecossistema costeiro vem sendo submetido a um acelerado processo de degradação ambiental, causado principalmente por influências de origem antrópica (Mayr *et al.*, 1989; FEEMA, 1990; Paranhos *et al.*, 1995; FEEMA, 1998; Paranhos *et al.*, 1998; Valentin *et al.*, 1999; Paranhos, 2002). Tais influências afetam tanto o corpo d'água quanto a bacia de drenagem e os manguezais remanescentes desse ambiente, pondo em risco alguns de seus múltiplos usos econômicos, ecológicos e sociais. Dentre esses usos, pode-se destacar a pesca, o turismo, o lazer, a navegação e as atividades portuárias.

Situada em uma área de clima subtropical úmido, a BG é caracterizada por apresentar variações do índice pluviométrico ao longo do ano (Paranhos & Mayr, 1993). Nessa região, a estação chuvosa ocorre de outubro a abril, e a estação seca, de maio a setembro. Os maiores índices pluviométricos ocorrem principalmente durante os meses quentes de verão (dezembro a fevereiro). Nesse período, normalmente ocorrem fortes chuvas torrenciais e a precipitação chega a alcançar 200 mm por mês. O oposto acontece principalmente durante os meses de inverno (julho a agosto), período em que se observam as menores taxas de precipitação (menos de 80 mm de chuva por mês) (Paranhos & Mayr, 1993). Nesta área, a média anual da temperatura do ar é de 23,7°C e a umidade relativa, ao nível do mar, em torno de 78% (DENEMET, 1992).

A BG é orientada principalmente na direção norte-sul, possuindo aproximadamente 30 Km de extensão. É ainda caracterizada por apresentar uma largura aproximada de 28 Km na direção leste-oeste. Possui 42 ilhas com uma extensão total de 44 Km<sup>2</sup> e 53 praias consideradas inadequadas para o contato primário segundo a resolução N° 357 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) publicada em 2005. Apresenta uma área de manguezais com 90 Km<sup>2</sup> dos quais 43 Km<sup>2</sup> são encontrados na região nordeste, fazendo parte da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guapimirim (FEEMA, 1990). A BG possui uma área de 381 Km<sup>2</sup>, um perímetro de 131 Km e um volume estimado em 2,0x10<sup>9</sup> m<sup>3</sup> (FEEMA, 1980, 1990). Sua bacia de drenagem atinge uma área aproximada de 4.000 km<sup>2</sup> e é constituída por 32 sub-bacias hidrográficas, delimitadas pela cadeia de montanhas da “Serra do Mar” (FEEMA, 1990). Essa cadeia de montanhas atinge uma altura máxima de 2.263 m na Pedra do Sino e é parcialmente coberta por vestígios de vegetação de Mata Atlântica (FEEMA, 1990). A bacia de drenagem da BG abriga grande parte da região metropolitana do estado do

Rio de Janeiro, compreendendo os municípios de Nilópolis, São João de Meriti, Duque de Caxias, Magé, Itaboraí, Belford Roxo, Guapimirim, Tanguá, Cachoeira de Macacu, Rio Bonito, São Gonçalo, Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Petrópolis e Niterói (Amador, 1997).

Por ser um ecossistema costeiro semi-fechado com características de interface entre regiões aquáticas dulcícolas e marinhas (Oceano Atlântico), a BG é considerada um ambiente de natureza estuarina. Sendo um estuário de águas parcialmente misturadas (Amador, 1980), suas características físicas, químicas e biológicas dependem conseqüentemente da relação que existe entre o aporte de água continental e a água proveniente da região costeira adjacente (Mayr *et al.*, 1989; Villac *et al.*, 1991). Além de serem influenciados pela mistura das águas, os fatores ambientais da BG também são regulados pela variabilidade sazonal encontrada nessa região (Mayr *et al.*, 1989; Villac *et al.*, 1991).

Como citado anteriormente, os maiores índices de precipitação ocorrem no verão, fato que contribui significativamente para que a coluna d'água apresente-se altamente estratificada nessa estação. É no verão em que são encontrados os maiores valores de temperatura e os menores de salinidade nas águas superficiais da BG. De acordo com Paranhos & Mayr (1993), é neste período do ano em que se observam diferenças de aproximadamente 10°C e 10S, respectivamente, para os valores de temperatura e de salinidade entre as camadas superficiais e de fundo. O oposto normalmente ocorre no inverno, época em que são encontrados os menores valores de temperatura e os maiores de salinidade, com a coluna d'água mostrando-se mais homogênea (Paranhos & Mayr, 1993). Diferenças nos valores de temperatura e salinidade entre as camadas superficiais e de fundo atingem aproximadamente 4°C e 5S, respectivamente, nessa estação. Cabe ressaltar que as mudanças nos padrões de estratificação durante as estações do ano têm grande influência na distribuição dos parâmetros químicos das águas desse ambiente, principalmente os sais nutrientes. As variações sazonais desses parâmetros afetam os componentes biológicos do sistema, influenciando principalmente a abundância e a distribuição vertical dos organismos planctônicos (Mayr *et al.*, 1989; Villac *et al.*, 1991).

A entrada de água doce na BG ocorre através das chuvas e dos 35 rios que nela deságuam (FEEMA, 1980, 1990, 1998). Outra importante contribuição dulcícola é proveniente dos efluentes domésticos e industriais que são lançados diariamente nesse corpo d'água, e que representam um dos principais responsáveis pelo atual quadro de eutrofização da baía (Mayr *et al.*, 1989). A região metropolitana do estado do Rio de Janeiro representa o segundo maior parque industrial do país, possuindo 6.000 indústrias, 2 petroquímicas, 2 portos comerciais (Rio de Janeiro e Niterói), 12 estaleiros e 16 terminais marítimos (FEEMA,

1990). Estes são responsáveis pelo lançamento de 150 toneladas de efluentes industriais (óleo, metais pesados, micropoluentes orgânicos e hidrocarbonetos de petróleo) que entram diariamente na BG sem tratamento prévio adequado (Pfeiffer *et al.*, 1982; Lacerda *et al.*, 1988). Tais substâncias tendem a se acumular nos sedimentos anóxicos e ricos em matéria orgânica da baía, contribuindo para agravar ainda mais o estado de degradação desse ambiente. Segundo a Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia (SECT, 2000), apenas os sedimentos da região próxima a APA de Guapimirim não encontram-se contaminados com esses produtos de origem antrópica. Os metais pesados, por exemplo, ocorrem em maiores concentrações na região oeste da baía, principalmente próximo às desembocaduras dos rios Iguaçu, Sarapuí e São João de Meriti. De acordo com os trabalhos realizados por Pfeiffer *et al.* (1982), Perin *et al.* (1997) e SECT (2000), os metais com níveis mais críticos na baía são o cádmio, o ferro, o zinco, o cobre e o cromo, sendo a Refinaria Duque de Caxias (REDUC) da PETROBRAS uma das maiores responsáveis por essa contaminação. Apesar da grande poluição química, esses metais pesados encontram-se principalmente associados ao particulado orgânico presente nos sedimentos, não estando disponíveis para a biota.

Outro grande problema referente à poluição da BG está relacionado aos rejeitos de origem doméstica (Paranhos *et al.*, 1995). A cidade do Rio de Janeiro, por exemplo, representa o segundo maior centro demográfico do país com mais de 10 milhões de habitantes vivendo no entorno da baía. Esse grande número populacional é responsável pelo lançamento diário de 470 toneladas de matéria orgânica nesse corpo d'água, dos quais apenas 68 toneladas recebem tratamento prévio adequado (Mayr *et al.*, 1989). Além disso, esse grande centro demográfico também responde pelo lançamento diário de aproximadamente 6 mil toneladas de lixo (FEEMA, 1990), que também contribui para que a poluição de origem doméstica seja considerada o problema mais drástico pelo qual a baía vem sendo submetida.

O padrão hidrodinâmico de circulação na baía é influenciado pela maré, pelos ventos e pelas condições físicas e geomorfológicas do ambiente. A comunicação desse ecossistema costeiro com o Oceano Atlântico é realizada através de uma estreita abertura que mede aproximadamente 1,8 km de largura e se estende entre o Forte São João (lado oeste) e a Fortaleza Santa Cruz (lado leste da baía) (FEEMA, 1990). Devido ao seu pequeno tamanho, essa abertura potencializa a entrada e a saída das correntes de maré, que são semi-diúrnas e chegam a alcançar uma altura máxima de 1,4 m (BRASIL, 1976). Durante as marés de enchente, as águas costeiras mais limpas, mais frias e mais salinas provenientes da plataforma continental entram na BG pelas camadas mais profundas desse ambiente. O oposto ocorre durante as marés vazantes, onde as águas poluídas do interior desse sistema são lançadas para

o Oceano Atlântico através das camadas superficiais. Dessa forma, a presença de um canal central estreito e profundo (com aproximadamente 20 m) contribui significativamente para a renovação das águas desse sistema (Mayr *et al.*, 1989; Paranhos *et al.*, 1993).

Apesar disso, a circulação das águas dentro da BG tem sido afetada por inúmeras construções e aterros de origem antrópica (Amador, 1980). Como descrito na literatura, as profundidades desse ecossistema não são uniformes havendo várias regiões com diferentes perfis batimétricos (Mayr *et al.*, 1989). Sua profundidade média é de 7,6 m, e varia de aproximadamente 3 m no fundo da baía até 16,9 m na área mais externa desse ecossistema (Amador, 1997). Segundo Amador (1980), a sedimentação de toda baía é um processo natural e esperado de ocorrer. No entanto, as taxas de assoreamento da BG se encontram em um nível mais alto que o previsto já que estão sendo aceleradas por influências de origem antrópica. O homem tem direta e indiretamente, aumentado as taxas de sedimentação desse ecossistema através de inúmeros aterros em suas margens, pela modificação do regime de alguns rios e pela destruição dos manguezais adjacentes a esse ambiente (FEEMA, 1990). Além disso, o desmatamento das encostas circundantes também contribui para tornar esse ecossistema mais raso, visto que durante os eventos pluviométricos grandes quantidades de sedimento são transportados para o interior do corpo d'água. De acordo com Amador (1997) e Godoy *et al.* (1998), as taxas de sedimentação na BG são maiores que 2 cm ao ano e respondem pela redução de 29,1% da área desse ambiente.

O assoreamento diminui gradualmente as profundidades da baía, prejudicando a circulação de água e gerando áreas com diferentes condições ambientais. O gradiente espacial de qualidade de água desse ecossistema já foi descrito por vários autores a partir de estudos baseados na análise de diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos (Hagler & Hagler, 1981; Mayr *et al.*, 1989; Villac, 1990; Araújo *et al.*, 1991; Lavrado *et al.*, 1991; Paranhos *et al.*, 1993; Paranhos *et al.*, 1995; Kjerfve, 1997; FEEMA, 1998; Paranhos *et al.*, 1998). O gradiente norte-sul da baía ocorre em função de sua natureza estuarina, sendo um reflexo do balanço existente entre as contribuições continentais e marinhas. A região de fundo, por exemplo, está localizada na porção norte desse ecossistema e é caracterizada pela maior influência de águas fluviais. Conseqüentemente, é nessa região mais eutrofizada, em que são observados os maiores valores de temperatura, ortofosfato, fósforo total, amônia, nitrito, silicato, clorofila *a*, material particulado em suspensão e coliformes totais e fecais. Menores valores de salinidade, oxigênio dissolvido, pH, nitrato e transparência também são encontrados nas águas dessa região. O padrão oposto é observado na porção sul da baía, uma

área de melhores condições ambientais devido a maior influência de águas oceânicas (Contador & Paranhos, 1996; Paranhos, 2002).

Por sua vez, o gradiente leste-oeste é reflexo da ocupação humana no entorno da baía (Paranhos, 2002). A presença das cidades do Rio de Janeiro, São João de Meriti, Duque de Caxias, Nilópolis e Belford Roxo na porção oeste desse ecossistema justificam as baixas taxas de oxigenação e os valores elevados de todos os indicadores de poluição que normalmente são encontrados nessa região. O oposto é observado na porção leste da baía, sob influência das cidades de Niterói e São Gonçalo, que é caracterizada pelos menores índices de poluição e maiores teores de oxigênio dissolvido nas águas (Paranhos, 2002).

Como citado anteriormente, as elevadas taxas de sedimentação afetam a circulação de água na baía, tornando mais difícil a diluição dos efluentes domésticos e industriais que são lançados diariamente nesse corpo d'água. O processo de auto-depuração desse ecossistema se torna mais lento, aumentando ainda mais o seu quadro de eutrofização. A grande disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (Lavrado *et al.*, 1991), acaba favorecendo a proliferação de algas (Barreto, 1992) e bactérias (Gonzalez *et al.*, 2000; Paranhos *et al.*, 2001; Paranhos, 2002) nesse corpo d'água.

Apesar da importância, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura sobre os microorganismos presentes nesse ambiente. Hagler *et al.* (1986) e Araújo *et al.* (1991) descreveram os níveis de alguns indicadores microbianos, enquanto que Paranhos *et al.* (1995) analisaram a sua evolução ao longo do tempo. As ocorrências de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram determinadas, respectivamente, por Araújo *et al.* (1990) e Guimarães *et al.* (1993). Dados de atividade e abundância bacterianas foram obtidos por Gonzalez *et al.* (2000); Paranhos *et al.* (2001); Paranhos, (2002) e Andrade *et al.* (2003). Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos foram estudadas por Brito *et al.* (2006) em manguezais da baía. E finalmente, a diversidade de bactérias e arqueias presentes ao longo do gradiente estuarino foram avaliadas por Vieira *et al.* (2007a,b). Dessa forma, é possível perceber a grande necessidade da realização de estudos sobre os microorganismos existentes nesse ambiente costeiro.

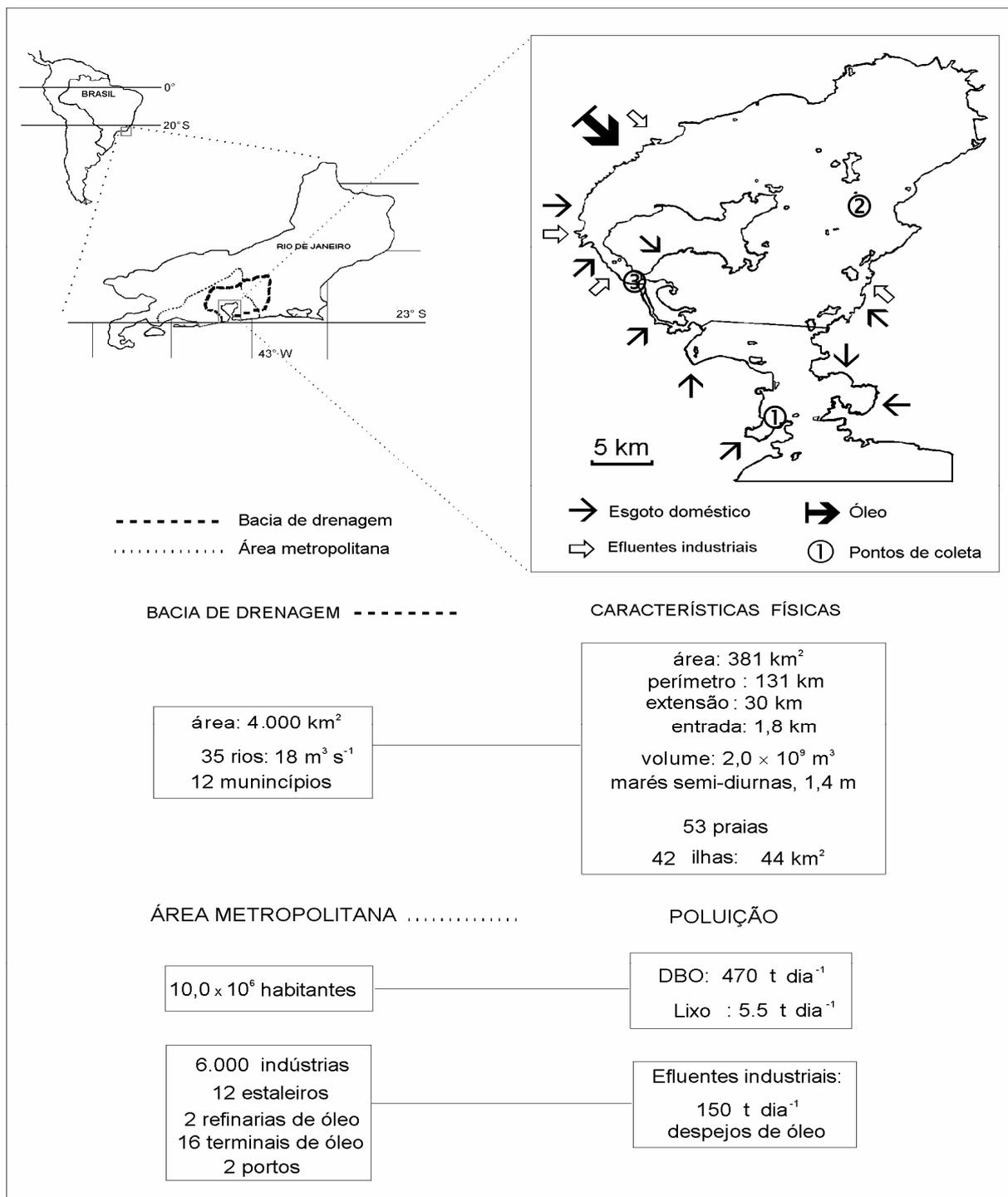


Figura 3: Localização da BG, sua bacia de drenagem, área metropolitana do Rio de Janeiro e os pontos de coleta. enseada da Urca (1), ilha de Paquetá (2) e praia de Ramos (3).

### 3 - Hipótese

Com base no que foi exposto anteriormente e considerando que a poluição orgânica pela qual a baía vem sendo submetida pode influenciar fortemente os microrganismos presentes nesse ambiente, a seguinte hipótese de trabalho foi levantada:

⇒ A abundância, a atividade e a diversidade de bactérias presentes na BG variam de acordo com o grau de eutrofização do sistema. A abundância e a atividade bacterianas são mais elevadas nas áreas mais eutrofizadas desse corpo d'água. Por sua vez, uma menor diversidade de bactérias ocorre nessas áreas.

### 4 - Objetivos

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos:

⇒ Determinar a distribuição espacial e temporal dos parâmetros bacterianos (abundância e atividade) na baía de Guanabara;

⇒ Construir bibliotecas 16S a fim de avaliar a diversidade de eubactérias encontradas ao longo de um gradiente de águas continentais a oceânicas (BG – Oceano Atlântico);

⇒ Construir biblioteca do gene *amoA* a fim de verificar a presença de bactérias nitrificantes na enseada da Urca, uma área de melhor qualidade de água da baía;

⇒ Adquirir dados de diversos parâmetros físicos e químicos da água a fim de correlacionar a dinâmica bacteriana aos processos de eutrofização e nitrificação desse ecossistema costeiro.

## 5 - Metodologia

### 5.1 – Campanhas e estratégias amostrais

No presente estudo, duas diferentes estratégias amostrais foram utilizadas a fim de se obter uma maior compreensão sobre os processos microbiológicos que ocorrem na BG: (1) coletas pontuais ao longo de “transects” e (2) coletas mensais durante dois anos consecutivos.

#### 5.1.1 – Coletas ao longo dos “transects”

Essa etapa do trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição espacial dos parâmetros bacterianos (abundância, atividade e diversidade de eubactérias) ao longo de “transects” na BG. Dados físicos e químicos foram obtidos para auxiliar na interpretação dos resultados de bactérias. Esse estudo foi realizado nos dias 10 de setembro de 2002 e 10 de julho de 2003, durante a maré vazante, com o auxílio do Navio Astro-Garoupa, gentilmente cedido pela PETROBRAS. Ao longo desses “transects”, amostras de água sub-superficiais (1 m) foram obtidas em 8 diferentes estações de coleta. Os locais de estudo são bastante distintos tanto em termos de circulação quanto em relação à qualidade ambiental e representam um gradiente de águas continentais a oceânicas (Figura 4).

O ponto de coleta B1 foi situado em frente à Ilha do Fundão, região mais interna da baía. As estações denominadas B2, SD, IL e FB, foram localizadas sobre o canal principal de circulação, próximas, respectivamente, à Ponte Rio-Niterói, à Marina da Glória, à enseada de Botafogo e à entrada da baía (Figura 4). Os locais de coleta 2K, 5K e 10K estavam situados na região costeira adjacente, respectivamente, a 2, 5 e 10 Km de distância da entrada da BG. Com o propósito de complementar o “transect” realizado em julho de 2003, amostras de água sub-superficiais (0,5 m) também foram obtidas no canal da Maré (CM), uma região hiper-entrofizada e de restrita circulação (Mayr *et al.*, 1989). A coleta nessa estação, caracterizada por receber o aporte de grandes quantidades de efluentes domésticos não tratados, foi realizada no dia 13 de agosto de 2004.

As amostras de água foram obtidas através de garrafas Niskin de 10 L e transferidas para diferentes tipos de frascos de acordo com o parâmetro a ser analisado. Amostras para determinação dos teores de oxigênio dissolvido (OD) na água foram drenadas para frascos de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) de 300 mL e imediatamente fixadas pela adição de 2 mL de sulfato manganoso e 2 mL de iodeto alcalino azida. As titulações com tiosulfato de

sódio foram realizadas a bordo do navio Astro-Garoupa. Amostras para determinação da salinidade foram armazenadas dentro de tubos Falcon de 50 mL e posteriormente analisadas no laboratório. As amostras destinadas à avaliação dos teores de clorofila *a* foram transferidas para frascos plásticos de 2 L. Frascos escuros foram usados com o propósito de se evitar a degradação dos pigmentos fotossintetizantes. As filtrações foram realizadas logo após a coleta e as membranas de celulose Millipore HAWP preservadas em nitrogênio líquido até posterior análise em laboratório. Amostras de água para quantificação do Material Particulado em Suspensão (MPS) foram transferidas para frascos plásticos de 2 L. As filtrações também foram realizadas a bordo do navio e os filtros de fibra de vidro Millipore AP15 preservados a 4°C dentro de placas de Petri. As amostras de nutrientes foram armazenadas dentro de frascos de polipropileno de 1 L, previamente lavados com HCl 1:1 e água ultra-pura (Milli-Q Gradiente UV), e preservadas a -20°C.

Amostras de água para determinação da abundância e da atividade bacteriana foram transferidas para tubos Falcon estéreis de 15 mL. A fixação com paraformaldeído e a incorporação com <sup>3</sup>H-leucina, etapas necessárias para a análise desses dois parâmetros, respectivamente, foram realizadas imediatamente após a coleta. Amostras de água para a construção da biblioteca 16S de eubactérias foram coletadas apenas no canal da Maré e nas estações BI e 5K durante o “transect” realizado no ano de 2003. Estas amostras foram transferidas da garrafa Niskin para frascos plásticos estéreis de 2 L. Após a coleta, as amostras foram pré-filtradas sobre membranas de celulose Millipore SSWP com 3 µm de tamanho de poro e em seguida, concentradas em filtros Sterivex-GS de 0,22 µm (Millipore). Após filtração, 1,8 mL de tampão de lise “SET buffer” (20% sucrose, EDTA 50 mM, Tris hidrocloreto 50 mM pH 7,6) foi adicionado no interior do filtro Sterivex e o material preservado a -20°C por aproximadamente 30 dias até análise em laboratório (Somerville *et al.*, 1989).

O Sterivex é um filtro de éster de celulose montado dentro de um recipiente cilíndrico de cloreto polivinil projetado para permitir a filtração sobre pressão. Esses filtros têm sido indicados para a realização de estudos ambientais (Somerville *et al.*, 1989), pois apresentam a capacidade de filtração muito maior do que as membranas planas de mesmo tamanho de poro. Conseqüentemente, os filtros Sterivex são muito úteis para concentrar grandes volumes de água. Uma outra vantagem é que o filtro Sterivex fornece grande estabilidade durante o transporte da amostra para o laboratório não havendo necessidade da adição de substâncias

químicas para preservá-la. Além disso, o procedimento de extração dos ácidos nucleicos ainda pode ser realizado dentro do recipiente no qual o filtro está inserido.

### 5.1.2 – Coletas mensais

Essa outra etapa do trabalho objetivou verificar a distribuição espacial e temporal dos parâmetros bacterianos (abundância e atividade) na BG. Também teve como objetivo determinar a presença do gene *amoA*, um gene envolvido no processo de nitrificação. Parâmetros físicos e químicos foram determinados para auxiliar a compreensão dos resultados microbiológicos. Dessa forma, amostras de água sub-superficiais (0,5 m) foram obtidas mensalmente de março de 2003 a fevereiro de 2005 em 3 diferentes estações de coleta (Figura 3). Esse estudo é uma continuação da série histórica de aquisição de dados que vem sendo realizada pelo Laboratório de Hidrobiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e que foi iniciada no ano de 1997 com o trabalho de Paranhos (2002).

A enseada da Urca (ponto 1) representa a região de melhor qualidade de água da baía devido a sua proximidade com o Oceano Atlântico adjacente (Contador & Paranhos, 1996). A área de coleta localizada próxima à ilha de Paquetá (ponto 2) possui uma qualidade de água intermediária. Essa estação estava localizada em frente ao canal principal de circulação da baía, recebendo forte influência de águas oceânicas e continentais durante as marés cheia e vazante, respectivamente. Finalmente, a área de coleta situada próxima à praia de Ramos (ponto 3) é caracterizada por apresentar as piores condições ambientais da BG. Essa é uma região hiper-eutrofizada e de restrita circulação de água (Mayr *et al.*, 1989). Além da poluição orgânica ainda existem outras fontes de contaminação (rejeitos industriais, derramamento de óleo) que juntamente com os inúmeros aterros de origem antrópica contribuem para que esse local apresente o nível mais alto de degradação do ecossistema.

As amostras de água foram obtidas com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn de 3 L e transferidas para diferentes tipos de frascos de acordo com o parâmetro a ser analisado. Amostras para determinação do OD foram transferidas para frascos de DBO de 300 mL e imediatamente fixadas pela adição de 2 mL de sulfato manganoso e 2 mL de iodeto alcalino azida. Amostras para determinação da salinidade e do pH da água foram armazenadas em frascos de vidro. As amostras para análise de clorofila *a* foram transferidas da garrafa de coleta para frascos de polipropileno de 1 L. Frascos escuros foram utilizados a fim de se evitar a degradação dos pigmentos fotossintetizantes. Amostras para quantificação dos teores de MPS e de nutrientes foram armazenadas em frascos de polipropileno de 1 L, previamente

lavados com HCl 1:1 e água ultra-pura (Milli-Q Gradiente UV). Amostras para determinação da abundância e da atividade bacteriana foram transferidas para tubos Falcon estéreis de 15 mL. Amostra de água para construção da biblioteca *amoA* das bactérias oxidantes de amônia foi obtida na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004 durante a maré de enchente. Essa amostra foi armazenada em frasco de polipropileno estéril de 1 L e em seguida, pré-filtrada sobre membrana de celulose Millipore SSWP de 3 µm de tamanho de poro. A amostra foi então concentrada em filtro de celulose Millipore GSWP 0,22 µm e preservada em nitrogênio líquido, por aproximadamente 2 anos, até análise em laboratório. Todas as outras amostras foram mantidas e transportadas para o laboratório dentro de caixas de isopor com gelo no intervalo de 1 a 2 horas após a coleta.

## **5.2 – Análises em laboratório**

### **5.2.1 – Parâmetros físicos e químicos**

As análises dos parâmetros físicos e químicos da água foram realizadas segundo métodos padrões em oceanografia. Medidas de temperatura foram obtidas no momento da coleta com o auxílio de um termômetro graduado de mercúrio. A salinidade foi determinada através do método da Clorinidade (CNEXO, 1983), que foi calibrado com água do mar padrão. Unidades Práticas de Salinidade foram usadas e os resultados referidos pelo símbolo S (UNESCO, 1981). O OD foi avaliado pelo método de Winkler-azida (CNEXO, 1983). Amostras para pH foram analisadas pelo método potenciométrico (Grasshoff *et al.*, 1999). Para isso, foi utilizado um potenciômetro Corning 112 calibrado com tampões de pH 4, 7 e 10. As análises de clorofila *a* foram realizadas por filtração a vácuo (< 25 cm de Hg) em membranas de celulose Millipore HAWP de 0,45 µm de tamanho de poro. Os pigmentos retidos nos filtros foram extraídos em acetona 90% durante 18 horas a 4°C. A leitura espectrofotométrica (UV-VIS Perkin Elmer Lambda 20) e os cálculos da análise foram realizados de acordo com Parsons *et al.* (1984). O MPS foi quantificado por gravimetria utilizando-se filtros de fibra de vidro Millipore AP15 (Parsons *et al.*, 1984). O nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub> + N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi determinado pelo método do indofenol (Parsons *et al.*, 1984), o nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) por diazotação (Grasshoff *et al.*, 1999) e o nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por redução em coluna de cádmio e cobre seguido de diazotação, via análise por injeção em fluxo (Grasshoff *et al.*, 1999). Para as análises de nitrogênio total, as amostras foram digeridas com persulfato de potássio, autoclavadas e determinadas pelo método descrito para nitrato

(Grasshoff *et al.*, 1999). O ortofosfato ( $P-PO_4^{3-}$ ) foi avaliado pelo método fosfomolibdico, o fósforo total por digestão ácida a fosfato e o silicato ( $SiO_2$ ) pela técnica de reação com molibdato (Grasshoff *et al.*, 1999). Todas as metodologias citadas acima estão descritas em maiores detalhes em Paranhos (1996). As análises de salinidade, OD e nutrientes foram realizadas em triplicata.

### 5.2.2 – Abundância bacteriana

A abundância bacteriana foi enumerada seguindo a descrição de del Giorgio *et al.* (1996) e Gasol & del Giorgio (2000). Amostras de aproximadamente 2 mL foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 2% (concentração final), esterilizada por filtração em membrana de 0,22  $\mu m$  de tamanho de poro. Após fixação, as amostras foram preservadas em nitrogênio líquido até análise. Somente alguns minutos antes do procedimento analítico é que as amostras foram retiradas do galão de nitrogênio líquido e descongeladas.

Alíquotas de 0,5 mL foram retiradas dos tubos eppendorfs e transferidas para tubos plásticos estéreis específicos para citometria (Falcon 2052). Os ácidos nucleicos das bactérias foram marcados com 20  $\mu L$  do fluorocromo syto13 a 2,5  $\mu M$  (Molecular Probes, ref. S-7575). O syto13 é um corante que apresenta uma grande afinidade por ácidos nucleicos, podendo ser utilizado para marcar o DNA e o RNA de células vivas e/ou mortas. Cabe ressaltar, que este procedimento foi realizado no interior de uma capela, ao abrigo da luz e as amostras imediatamente homogeneizadas em vórtex.

Após sonicação, 10  $\mu L$  de uma solução de microesferas fluorescentes (Fluoresbrite YG carboxilate 1,58  $\mu m$ , ref 17687, Polysciences) foram adicionados às amostras e utilizados para calibração do aparelho e como padrão interno das contagens. Essas esferas foram retiradas de uma solução de trabalho elaborada a partir do produto fornecido pelo fabricante. Para isso, esse produto que apresenta uma concentração aproximada de  $10^7$  esferas.mL<sup>-1</sup>, foi submetido a sonicação (70 Hz durante 15 minutos em banho de gelo). Em seguida, uma alíquota de 150  $\mu L$  foi diluída em 20 mL de água Milli-Q estéril (filtrada em membrana 0,22  $\mu m$  e autoclavada). A concentração de esferas na solução de trabalho foi aferida através de microscopia de epifluorescência seguindo a descrição de Lebaron *et al.* (1994). Após adição das esferas fluorescentes, os tubos com as amostras a serem analisadas foram mantidos ao abrigo da luz durante 15 minutos.

A quantificação celular foi realizada através de um citômetro em fluxo CyAn ADP (Dako) equipado com laser de estado sólido (emissão de 25 mW a 488 nm). Tampão PBS

esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm foi utilizado como solução carreadora. A fluorescência emitida pelas bactérias foi observada pelo espalhamento lateral a 90° (SSC, *side scatter*, eixo X, indicativo de tamanho celular) e pelas fotomultiplicadoras FL1 (510 ± 15 nm) e FL4 (660 ± 15 nm) (eixo Y, fluorescência verde do syto13 relacionada ao teor de ácidos nucléicos). As contagens foram realizadas utilizando-se o programa Summit 4.2 da Dako. A partir destes sinais foram definidas diferentes áreas de contagem, que possibilitaram a determinação do número de esferas, de bactérias totais e dos diferentes sub-grupos bacterianos (Marie *et al.*, 1997; Gasol *et al.*, 1999; Gasol & del Giorgio, 2000; Lebaron *et al.*, 2001). Baseado nos sinais óticos e de fluorescência, foi possível distinguir as células com alto conteúdo aparente de ácidos nucléicos (HNA) e as células com baixo conteúdo aparente de ácidos nucléicos (LNA).

A quantificação citométrica da abundância bacteriana foi realizada com base na taxa entre as células marcadas com o fluorocromo e as microesferas adicionadas às amostras como padrão interno de calibração. Para isso, a fórmula [(número de bactérias contadas por citometria / número de esferas contadas por citometria) X número de esferas contadas por microscopia] foi utilizada.

### **5.2.3 – Atividade bacteriana**

A atividade bacteriana foi determinada através do método descrito por Kirchman *et al.* (1985) e posteriormente modificado por Smith & Azam (1992). Essa modificação metodológica emprega centrifugação ao invés de filtração para separar a <sup>3</sup>H-leucina incorporada em proteínas daquela não incorporada nas células bacterianas. Esse método é bastante vantajoso, pois além de ser mais rápido e produzir menores quantidades de rejeitos líquidos e sólidos ainda utiliza pequenos volumes de isótopo radioativo durante as análises.

Segundo Rieman & Azam (1992), a <sup>3</sup>H-leucina apresenta uma alta diluição extracelular em ambientes eutrofizados. Portanto, a concentração do isótopo radioativo a ser usada para quantificar a atividade bacteriana varia de acordo com o grau de eutrofização do sistema a ser estudado. Além disso, esse aminoácido ainda pode ser sintetizado a partir de outros compostos, condição que favorece a diluição intracelular da leucina marcada radioativamente. Dessa forma, as determinações da atividade bacteriana devem ser realizadas utilizando-se concentrações de <sup>3</sup>H-leucina que sejam altas o suficiente para maximizar a incorporação da leucina marcada e inibir a síntese intracelular do aminoácido (Simon & Azam, 1989; Kirchman, 1993). No entanto, tais concentrações não podem ser excessivas visto

que em tais condições os organismos fitoplanctônicos também acabam utilizando a  $^3\text{H}$ -leucina como fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas. Portanto, a partir de experimentos de incorporação dependentes de concentração previamente realizados, foi possível estabelecer que 10 nM é a concentração de saturação adequada para ser utilizada em toda a BG (Gonzalez *et al.*, 2000).

Alíquotas de 1,7 mL de água foram incubadas, em duplicata, dentro de tubos “eppendorfs” estéreis de 2 mL contendo 12,8  $\mu\text{L}$  de L-[4,5- $^3\text{H}$ -leucina] a 10 nM (Amersham TRK 510, atividade específica de 171 mCi nmol $^{-1}$ ). Um tratamento controle com mesmo volume de amostra e mesma concentração de  $^3\text{H}$ -leucina foi obtido pela adição de 90  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético frio a 100% (TCA 100%) antes da incubação. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas durante 30 (amostras costeiras) ou 60 (amostras oceânicas) minutos ao abrigo da luz. Em seguida, as incubações foram interrompidas pela adição de 90  $\mu\text{L}$  de TCA frio a 100%. As alíquotas foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 20°C (Haraeus Biofuge fresco) e os sobrenadantes cuidadosamente aspirados com o auxílio de uma bomba de vácuo a 20 cm Hg. Os “pellets” remanescentes foram subsequentemente lavados com 1,7 mL de TCA frio a 5% e 1,7 mL de etanol frio a 80%. As amostras foram novamente homogeneizadas, centrifugadas e os sobrenadantes aspirados como descrito anteriormente. Após essas lavagens, 0,5 mL de coquetel de cintilação (1 g de POPOP [Sigma P-3754] + 7 g de POP [Sigma D-4630] em 1 L de tolueno) foram adicionados às amostras. A radioatividade da leucina incorporada nas proteínas bacterianas foi quantificada através de um cintilador líquido (Beckman LS6000SC). Este aparelho pertence ao Laboratório de Limnologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob responsabilidade do Dr. Francisco Esteves. A produção de carbono bacteriano foi calculada utilizando-se o fator de conversão proteína/carbono de 0,86 (Simon & Azam, 1989).

#### **5.2.4 – Diversidade bacteriana**

Bibliotecas do gene 16S das eubactérias e *amoA* das bactérias oxidantes de amônia foram construídas para sequenciamento e modelagem de árvores filogenéticas através de bioinformática. Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a responsabilidade do Dr. Orlando Bonifácio Martins.

#### 5.2.4.1 – Extração do DNA ambiental

O DNA ambiental foi isolado através de digestão enzimática e química (Sambrook & Russell, 2001). A extração enzimática do DNA presente nas amostras coletadas ao longo do “transect” para determinação da diversidade de eubactérias foi realizada dentro do recipiente na qual o filtro Sterivex estava inserido. No caso da amostra destinada a avaliação da diversidade de bactérias oxidantes de amônia, o procedimento de extração foi realizado dentro de um tubo Falcon estéril de 15 mL após o filtro (Millipore HAWP 0,22  $\mu\text{m}$ ) ter sido cortado em pequenos pedaços. A extração enzimática foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (concentração final de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) seguida de incubação das amostras durante 45 minutos a 37°C. Após esse período, 50  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (concentração final de 0,2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 200  $\mu\text{L}$  de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10% foram adicionados e as amostras incubadas a 55°C por 1 hora. Cabe ressaltar, que as soluções enzimáticas foram preparadas alguns minutos antes do início do procedimento analítico. Em seguida, cada amostra foi retirada do recipiente no qual foi realizada a extração enzimática e transferida com o auxílio de uma seringa para tubos Falcon estéreis de 15 mL.

O DNA foi então extraído duas vezes com igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (fenol: $\text{CHCl}_3$ :IAA) (25:24:1, pH 8). Após adição dessa solução, os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm. Em seguida, a fase aquosa foi recuperada, transferida para outro tubo Falcon estéril de 15 mL e o DNA extraído uma vez com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico ( $\text{CHCl}_3$ :IAA) (24:1). O material foi novamente homogeneizado e centrifugado. A fase aquosa foi recuperada, transferida para outro tubo Falcon estéril de 15 mL e o DNA precipitado pela adição de dois volumes de etanol 100% e 50  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 10 nM. As amostras foram homogeneizadas e mantidas a -20°C por 18 horas. Terminado esse período de tempo, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 4.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e 2 mL de etanol 70% adicionado. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o etanol evaporado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensão em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 nM, EDTA 0,1 mM, pH 8) e preservado a -22°C.

A extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) preparada em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Volumes de 4  $\mu\text{L}$  do DNA extraído foram marcados com 4  $\mu\text{L}$  de uma solução (1:4) contendo Sybr Green (Molecular Probes) e bromofenol com xilenocianol (bromofenol azul a 0,25% (w/v), xilenocianol a 0,25% (w/v), sucrose a 40% e água). Um plasmídeo de 3 Kb foi aplicado no gel de agarose e

utilizado como padrão. Um controle positivo foi obtido utilizando-se DNA de *Escherichia coli* em cultura. Após a corrida (aproximadamente 30 minutos a 96 mA e 83 V), o DNA extraído foi visualizado e a imagem do gel digitalizada (Storm Image Scanner).

#### 5.2.4.2 – Purificação do DNA ambiental

O DNA obtido foi purificado através de eletroforese em gel de agarose “Low Melt” a 1% (w/v) preparada em tampão TAE e contendo brometo de etídio na concentração final de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Após a corrida (como descrito no item 5.2.4.1), o gel foi visualizado em um transiluminador, as bandas cortadas com o auxílio de um estilete e transferidas para tubos Falcon estéreis de 15 mL. Em seguida, tampão de captura do kit de purificação da Amersham Biosciences (GFX PCR DNA and Gel Band Purification) foi adicionado ao tubo Falcon até se atingir um volume de 2 mL. O material foi homogeneizado em vórtex e aquecido durante 15 minutos a  $60^{\circ}\text{C}$ . Após completa dissolução da agarose, o DNA foi purificado com fenol: $\text{CHCl}_3$ :IAA (25:24:1, pH 8) (como descrito no item 5.2.4.1). Terminada a purificação, o DNA foi ressuspensão em  $100 \mu\text{L}$  de tampão TE e preservado a  $-22^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.2.4.3 – Amplificação do DNA bacteriano através de PCR

O DNA bacteriano foi amplificado através da técnica de PCR com o auxílio de iniciadores específicos para o gene 16S rDNA das eubactérias [27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) e 907R (5'-TTTGAGTTTCTTAACTGCC-3') (Weisburg *et al.*, 1998)] correspondentes, respectivamente, às posições 8 a 27 e 907 a 926 do gene 16S de *Escherichia coli* e para o gene *amoA* das bactérias oxidantes de amônia [*amoA*-1F (5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3') e *amoA*-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3')] (Rotthauwe *et al.*, 1997) correspondentes, respectivamente, às posições 332 a 349 e 802 a 822 do gene *amoA* de *Nitrosomonas europaea* (McTavish *et al.*, 1993). É interessante ressaltar que os iniciadores *amoA*-1F e *amoA*-2R são específicos para as bactérias oxidantes de amônia do grupo das Beta-Proteobacteria, não amplificando sequências gênicas das Gama-Proteobacteria (O'Mullan & Ward, 2005).

As reações de amplificação para eubactérias foram realizadas em  $50 \mu\text{L}$  de uma solução constituída por  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, desoxinucleotídeos trifosfato 0,2 mM,  $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de cada primer, 2,5U de *Taq* DNA polimerase (Promega), tampão de PCR (Promega) e 200ng de

DNA ambiental. Essa solução foi preparada dentro de tubos eppendorfs estéreis no início do procedimento analítico. A amplificação foi iniciada com a desnaturação do DNA a 94°C durante 5 minutos, seguida da etapa de anelamento (25 ciclos de 94°C a 90 segundos, 50°C a 90 segundos e 72°C a 2 minutos). O procedimento final de alongamento foi realizado a 72°C durante 5 minutos.

As amplificações do DNA das bactérias oxidantes de amônia também foram realizadas em tubos eppendorfs estéreis contendo 50µL de uma solução composta por MgSO<sub>4</sub> 50 mM, desoxinucleotídeos trifosfato 0,1 mM, 1 ng.µL<sup>-1</sup> de cada primer, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR (Invitrogen) e 200ng de DNA ambiental. Para esta reação, o programa utilizado foi de: desnaturação a 94°C por 3 minutos, 42 ciclos de anelamento (94°C a 1 minuto, 55°C a 1 minuto e 72°C a 50 segundos) e extensão do DNA a 72°C durante 10 minutos.

Controles positivos foram obtidos utilizando-se: DNA de *Escherichia coli* para as amostras de eubactérias e DNA de *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718D) para as amostras de nitrificantes. A cultura de *Nitrosomonas europaea* foi depositada na coleção de microrganismos de referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da FIOCRUZ. As amplificações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) preparada em tampão TAE (como descrito no item 5.2.4.1). Após a corrida, o gel foi visualizado em um Storm Image Scanner e as bandas digitalizadas.

#### **5.2.4.4 – Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos de PCR foram purificados através de eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) preparada em tampão TAE. Após a corrida (como descrito no item 5.2.4.1), o gel foi visualizado em um transiluminador, as bandas cortadas com o auxílio de um estilete e transferidas para tubos Falcon estéreis de 15 mL. Em seguida, o material foi eluído pela técnica de centrifugação utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification da Amersham Biosciences.

#### **5.2.4.5 – Obtenção de células competentes**

Estirpes de *Escherichia coli* DH10B foram crescidas durante 18-24 horas a 37°C em placa de Petri contendo ágar LB (1,5%) estéril e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina. Após esse período, uma colônia foi isolada e inoculada em 5 mL de meio LB líquido estéril contendo 10

mg.mL<sup>-1</sup> do antibiótico. Este pré-inóculo foi incubado a 37°C sob agitação constante por aproximadamente 16 horas. Em seguida, o material foi transferido para 500 mL de meio LB líquido e as bactérias incubadas a 37°C (2 horas sob agitação constante) até que uma D.O.<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0,5-0,6 fosse atingida. As células foram mantidas em gelo por um período de 10 a 15 minutos, transferidas para tubos Falcon de 50 mL e centrifugadas (5.000 rpm) durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o “pellet” ressuspense em 500 mL de água estéril gelada e o material centrifugado novamente. Este procedimento foi realizado 3 vezes. Terminada essa etapa, o “pellet” foi ressuspense em 10 mL de glicerol 10% gelado, transferido para outro tubo Falcon de 50 mL e centrifugado (10.000 rpm) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% gelado. Alíquotas de 50 µL foram transferidas para tubos eppendorfs estéreis e armazenadas a -70°C.

#### **5.2.4.6 – Ligação do inserto ao vetor de clonagem**

O vetor de clonagem utilizado para construção das bibliotecas 16S das eubactérias e *amoA* das bactérias oxidantes de

é comercializado a  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; e os produtos de PCR gerados com os oligonucleotídeos iniciadores 27F e 907R de eubactérias e *amoA*-1F e *amoA*-2R de oxidantes de amônia, têm respectivamente, 0,88 Kb e 0,491 Kb.

Após esse período, a solução foi transferida para membranas Millipore de  $0,025 \mu\text{m}$  de tamanho de poro e dialisada contra água Milli-Q estéril. Esse procedimento foi realizado dentro de uma placa de Petri, durante 1 hora à temperatura ambiente. Terminada a diálise, o material foi retirado do filtro, transferido para tubos eppendorfs estéreis e preservado a  $-22^\circ\text{C}$ .

#### **5.2.4.7 – Transformação e clonagem dos produtos de PCR**

Um volume de  $3 \mu\text{L}$  da ligação dialisada contra água Milli-Q estéril foi transferido para um tubo eppendorf contendo  $50 \mu\text{L}$  de células competentes (aproximadamente  $10^9$  células). Essa mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta, transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a uma voltagem de 1,8 Kv, capacitância de  $25 \mu\text{F}$  e resistência de 200 Ohms durante  $3,6 \mu\text{s}$ . Esse procedimento foi realizado dentro de um eletroporador Gene Pulser da BioRad. Imediatamente após a eletroporação,  $1 \text{ mL}$  de meio LB líquido foi transferido para dentro da cubeta. O material foi homogeneizado por pipetagem, transferido para um tubo Falcon estéril de  $15 \text{ mL}$  e as células transformadas, incubadas durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  sob agitação constante. Após esse período,  $300 \mu\text{L}$  de células transformadas foram plaqueadas em meio ágar LB a 1,5% contendo  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de ampicilina,  $30 \mu\text{L}$  de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo) a  $10 \text{ mM}$  e  $0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo). As células foram incubadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . O crescimento dos clones pôde ser realizado em meio contendo ampicilina pois o plasmídeo usado apresenta o gene *ampR* que confere resistência a esse antibiótico. Assim, apenas os clones contendo o plasmídeo puderam crescer nessas condições.

#### **5.2.4.8 - Seleção dos clones e construção das bibliotecas**

Como citado anteriormente, o DNA plasmidial pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector da Promega (kit pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems) foi utilizado como vetor de clonagem para a construção das bibliotecas 16S das eubactérias e *amoA* das bactérias oxidantes de amônia. Além de conferir resistência à ampicilina, este vetor ainda apresenta o gene *lacZ* da  $\beta$ -galactosidase, característica que facilita a identificação das bactérias contendo o plasmídeo recombinante de interesse. Quando os produtos de PCR são ligados ao vetor de clonagem, o gene da  $\beta$ -

galactosidase torna-se inativo, não expressando a enzima que catalisa a reação de hidrólise da galactose. Em consequência, as bactérias com o plasmídeo recombinante perdem a capacidade de degradar o X-Gal, formando colônias brancas nas placas com meio de cultura (Sambrook & Russell, 2001). Por sua vez, as bactérias que receberam plasmídeos sem produtos de PCR inseridos, continuam possuindo a capacidade de sintetizar a  $\beta$ -galactosidase e degradar X-Gal. Como resultado, essas células formam colônias azuis que podem ser facilmente separadas das colônias de interesse (Sambrook & Russell, 2001).

O crescimento dos clones foi realizado dentro de microplacas Cellstar estéreis (Greiner Bio-One, Ref. 650180) contendo 150  $\mu\text{L}$  de meio LB líquido com glicerol a 15% e 0,1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ampicilina. Cada colônia positiva foi transferida, com o auxílio de um palito de madeira estéril, para um dos 96 poços da microplaca. Terminado esse procedimento, as microplacas foram seladas e mantidas durante 24 horas a 37°C sob agitação constante. Após o crescimento bacteriano, as microplacas foram preservadas a -80°C.

#### **5.2.4.9 – Obtenção de DNA plasmidial**

As bibliotecas foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas. Colônias individuais foram inoculadas, com o auxílio de um replicador, em microplacas Cellstar estéreis (Greiner Bio-One) contendo 1 mL de meio CircleGrow e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ampicilina. As microplacas foram seladas com um adesivo e as bactérias crescidas durante 22 horas a 37°C sob agitação constante. Terminada essa etapa, as microplacas foram centrifugadas (4.000 rpm) por 10 minutos a 20°C. O adesivo foi retirado e o sobrenadante descartado. O excesso de meio de cultura foi removido pela inversão da placa sobre papel absorvente. A microplaca foi então mantida durante 18 horas a -20°C.

Após esse período, um volume de 240  $\mu\text{L}$  de GET (20% glicose anidra, EDTA 0,5 M pH 8, Tris-HCl pH 7,4) foi adicionado a cada poço. As microplacas foram homogeneizadas em vórtex durante 2 minutos para que as células pudessem ser ressuspensas. O material foi então centrifugado (4.000 rpm) por 9 minutos a 20°C, o sobrenadante descartado e a microplaca invertida em papel absorvente durante 5 minutos. Volumes iguais a 80  $\mu\text{L}$  de GET e 2,5  $\mu\text{L}$  de RNase a 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram adicionados em cada poço e as microplacas homogeneizadas em vórtex durante 2 minutos. As suspensões de células foram transferidas para microplacas estéreis de polipropileno. Volumes de 80  $\mu\text{L}$  de uma solução de lise constituída de NaOH 0,2 N e SDS 1% foram adicionados a cada poço. As microplacas foram

seladas, homogeneizadas por inversão, centrifugadas rapidamente a 2000 rpm e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Finalizada a incubação, 80 µL de acetato de potássio 3 M filtrado e gelado foram adicionados a cada poço. As microplacas foram novamente seladas, homogeneizadas por inversão e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado rapidamente a 4.000 rpm e mantido a -20°C durante 18 horas. As placas foram então descongeladas, centrifugadas rapidamente a 4.000 rpm e incubadas durante 30 minutos a 90°C. Após esse procedimento, as microplacas foram mantidas em gelo por 10 minutos e centrifugadas (4.000 rpm) a 20°C por 9 minutos.

O sobrenadante foi transferido para uma microplaca Millipore (MAGV N22), cuidadosamente fixada e alinhada com uma microplaca de polipropileno com fundo em “V”. O material foi centrifugado durante 6 minutos (4.000 rpm) a 20°C. Após centrifugação, a placa Millipore foi descartada e 100 µL de isopropanol gelado foi adicionado a cada um dos filtrados presentes nos poços da microplaca restante. Essa placa foi selada, homogeneizada por inversão, centrifugada a 2.000 rpm e o material incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado (4.000 rpm - 45 minutos) a 20°C, o sobrenadante descartado e 200 µL de etanol 70% gelado adicionado a cada um dos filtrados. As placas foram novamente centrifugadas a 4.000 rpm durante 5 minutos (20°C) e o sobrenadante descartado. Em seguida, as microplacas foram invertidas sobre papel absorvente, centrifugadas (9.000 rpm) a 20°C e deixadas a temperatura ambiente durante 60 minutos para secar. O DNA foi ressuspensão em 40 µL de água Milli-Q estéril durante 18 horas a temperatura ambiente. O material foi homogeneizado em vórtex e preservado a -20°C.

#### **5.2.4.10 – Sequenciamento gênico**

Os iniciadores 27F e *amoA*-1F foram, respectivamente, utilizados para o sequenciamento dos clones positivos das bibliotecas 16S de eubactérias e *amoA* das oxidantes de amônia presentes na BG. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit de sequenciamento “DYENamic dye-terminator cycle sequencing kit” (GE Healthcare) e as leituras feitas através de eletroforese por capilaridade em um sequenciador automático MegaBace 1000. Essa etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Genoma, do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob responsabilidade do Dr. Rodolpho Albano.

Os cromatogramas foram transformados em sequências de formato “fasta” através do programa Phred (Edwing *et al.*, 1998). As sequências de eubactérias e de bactérias oxidantes de amônia menores, respectivamente, que 300 e 100 pares de bases ( $\text{Phred} \leq 20$ ) foram removidas e não constaram nas análises. Em seguida, as sequências obtidas foram comparadas através de bioinformática com sequências depositadas no “Ribosomal Database Project II” (Cole *et al.*, 2003). Sequências quimeras foram identificadas e removidas com o auxílio do programa Check-Chimera (Cole *et al.*, 2003). Com auxílio do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), as sequências foram alinhadas e comparadas com sequências representativas de eubactérias e de bactérias oxidantes de amônia obtidas no “Ribosomal Database Project II” e no GeneBank “National Center for Bioinformatics and Information”. Apenas sequências parciais dos genes 16S rDNA e *amoA* foram adquiridas na BG.

#### **5.2.4.11 – Diversidade e análise filogenética**

As sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (“Operational Taxonomic Units – OTUs) a 97% de similaridade através do programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). A diversidade de eubactérias foi examinada usando análises de rarefação (Hulbert, 1971; Heck *et al.*, 1975). As árvores filogenéticas de eubactérias e de bactérias oxidantes de amônia foram construídas pelo algoritmo de neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) baseado na distância estimada e calculada pelo método de Kimura-2 (Kimura, 1980). A construção das árvores foi realizada pelo programa MEGA (Kumar *et al.*, 2001), versão 2.1, e as análises de “bootstrap” desenvolvidas com 1000 réplicas.

### **5.3 – Análise estatística**

As correlações existentes entre os dados físicos, químicos e biológicos obtidos ao longo dos “transects” foram determinadas através de uma matriz de correlação de Spearman utilizando o aplicativo *Statistica* 6.0 (Zar, 1999). Os dados foram transformados em escala logarítmica. As correlações foram consideradas significativas quando o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) foi alcançado. Os dados de diversidade bacteriana foram relacionados aos parâmetros bióticos e abióticos através de análise de correspondência (Zar, 1999).

Em relação às coletas mensais, médias, medianas, desvios padrão, coeficientes de variação, número de dados, e valores mínimos e máximos foram calculados para cada uma das variáveis analisadas. Através dessa estatística básica foi possível estabelecer as tendências

gerais dos parâmetros estudados e definir os padrões mais importantes. Os dados bióticos e abióticos foram transformados em log. As correlações existentes entre eles foram determinadas através de uma matriz de correlação de Spearman. As correlações foram consideradas significativas a 95% ( $p < 0,05$ ) de significância. Uma avaliação globalizada foi obtida através de análises de componentes principais (Légendre & Légendre, 1998).

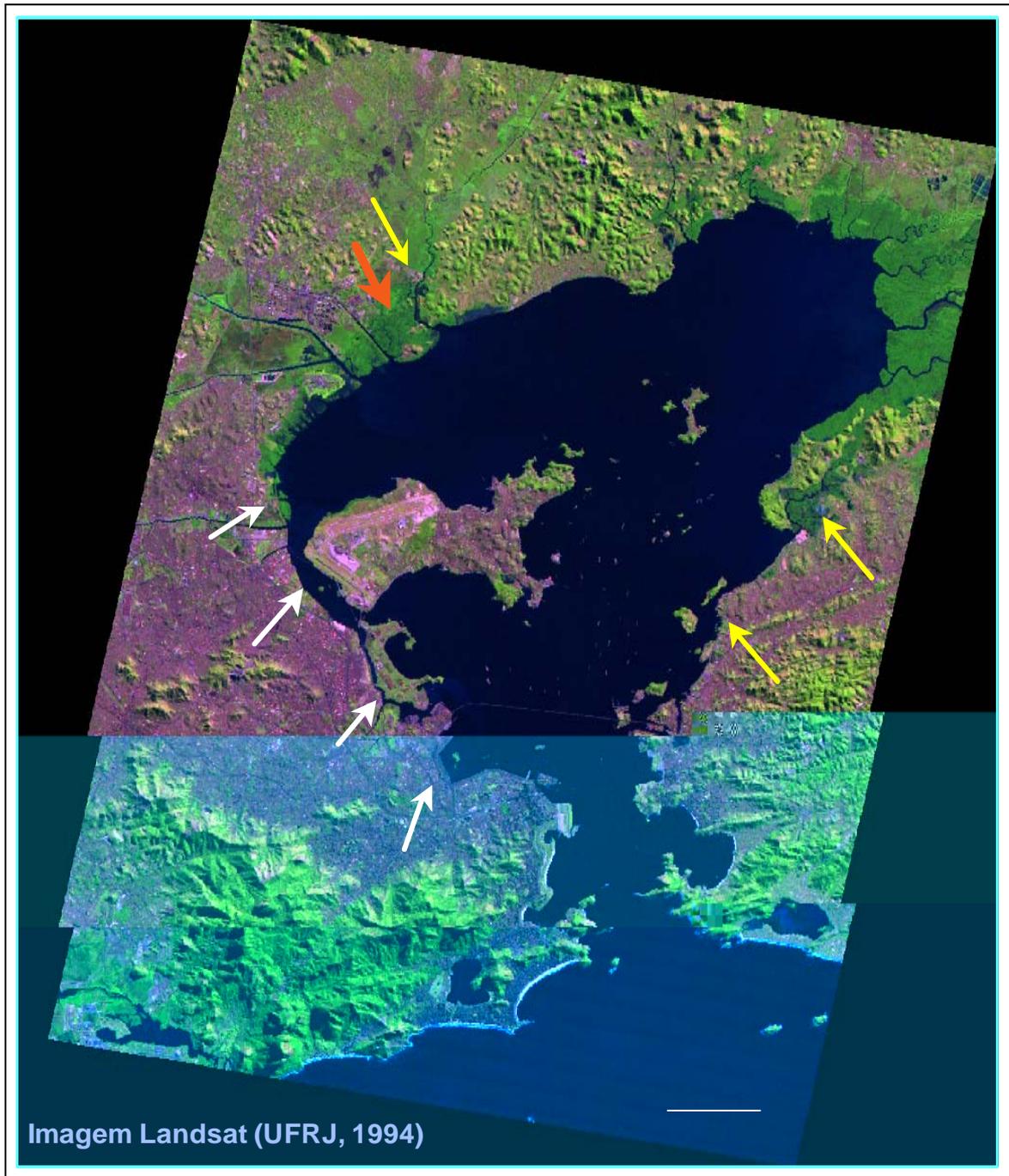


Figura 4: Mapa com as estações de coleta localizadas ao longo dos “transects” realizados na BG nos dias 10 de setembro de 2002 e 10 de julho de 2003.

## **6 – Resultados**

### **6.1 – Coletas ao longo dos “transects”**

#### **6.1.1 – Parâmetros físicos e químicos**

##### **6.1.1.1 – Temperatura da água**

Os dados de temperatura da água obtidos durante a campanha de 2002 estão apresentados na Figura 5a. Como é possível perceber, diferenças marcantes não foram observadas entre as áreas de estudo. Nesse dia de coleta, a temperatura da água registrada nas estações BI, B2, SD, IL, FB, 2K, 5K e 10K, foram respectivamente, iguais a 22,4, 21,88, 22,03, 21,9, 21,87, 21,8, 21,5 e 21,42°C. Os maiores e os menores valores foram encontrados, respectivamente, nas estações BI e 10K.

Na campanha realizada em 2003, não foram adquiridos dados desse parâmetro abiótico. No entanto, a temperatura da água coletada no canal da Maré no dia 13 de agosto de 2004 foi igual a 21°C.

##### **6.1.1.2 – Salinidade**

Os dados de salinidade obtidos na campanha realizada em setembro de 2002 não indicaram diferenças espaciais marcantes ao longo do gradiente estuarino (Figura 5b). Esse parâmetro atingiu o valor de 32,98, 33,89, 34,34, 33,91, 34,12, 33,82, 33,87 e 33,81 S, respectivamente, nas estações BI, B2, SD, IL, FB, 2K, 5K e 10K. Maiores e menores níveis de salinidade foram registrados, respectivamente, nas áreas denominadas SD e BI.

Por sua vez, na campanha de 2003 (Figura 5c), os maiores resultados de salinidade ocorreram na estação 5K (35,55 S), localizada no Oceano Atlântico a 5 Km de distância da entrada da baía. Os valores mais baixos foram obtidos no canal da Maré (11,38 S), área mais interna e de maior influência continental. Esse parâmetro abiótico ainda atingiu o valor de 33,11 S na estação BI, 31,53 S na B2, 35,53 S na SD, 34,66 S na IL, 35,39 S na FB, 35,43 S na 2K e 35,41 S na 10K. Como é possível perceber, os níveis mais elevados de salinidade foram registrados nas áreas próximas ao Oceano Atlântico.

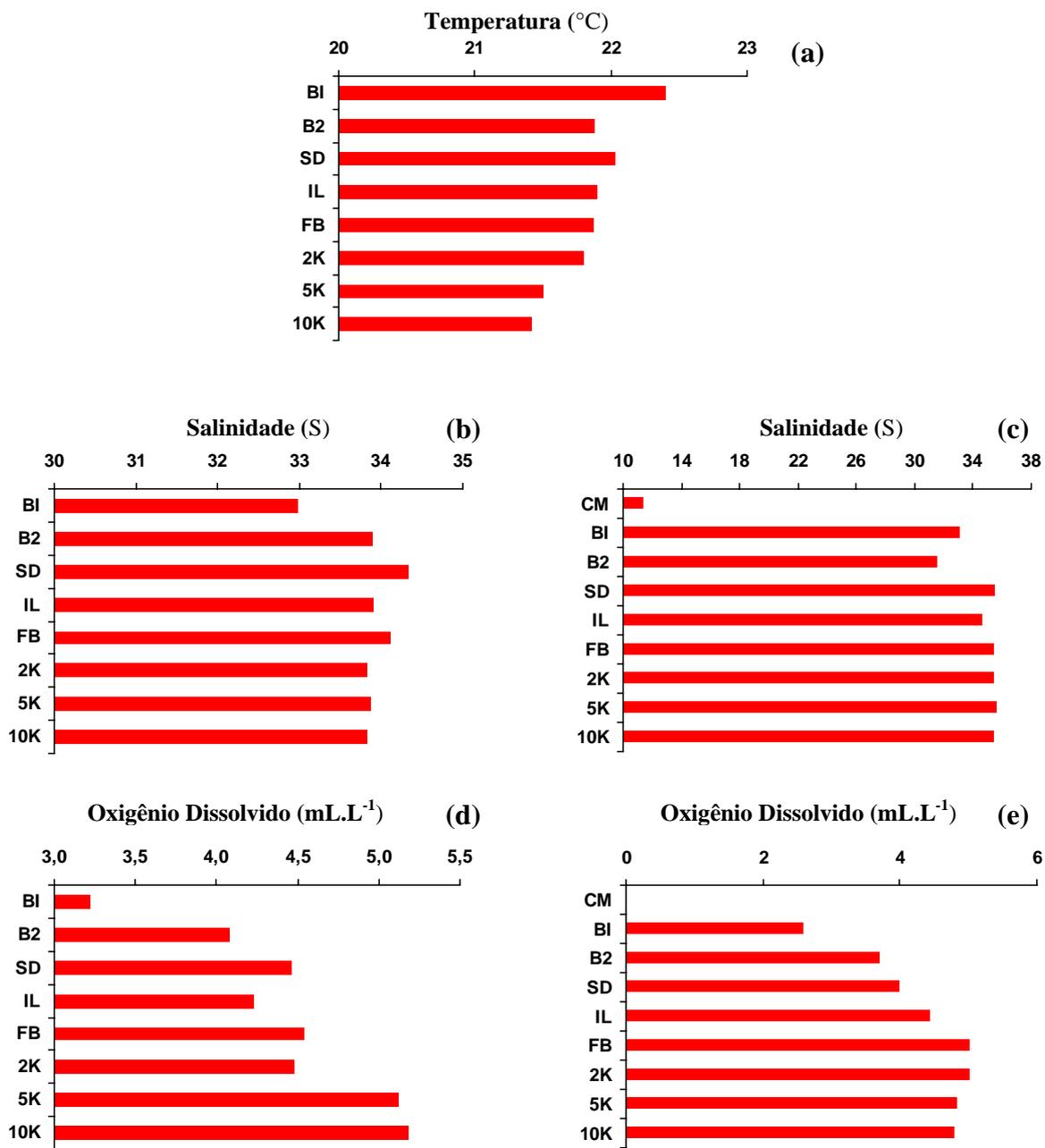


Figura 5: Resultados de temperatura da água (°C) (a), salinidade (S) (b, c) e oxigênio dissolvido (mL.L<sup>-1</sup>) (d, e) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (b, d) e 2003 (c, e), respectivamente.

### 6.1.1.3 – Oxigênio Dissolvido

Os resultados de oxigênio dissolvido obtidos em setembro de 2002 estão apresentados na Figura 5d. Uma tendência de acréscimo nas concentrações deste parâmetro foi verificada ao longo do “transect” à medida que as áreas de coleta se aproximavam do Oceano Atlântico.

Os valores mais elevados foram registrados na estação 10K (5,18 mL.L<sup>-1</sup>), situada a 10 Km de distância da entrada da baía. O oposto ocorreu na estação BI (3,22 mL.L<sup>-1</sup>), localizada mais internamente nesse ecossistema costeiro. Nas demais regiões estudadas, o oxigênio dissolvido atingiu níveis de 4,08 mL.L<sup>-1</sup> na estação B2, 4,46 mL.L<sup>-1</sup> na SD, 4,23 mL.L<sup>-1</sup> na IL, 4,54 mL.L<sup>-1</sup> na FB, 4,48 mL.L<sup>-1</sup> na 2K e 5,12 mL.L<sup>-1</sup> na 5K.

Na campanha realizada em 2003, os valores mais elevados de oxigênio dissolvido (5,02 mL.L<sup>-1</sup>) ocorreram nas estações FB e 2K (Figura 5e). O padrão oposto foi verificado no canal da Maré, que demonstrou condições totalmente anóxicas (0,00 mL.L<sup>-1</sup>) nesse dia de coleta. Nas outras áreas de estudo, o oxigênio da água alcançou teores de 2,58, 3,71, 3,99, 4,45, 4,84 e 4,79 mL.L<sup>-1</sup>, respectivamente, nas estações BI, B2, SD, IL, 5K e 10K. Concentrações mais elevadas desse parâmetro abiótico também foram registradas nas áreas próximas ao Oceano Atlântico.

#### **6.1.1.4 – Clorofila *a***

Na coleta realizada em 2002, os valores mais elevados de clorofila *a* foram registrados na estação BI (3,06 µg.L<sup>-1</sup>), localizada na parte mais interna da baía (Figura 6a). Menores concentrações de clorofila *a* foram observadas nas áreas próximas ao Oceano Atlântico. A estação 10K situada a 10 Km de distância da entrada da BG apresentou o valor mais reduzido de clorofila *a* (1,13 µg.L<sup>-1</sup>). Esse parâmetro ainda alcançou o valor de 1,82 µg.L<sup>-1</sup> na estação B2, 2,12 µg.L<sup>-1</sup> na SD, 2,6 µg.L<sup>-1</sup> na IL, 2,57 µg.L<sup>-1</sup> na FB, 1,6 µg.L<sup>-1</sup> na 2K e 1,28 µg.L<sup>-1</sup> na 5K.

Como indicado na Figura 6b, a estação B2 (6,81 µg.L<sup>-1</sup>) apresentou os níveis mais elevados de clorofila *a* obtidos durante a campanha de 2003. Com exceção desta área de coleta, os dados adquiridos ao longo do gradiente estuarino diminuiram à medida que as estações se aproximavam do Oceano Atlântico adjacente. As concentrações mais baixas desse parâmetro foram registradas na estação 10K (0,92 µg.L<sup>-1</sup>). Nas outras regiões, os valores de clorofila *a* foram iguais a 5,5 µg.L<sup>-1</sup> no canal da Maré, 5,47 µg.L<sup>-1</sup> na estação BI, 3,44 µg.L<sup>-1</sup> na SD, 2,56 µg.L<sup>-1</sup> na IL, 2,53 µg.L<sup>-1</sup> na FB, 1,88 µg.L<sup>-1</sup> na 2K e 0,45 µg.L<sup>-1</sup> na 5K.

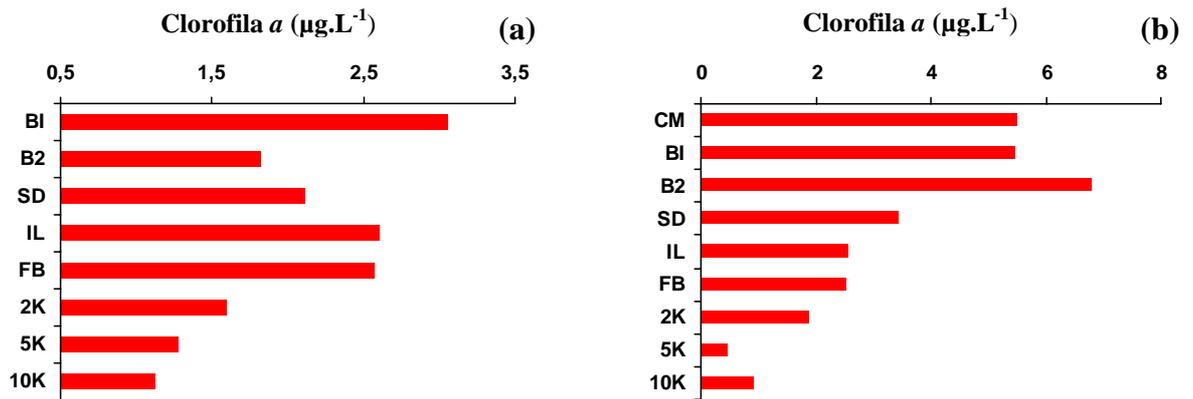


Figura 6: Resultados de clorofila  $a$  ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (a) e 2003 (b).

#### 6.1.1.5 – Material Particulado em Suspensão

Determinações do material particulado em suspensão na água não foram realizadas na coleta de 2002. Na campanha de 2003, os resultados desse parâmetro abiótico foram maiores nas áreas localizadas na porção mais interna da baía:  $36 \text{ mg.L}^{-1}$  no canal da Maré e  $47,57 \text{ mg.L}^{-1}$  na estação BI (Figura 7). Um decréscimo nos valores foi observado ao longo do “transect” à medida que as estações se aproximavam do Oceano Atlântico. Menores concentrações de material particulado em suspensão ocorreram nas regiões denominadas 5K ( $10,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 10K ( $11 \text{ mg.L}^{-1}$ ), situadas, respectivamente a 5 e 10 Km de distância da entrada da baía. Nas estações B2, SD, IL, FB e 2K, os níveis de material particulado em suspensão foram, respectivamente, iguais a 24,89, 22,9, 19,27, 11,93 e 11,09  $\text{mg.L}^{-1}$ .

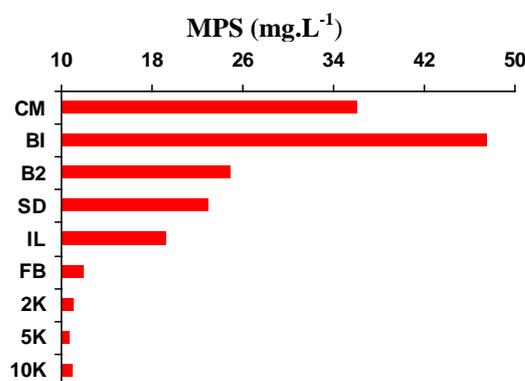


Figura 7: Resultados de MPS ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) obtidos ao longo do “transect” realizado em 2003.

#### **6.1.1.6 – Nitrogênio amoniacal**

Os resultados de nitrogênio amoniacal obtidos em 2002 estão apresentados na Figura 8a. Com exceção da estação IL (16,29  $\mu\text{M}$ ), os dados diminuíram ao longo do “transect” com a proximidade do oceano. Os maiores e os menores valores ocorreram, respectivamente, nas estações BI (42,75  $\mu\text{M}$ ) e na 10K (0,1  $\mu\text{M}$ ). Esse nutriente inorgânico alcançou 10,47, 7,58, 5,1, 4,22 e 0,18  $\mu\text{M}$  nos pontos B2, SD, FB, 2K e 5K, respectivamente. Um gradiente decrescente em direção ao oceano também foi observado em 2003 (Figura 8b). Os teores mais elevados ocorreram no canal da Maré (96,46  $\mu\text{M}$ ) e os menores na 10K (<0,05  $\mu\text{M}$ ). Nas estações BI, B2, SD, IL, FB, 2K e 5K os valores de nitrogênio amoniacal foram iguais a 37,15, 26,81, 6,2, 5,3, 2,26, 1,97 e 0,15  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

#### **6.1.1.7 – Nitrito**

Na coleta de 2002, os maiores valores de nitrito foram encontrados nas estações BI (3,05  $\mu\text{M}$ ) e B2 (1,15  $\mu\text{M}$ ) (Figura 8c). As menores concentrações ocorreram nos pontos de coleta situados no Oceano Atlântico: 0,06  $\mu\text{M}$  na 5K e 0,08  $\mu\text{M}$  na 10K. Nas regiões denominadas SD, IL, FB e 2K, os dados foram iguais a 0,88, 0,9, 0,75 e 0,66  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Em 2003, os teores mais elevados de nitrito também ocorreram nas áreas mais internas da baía (Figura 8d). Os maiores e os menores valores foram registrados, respectivamente, nas estações BI (2,89  $\mu\text{M}$ ) e 2K (0,03  $\mu\text{M}$ ). Esse nutriente inorgânico ainda alcançou 2,66, 2,74, 0,64, 0,71, 0,25, 0,06 e 0,07  $\mu\text{M}$ , no canal da Maré e nas estações B2, SD, IL, FB, 5K e 10K, respectivamente.

#### **6.1.1.8 – Nitrato**

Na campanha de 2002 (Figura 8e), os maiores (1,73  $\mu\text{M}$ ) valores de nitrato ocorreram nas estações FB e 2K, e os menores na 5K (1,33  $\mu\text{M}$ ). Nas outras regiões, as concentrações foram iguais a 1,58, 1,65, 1,36, 1,49 e 1,42  $\mu\text{M}$ , respectivamente, nas estações BI, B2, SD, IL e 10K. Em 2003, os níveis de nitrato foram iguais a 0,05, 0,59, 0,96, 1,36, 0,81, 1,07, 1,21, 1,21 e 1,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, nos pontos de coleta situados ao longo do gradiente estuarino (Figura 8f). Esse nutriente inorgânico apresentou suas menores concentrações nas áreas mais internas da baía. O oposto foi verificado nas regiões próximas ao Oceano Atlântico que apresentaram os níveis mais elevados desse composto.

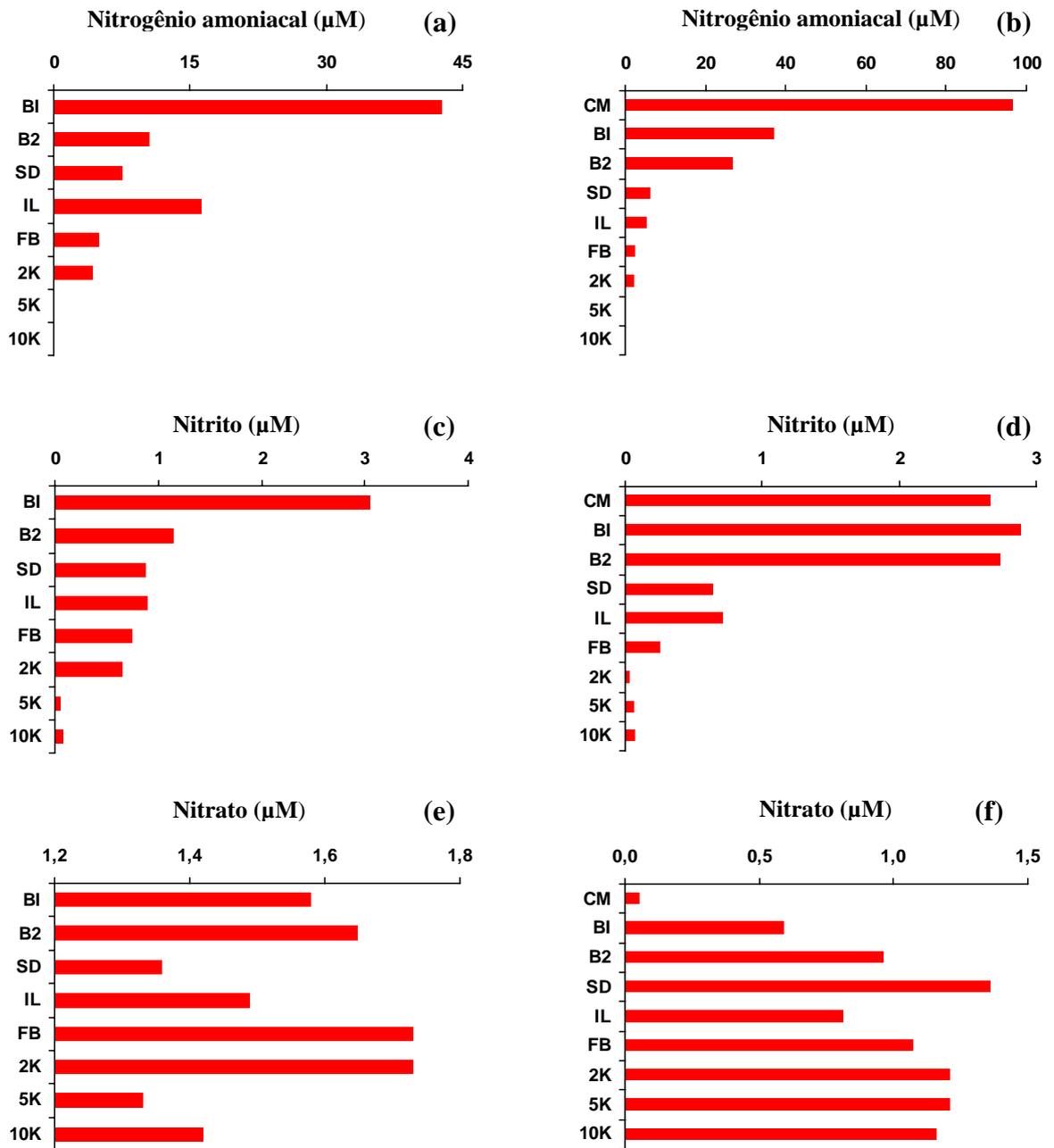


Figura 8: Resultados de nitrogênio amoniacoal ( $\mu\text{M}$ ) (a, b), nitrito ( $\mu\text{M}$ ) (c, d) e nitrato ( $\mu\text{M}$ ) (e, f) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (a, c, e) e 2003 (b, d, f), respectivamente.

#### 6.1.1.9 – Ortofosfato

Na campanha realizada no ano de 2002 os maiores resultados de ortofosfato foram encontrados na estação BI ( $3,58 \mu\text{M}$ ) e os menores na 10K ( $0,37 \mu\text{M}$ ) (Figura 9a). É possível

perceber uma tendência de decréscimo dos valores ao longo do gradiente estuarino na direção do Oceano Atlântico. Nas estações B2, SD, IL, FB, 2K e 5K os teores de ortofosfato foram, respectivamente, iguais a 1,34, 1,12, 1,27, 1,05, 0,92 e 0,42  $\mu\text{M}$ .

Na coleta realizada em 2003, os resultados mais elevados também ocorreram nas regiões mais internas da baía: 34,05  $\mu\text{M}$  no canal da Maré (Figura 9b). Um padrão de diminuição dos valores em direção às águas costeiras também foi observado, com as menores concentrações sendo registradas na estação 5K (0,22  $\mu\text{M}$ ). Nos outros locais de coleta, os níveis de ortofosfato foram iguais a 4,74  $\mu\text{M}$  na estação BI, 2,93  $\mu\text{M}$  na B2, 0,93  $\mu\text{M}$  na SD, 0,92  $\mu\text{M}$  na IL, 0,5  $\mu\text{M}$  na FB e na 2K e 0,3  $\mu\text{M}$  na 10K.

#### **6.1.1.10 – Fósforo total**

Os dados de fósforo total obtidos durante a campanha de 2002 foram maiores na estação BI (4,62  $\mu\text{M}$ ) e menores na 5K (0,67  $\mu\text{M}$ ) (Figura 9c). Nas regiões de coleta denominadas B2, SD, IL, FB, 2K e 10K esse nutriente atingiu níveis iguais a 2,01, 1,65, 1,76, 1,41, 1,34 e 0,72  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Uma tendência de decréscimo na direção do oceano também foi verificada para os teores de fósforo total.

Na coleta realizada em 2003, os maiores resultados foram encontrados no canal da Maré (36,95  $\mu\text{M}$ ) e os menores nas áreas externas à baía: 0,36  $\mu\text{M}$  na estação 5K e 0,48  $\mu\text{M}$  na 10K (Figura 9d). Um acentuado decréscimo nos dados de fósforo total ao longo do gradiente estuarino também foi observado. Nas outras áreas estudadas, os resultados foram iguais a 6,22  $\mu\text{M}$  na BI, 3,99  $\mu\text{M}$  na B2, 1,22  $\mu\text{M}$  na SD, 1,47  $\mu\text{M}$  na IL, 0,82  $\mu\text{M}$  na FB e 0,77  $\mu\text{M}$  na 2K.

#### **6.1.1.11 – Silicato**

Em 2002, os maiores e os menores teores de silicato foram obtidos nas estações BI (16,13  $\mu\text{M}$ ) e FB (3,41  $\mu\text{M}$ ), respectivamente (Figura 9e). Nos pontos de coleta B2, SD, IL, 2K, 5K e 10K esse parâmetro abiótico alcançou 9,79, 9,77, 10,23, 8,34, 11,71 e 4,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Na campanha de 2003, os níveis mais elevados de silicato também foram registrados nas regiões mais internas da baía, principalmente no canal da Maré (50,81  $\mu\text{M}$ ) (Figura 9f). Nos pontos BI e B2, os valores foram, respectivamente, iguais a 25,12 e 21,71  $\mu\text{M}$ . Por sua vez, as menores concentrações de silicato ocorreram nos locais sob maior influência oceânica,

especialmente na estação 5K (2,99  $\mu\text{M}$ ). Nas outras áreas de coleta os teores de silicato na água foram de 7,34  $\mu\text{M}$  na estação SD, 8,22  $\mu\text{M}$  na IL, 4,67  $\mu\text{M}$  na FB, 5,03  $\mu\text{M}$  na 2K e 4,29  $\mu\text{M}$  na 10K.

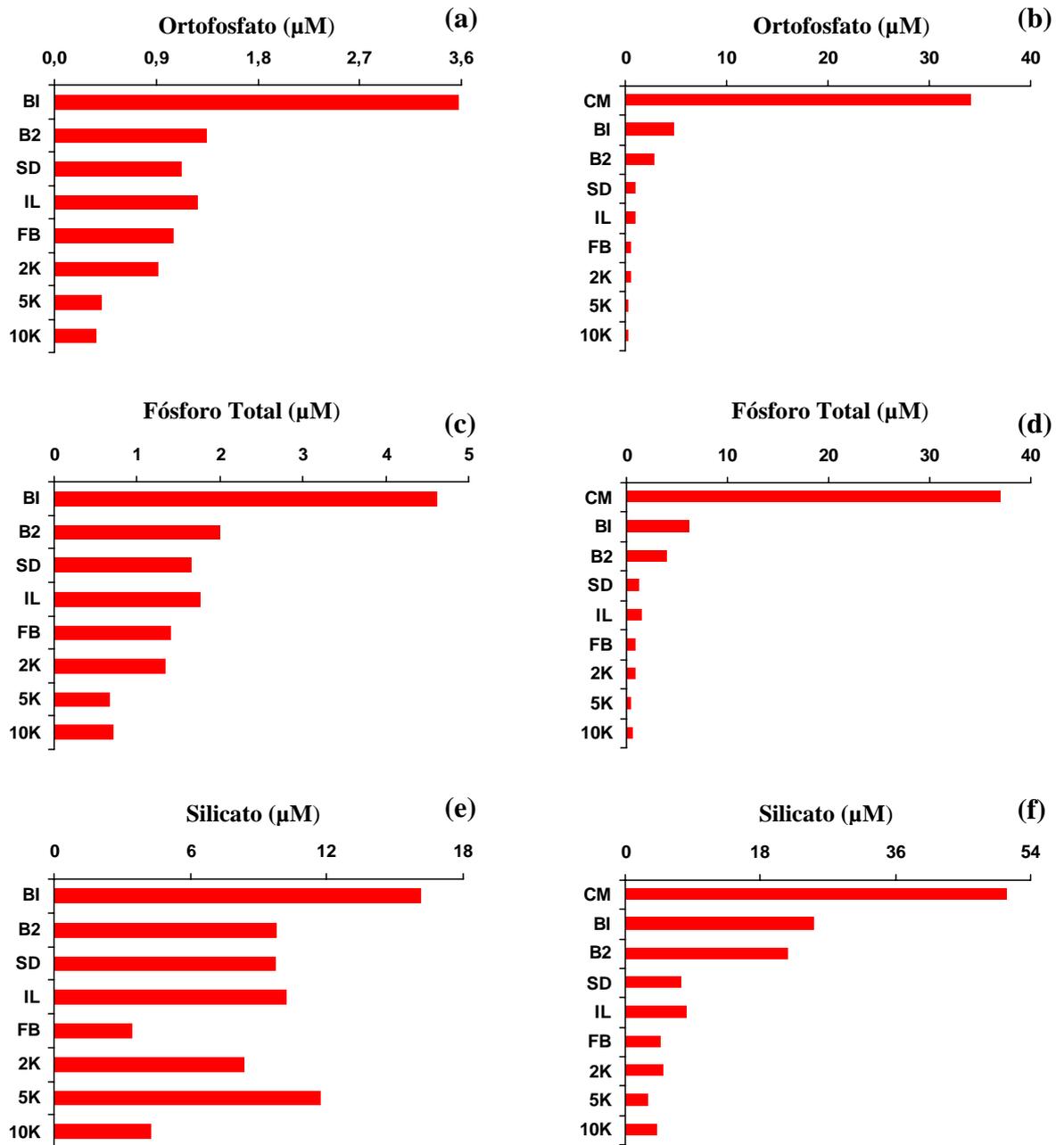


Figura 9: Resultados de ortofosfato ( $\mu\text{M}$ ) (a, b), fósforo total ( $\mu\text{M}$ ) (c, d) e silicato ( $\mu\text{M}$ ) (e, f) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (a, c, e) e 2003 (b, d, f), respectivamente.

## 6.1.2 – Parâmetros microbiológicos

### 6.1.2.1 – Abundância de bactérias totais

Na campanha realizada em 2002, a abundância de bactérias totais variou entre  $1,05 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> na estação 5K e  $2,34 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na BI (Figura 10a). Maiores e menores concentrações foram encontradas, respectivamente, nas áreas mais internas da baía e nas estações localizadas no Oceano Atlântico adjacente. Nos pontos B2, SD, IL, FB, 2K e 10K, esse parâmetro microbiológico atingiu os valores de  $1,24 \times 10^6$ ,  $5,98 \times 10^5$ ,  $1,16 \times 10^6$ ,  $7,29 \times 10^5$ ,  $5,96 \times 10^5$  e  $1,31 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Através dos resultados foi possível perceber que a estação 2K, situada a 2 Km de distância da entrada da baía ainda é fortemente influenciada pelas águas provenientes desse ecossistema costeiro.

No “transect” realizado em 2003, um gradiente de decréscimo nas contagens de bactérias totais foi observado ao longo do “transect” (Figura 10b). Os maiores valores foram obtidos no canal da Maré ( $2,11 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>) e na estação BI ( $2,86 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>). Os menores resultados foram encontrados no ponto 5K ( $3,1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>). Nas outras regiões de coleta, as contagens de bactérias totais foram iguais a  $8,72 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na estação B2,  $1,58 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na SD,  $9,24 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> na IL,  $7,02 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> na FB e  $6,94 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> na 2K. Através dos resultados obtidos durante essa coleta também foi possível verificar a grande influência das águas da BG no ponto 2K. Cabe ressaltar que dados de bactérias totais não foram adquiridos na estação 10K nesse dia de coleta em virtude da amostra ter sido perdida.

### 6.1.2.2 – Abundância de bactérias HNA

Com exceção da estação SD ( $3,76 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), as contagens de bactérias HNA diminuíram ao longo do “transect” realizado em 2002 à medida que as áreas de coleta se aproximavam do Oceano Atlântico (Figura 10c). Maiores e menores abundâncias foram encontradas, respectivamente, no ponto BI ( $2,1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) e no 10K ( $8,22 \times 10^3$  células.mL<sup>-1</sup>). Nas estações B2, IL, FB, 2K e 5K, os resultados foram, respectivamente, iguais a  $9,99 \times 10^5$ ,  $9,34 \times 10^5$ ,  $5,25 \times 10^5$ ,  $4,21 \times 10^5$  e  $5,63 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>. A influência das águas da BG na estação 2K também foi demonstrada pelos dados de bactérias HNA.

Na campanha de 2003, as maiores abundâncias de bactérias HNA foram encontradas nas áreas mais internas da baía: canal da Maré ( $1,76 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), BI ( $1,74 \times 10^7$

células.mL<sup>-1</sup>) e B2 (5x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) (Figura 10d). Os menores valores ocorreram na estação 5K (4,31x10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>). Um decréscimo nas contagens de HNA foi observado ao longo do gradiente estuarino. Valores iguais a 9,07x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> foram registrados na estação SD, 4,34x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na IL, 2,08x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na FB e 2,16x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> 2K. Os resultados de HNA também revelaram a forte influência das águas da BG na estação 2K. Análises não foram realizadas no ponto de coleta 10K devido à perda da amostra.

### 6.1.2.3 – Abundância de bactérias LNA

Na campanha realizada no ano de 2002, a abundância de bactérias LNA variou entre 4,88x10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup> na estação 5K e 2,45x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na BI (Figura 10e). Uma tendência de decréscimo nos dados foi observada ao longo do gradiente estuarino com a proximidade das estações em relação ao Oceano Atlântico. Nos pontos denominados B2, SD, IL, FB, 2K e 10K, os valores de bactérias LNA foram iguais a 2,4x10<sup>5</sup>, 2,22x10<sup>5</sup>, 2,29x10<sup>5</sup>, 2,04x10<sup>5</sup>, 1,75x10<sup>5</sup> e 1,23x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Em 2003 (Figura 10f), as maiores contagens de bactérias LNA foram obtidas no canal da Maré (3,5x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e nas estações BI (1,12x10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e B2 (3,72x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>). Os menores valores foram encontrados no ponto 5K: 2,67x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Nos outros locais de coleta, as abundâncias de células LNA foram iguais a 6,71x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na estação SD, 4,89x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na IL, 4,94x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na FB e 4,79x10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> na 2K. Uma tendência de decréscimo ao longo do “transect” também foi observada. Nesse ano não foram realizadas contagens de LNA no ponto 10K.

### 6.1.2.4 – Percentuais de bactérias HNA

Os percentuais de bactérias HNA diminuíram ao longo do “transect” realizado em 2002 à medida que as estações se aproximavam do Oceano Atlântico (Figura 11a). Esse padrão de distribuição não foi observado apenas para o ponto de coleta denominado SD, que apresentou 62,8% de células HNA. Esse parâmetro microbiológico atingiu 89,5% no ponto BI, 80,6% no B2, 80,3% no IL, 72,0% no FB, 70,7% no 2K, 53,6% no 5K e 6,2% no 10K. Os maiores e os menores percentuais ocorreram, respectivamente, nas áreas mais internas e mais externas à baía.

Na campanha realizada no ano de 2003, os percentuais também diminuíram ao longo da baía em direção às águas costeiras (Figura 11b). Os maiores percentuais foram observados

na estação localizada no canal da Maré (83,4%), a área mais interna e hipereutrofizada da baía. Nos outros pontos de coleta, as células HNA corresponderam a 60,7, 57,3, 57,4, 47, 29,6, 31 e 13,8% das bactérias totais encontradas, respectivamente, nos locais BI, B2, SD, IL, FB, 2K e 5K. Maiores e menores resultados também foram observados, respectivamente, nas regiões mais internas e mais externas da baía. Como citado anteriormente, dados de HNA não foram obtidos na estação 10K.

#### **6.1.2.5 – Percentuais de bactérias LNA**

No ano de 2002, um gradiente crescente nos percentuais de bactérias LNA foi observado desde as regiões mais internas da baía, sob maior influência de águas conti,514O.16gt1.6510.4

$\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Esse parâmetro microbiológico ainda atingiu  $0,91 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no ponto BI,  $0,6 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no SD,  $0,4 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no IL,  $0,21 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no FB,  $0,2 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no 2K e  $0,05 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  no 10K. A influência da baía na estação 2K também foi observada nesse dia de coleta.

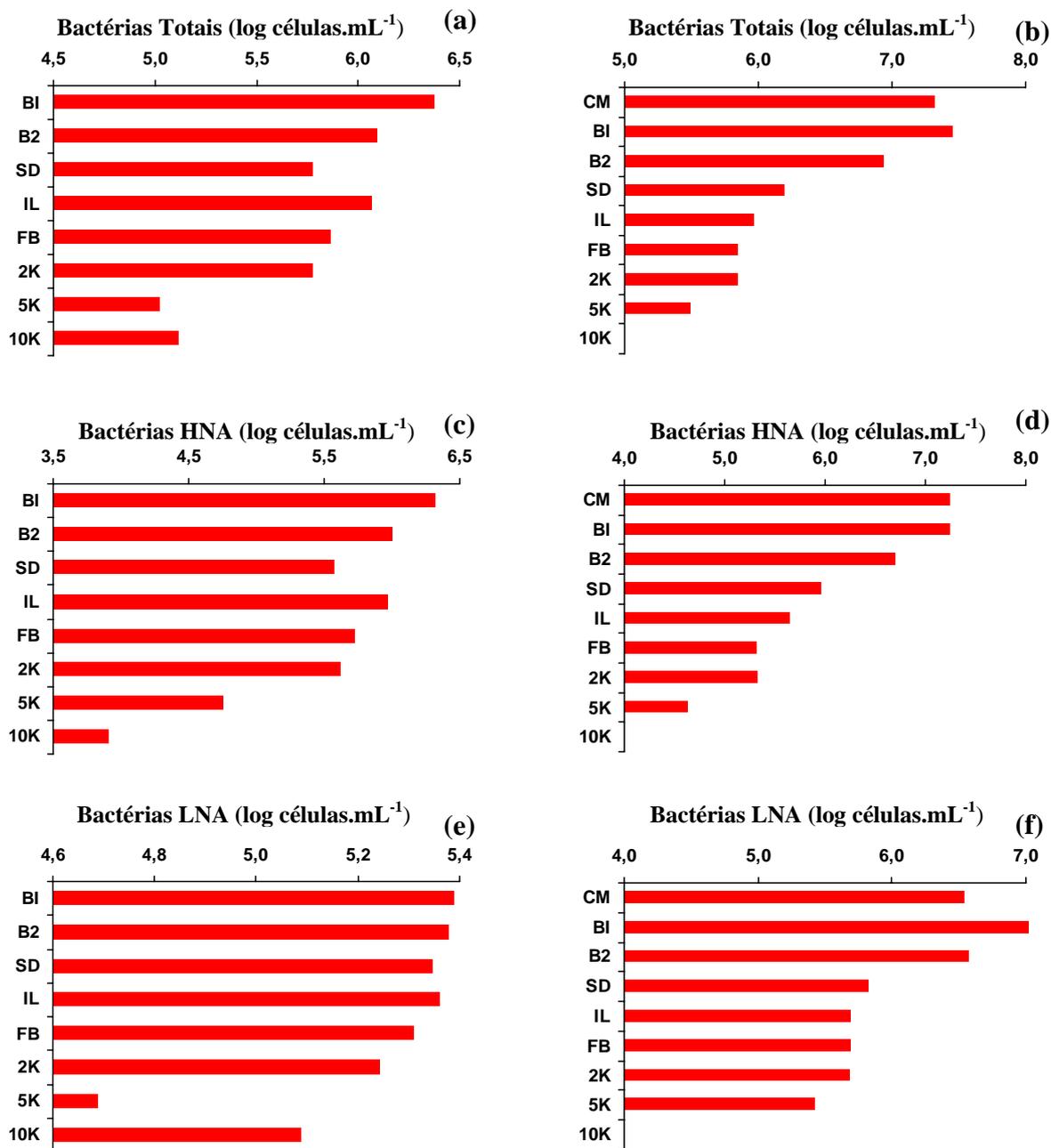


Figura 10: Resultados de abundância de bactérias totais (log células.mL<sup>-1</sup>) (a, b), HNA (log células.mL<sup>-1</sup>) (c, d) e LNA (log células.mL<sup>-1</sup>) (e, f) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (a, c, e) e 2003 (b, d, f), respectivamente.

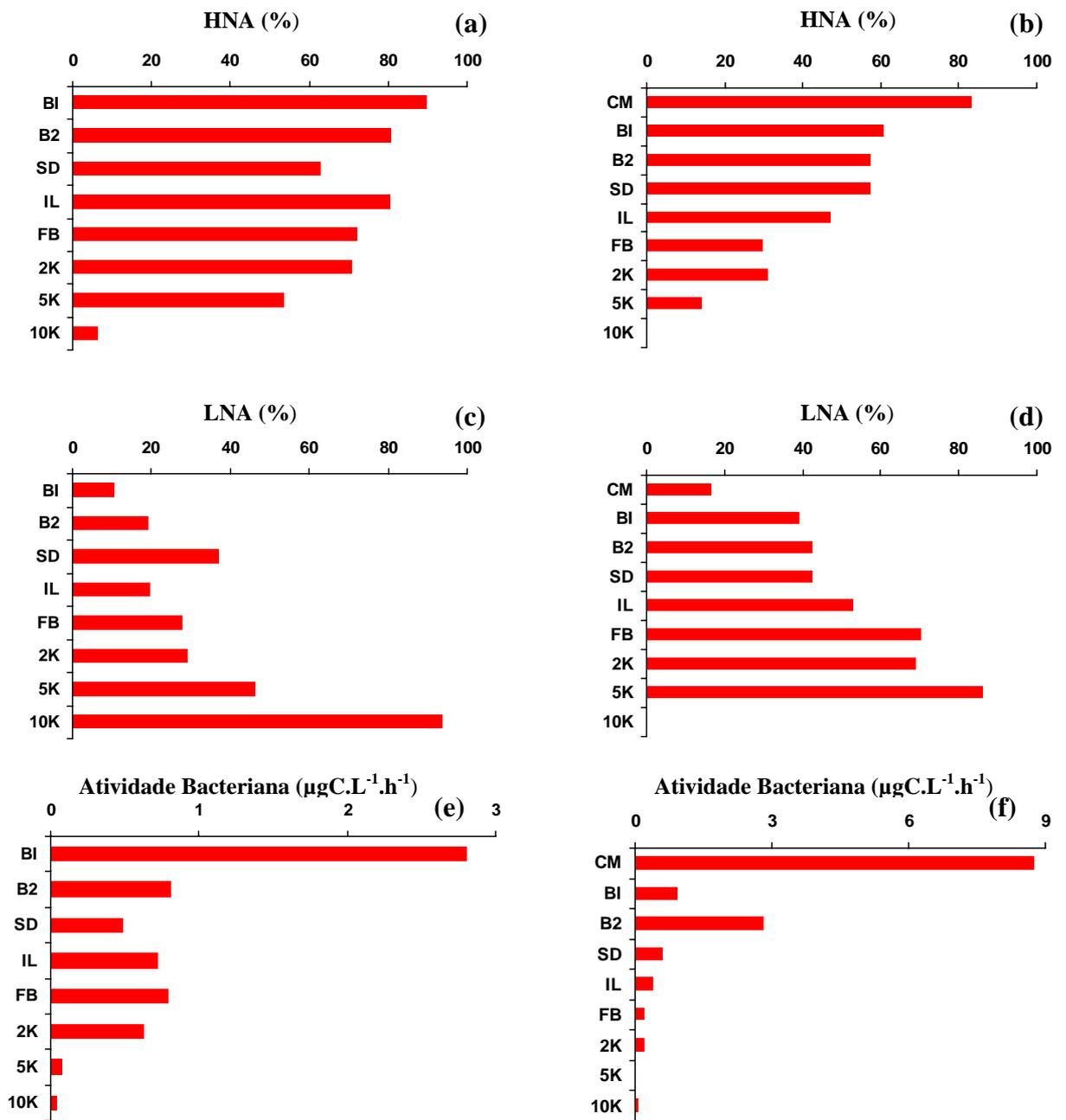


Figura 11: Percentuais de bactérias HNA (%) (a, b) e LNA (%) (c, d) e resultados de atividade bacteriana ( $\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (e, f) obtidos ao longo dos “transects” realizados em 2002 (a, c, e) e 2003 (b, d, f), respectivamente.

### 6.1.2.7 – Diversidade bacteriana

#### 6.1.2.7.1 – Extração do DNA ambiental

A extração e a qualidade dos DNAs obtidos a partir das amostras de água coletadas ao longo do “transect” realizado no ano de 2003 foram verificadas em um gel de agarose 1% (w/v) (Figura 12). É possível perceber que DNA genômico de boa qualidade (fragmentado, porém com poucas quebras) foi encontrado em todas as estações de coleta. O aparecimento de bandas únicas de DNA no gel de agarose indica que o procedimento de extração foi adequado, gerando poucos produtos de degradação de ácidos nucleicos.

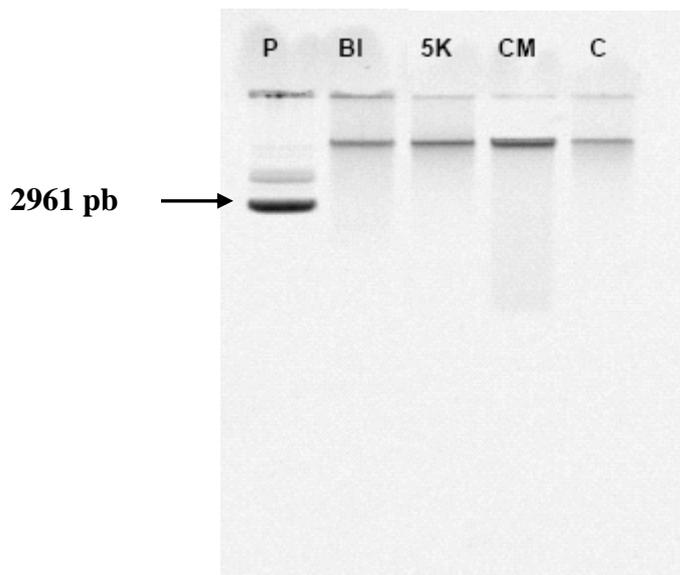


Figura 12: Gel de agarose com o DNA extraído das amostras coletadas ao longo do “transect” realizado na BG no ano de 2003. Plasmídeo padrão Pblue Script (P), estações de coleta (BI, 5K e CM) e controle (C) – *Escherichia coli* em cultura.

#### 6.1.2.7.2 – Amplificação do DNA bacteriano

A amplificação do DNA das eubactérias foi confirmada em um gel de agarose 1% (w/v) (Figura 13). É possível perceber que produtos de PCR de tamanho adequado (880 pares

de bases) foram obtidos em todas as estações de coleta a partir das reações realizadas com os iniciadores 97f e 907r.

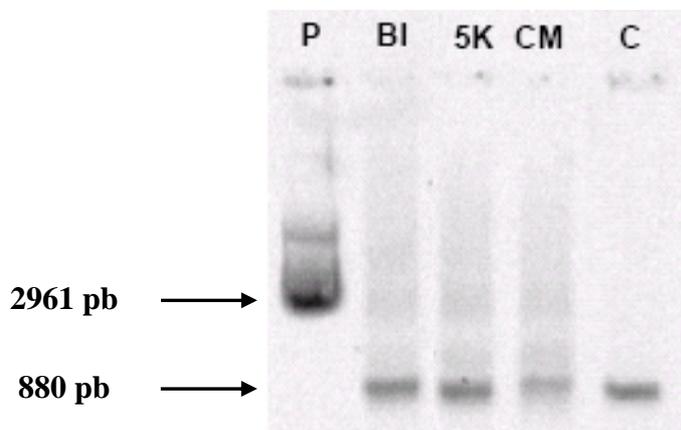


Figura 13: Gel de agarose com os produtos de PCR obtidos a partir dos DNAs extraídos das amostras coletadas na BG durante o “transect” realizado no ano de 2003. Plasmídeo padrão Pblue Script (P), estações de coleta (BI, 5K e CM) e controle (C) – *Escherichia coli* em cultura.

#### 6.1.2.7.3 – Biblioteca genômica do 16S rRNA

A biblioteca 16S rRNA (Figura 15) e as análises de rarefação (Figura 14) foram construídas a partir das 81, 137 e 156 sequências obtidas, respectivamente, no canal da Maré e nas estações BI e 5K. As sequências foram agrupadas a 97% de similaridade dentro de distintas OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais - do inglês “Operational Taxonomic Units”) segundo suas filiações com o domínio Eubacteria.

Através das análises filogenéticas foi possível perceber que comunidades bacterianas específicas ocorreram em cada uma das regiões estudadas (Tabela 1). No canal da Maré houve o predomínio de bactérias do grupo das Firmicutes (22,22%) e das *Cytophaga* (17,28%). Muitas sequências relacionadas a microrganismos patogênicos, tais como *Staphylococcus* sp. e *Bacteroides* sp. foram encontradas nessa região. Oito clones pertencentes ao grupo das Bacteroidetes se relacionaram com sequências não identificadas. Da mesma forma, 4,94% das sequências de bactérias presentes nessa estação também não foram classificadas.

Na estação BI os grupos dominantes foram as alfa (29,2%), as gama (31,39%) e as epsilon-Proteobactérias (16,79%). *Bacteroides* não foram encontrados no ponto BI. Apesar disso, uma grande quantidade de filotipos potencialmente associados à degradação de petróleo foi identificada. Isso foi evidenciado pela forte relação existente entre as sequências desses filotipos e as bactérias *Neptunomonas naphthovorans* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Bactérias do grupo das alfa-Proteobactérias também predominaram na estação 5K, representando 52,56% das seqüências totais obtidas nessa região. Os maiores percentuais de *Prochlorococcus* (1,92%) foram encontrados nesse local de estudo. Planctomycetes, *Synechococcus* e Verrucomicrobia ocorreram apenas nessa estação. Por sua vez, bactérias do grupo dos *Bacteroides*, epsilon- e beta-Proteobactérias não foram observados.

Apesar das diferenças existentes entre os 3 pontos de coleta, muitos microorganismos cosmopolitas foram encontrados ao longo do gradiente estuarino. Por exemplo, seqüências relacionadas às bactérias *Pelagibacter ubique* e *Cytophaga fucicola* foram bastante abundantes e detectadas em todas as áreas de estudo.

As análises de rarefação indicaram que as bibliotecas 16S rRNA não foram suficientes para demonstrar a diversidade total de eubactérias presentes em cada uma das estações de coleta. As curvas não alcançaram um platô indicando que um número maior de clones deve ser sequenciado a fim de se determinar a diversidade total de cada um desses ambientes. O mesmo padrão foi verificado quando as três bibliotecas foram analisadas em conjunto. Tais resultados indicaram que a diversidade de eubactérias da BG é muito maior do que aquela apresentada nesse estudo. De qualquer maneira, foi possível constatar que a riqueza bacteriana presente nas estações BI e 5K (10 OTUs) é maior do que aquela encontrada no canal da Maré (9 OTUs).

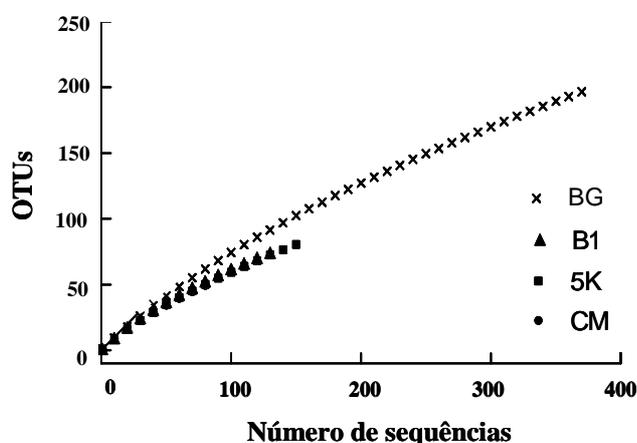
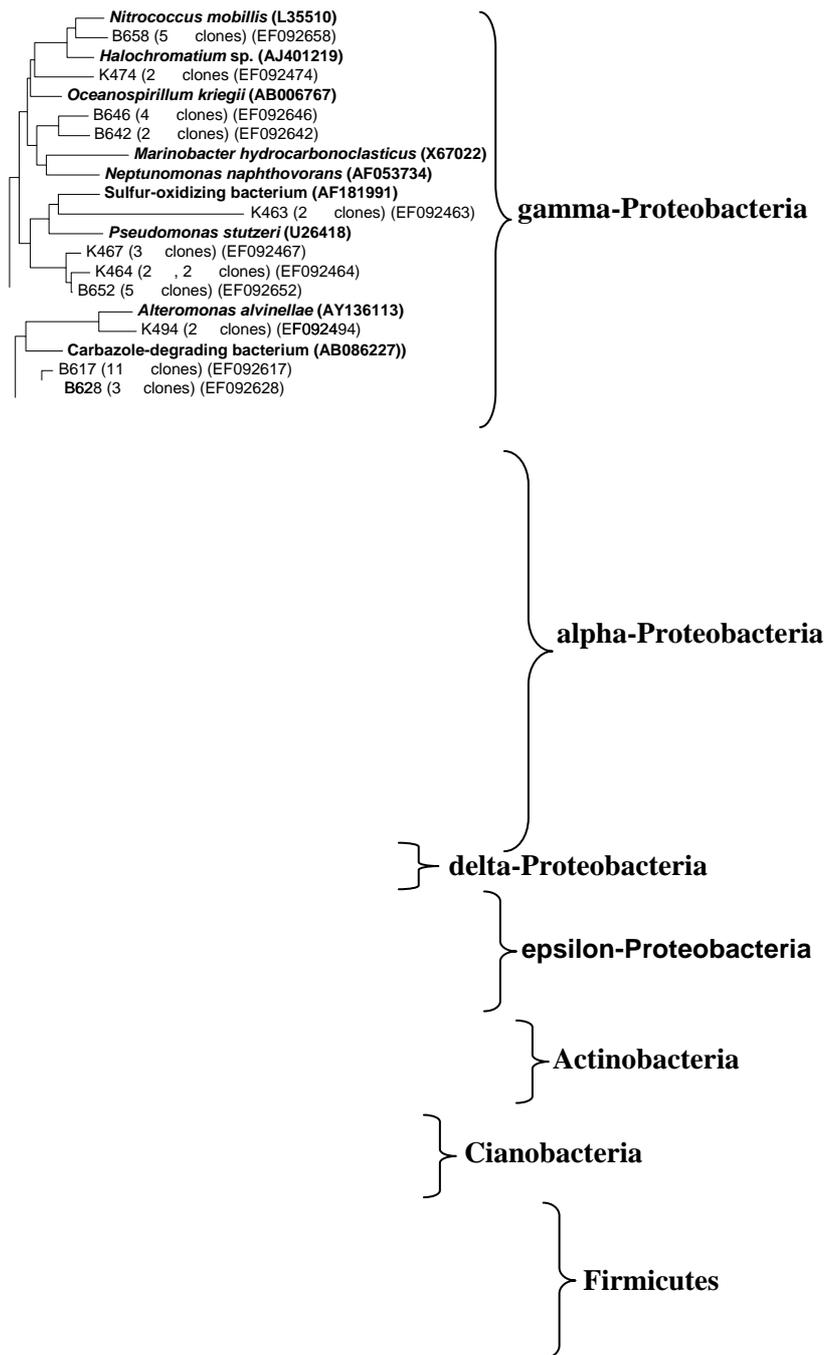


Figura 14: Curvas de rarefação comparando as bibliotecas 16S rRNA obtidas no canal da Maré (•) e nas estações BI (▲) e 5K (■). Somatório de todas as seqüências (x).



*Cytophaga*  
*Flavobacteria*  
*Bacteroides*

Figura 15: Relações filogenéticas obtidas entre as seqüências 16S de eubactérias presentes no canal da Maré ( ) e nas estações BI ( ) e 5K ( ). As seqüências adquiridas no GenBank estão em negrito. As análises de “bootstrap” foram realizadas com 1000 réplicas.

Tabela 1: Número de seqüências (N) e percentuais de ocorrência (%) dos diferentes grupos bacterianos encontrados no canal da Maré (CM) e nas estações BI e 5K durante a campanha realizada ao longo do “transect” no ano de 2003.

Grupos	CM		BI		5K	
	N	%	N	%	N	%
Bacterianos						
$\alpha$ -Proteobacteria	8	9,88	40	29,2	82	52,56
$\beta$ -Proteobacteria	0	0	3	2,19	0	0
$\gamma$ -Proteobacteria	5	6,17	43	31,39	21	13,46
$\delta$ -Proteobacteria	0	0	2	1,46	8	5,13
$\varepsilon$ -Proteobacteria	1	1,23	23	16,79	0	0
<i>Cytophaga</i>	14	17,28	7	5,11	6	3,85
Flavobacteria	6	7,41	12	8,76	11	7,05
<i>Bacteroides</i>	5	6,17	0	0	0	0
Bacteroidetes	8	9,88	0	0	1	0,64
não identificados						
Actinobacteria	11	13,58	4	2,92	11	7,05
Firmicutes	18	22,22	2	1,46	0	0
<i>Synechococcus</i>	0	0	0	0	10	6,41
<i>Prochlorococcus</i>	1	1,23	1	0,73	3	1,92
Planctomycetes	0	0	0	0	1	0,64
Verrucomicrobia	0	0	0	0	2	1,28
Bactérias não identificadas	4	4,94	0	0	0	0

### 6.1.3 – Análise estatística

#### 6.1.3.1 – Relação entre bactérias e fatores bióticos e abióticos - Correlação de Spearman

Os coeficientes de correlação de Spearman ( $r$ ) obtidos com os parâmetros bióticos e abióticos analisados durante os “transects” de 2002 e 2003 na BG estão apresentados na Tabela 2. As correlações foram selecionadas a 95% de significância ( $p < 0,05$ ).

Como é possível perceber, a abundância de bactérias totais se correlacionou positiva e significativamente com a temperatura (0,8), a clorofila *a* (0,9), o nitrogênio amoniacal (0,9), o

nitrito (0,81), o ortofosfato (0,88), o fósforo total (0,86), o silicato (0,63), as células HNA (0,94) e LNA (0,76), e a atividade bacteriana (0,86). Negativamente, correlações significativas foram estabelecidas com o OD (-0,92).

As células HNA se correlacionaram positiva e significativamente com a temperatura (0,73), clorofila *a* (0,85), nitrogênio amoniacal (0,95), nitrito (0,88), ortofosfato (0,96), fósforo total (0,93), silicato (0,75), contagens de bactérias totais (0,94), células LNA (0,58) e atividade bacteriana (0,95). Correlações negativas e significativas foram obtidas com a salinidade (-0,57) e com o OD (-0,94). De modo negativo, esses microrganismos ainda se correlacionaram com o nitrato (-0,17).

As bactérias LNA se correlacionaram positiva e significativamente com a temperatura (0,88), clorofila *a* (0,71), nitrogênio amoniacal (0,52), bactérias totais (0,76) e células HNA (0,58). De modo positivo, ainda foram observadas correlações com o nitrito (0,38), ortofosfato e fósforo total (0,47), com o silicato (0,33) e com a atividade bacteriana (0,43). Negativamente, as bactérias LNA se correlacionaram com a salinidade (-0,05) e de modo significativo com o OD (-0,64) e com o nitrato (-0,73).

De maneira significativa, a atividade bacteriana se correlacionou positivamente com a clorofila *a* (0,83), nitrogênio amoniacal (0,92), nitrito (0,9), ortofosfato (0,96), fósforo total (0,93), silicato (0,74), bactérias totais (0,86) e células HNA (0,95). Negativa e significativamente, a atividade bacteriana se correlacionou com a salinidade (-0,68) e com o OD (-0,87).

### **6.1.3.2 – Análise de correspondência entre os fatores abióticos e microbiológicos da BG**

As relações existentes entre os grupos bacterianos (12 variáveis) e os distintos parâmetros ambientais (13 dados suplementares) encontrados na BG foram obtidas através de uma análise de correspondência (Figura 16). É possível perceber que os fatores 1 e 2 explicaram, respectivamente, 69,5% e 30,5% da variabilidade dos dados. O gradiente de eutrofização foi claramente demonstrado pelo fator 1. Os parâmetros indicadores de poluição se agruparam no lado negativo do plano fatorial, próximo ao canal da Maré. O padrão oposto foi verificado na estação 5K que apresentou os melhores índices de qualidade de água. Bactérias Firmicutes exibiram uma forte correlação com ortofosfato, fósforo total, amônia, silicato, abundância e atividade bacteriana, cujos resultados foram mais elevados no canal da Maré. Apesar de situadas em uma região mais central do plano fatorial, as bactérias Bacteroidetes e as Actinobacterias, assim como a clorofila *a*, o nitrito e o MPS também

apresentaram uma forte correlação com os parâmetros indicadores de poluição encontrados no canal da Maré. A estação BI apresentou uma condição intermediária de qualidade de água, exibindo uma forte correlação com as bactérias do grupo das gama- e epsilon-Proteobacterias. Por sua vez, no lado positivo do gráfico, bactérias relacionadas às águas costeiras, tais como *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, delta-Proteobacterias, Planctomycetes e Verrucomicrobia, apresentaram uma forte correlação com a salinidade, o OD e o nitrato, cujas maiores concentrações foram observadas na estação 5K.

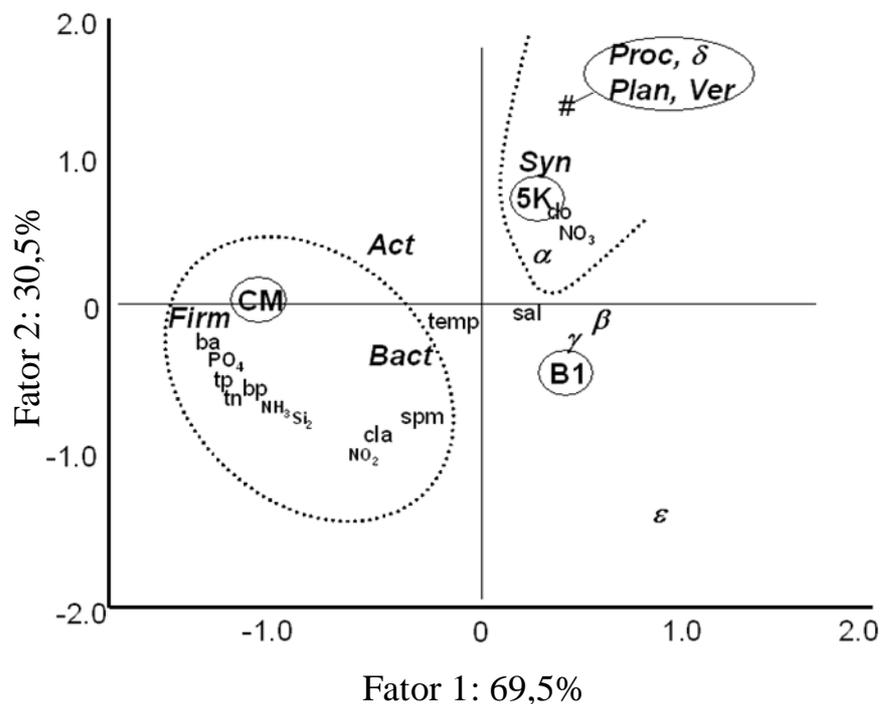


Figura 16: Análise de correspondência múltipla (AC) realizada entre os dados de diversidade de eubactérias e as variáveis ambientais analisadas na BG durante o “transect” de 2003. O gráfico mostra a projeção no plano fatorial 1-2. Símbolos: temperatura (TEMP), salinidade (S), oxigênio dissolvido (OD), clorofila *a* (Cla), material particulado em suspensão (MPS), nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub>), nitrato (NO<sub>3</sub>), nitrogênio total (NT), ortofosfato (PO<sub>4</sub>), fósforo total (PT), silicato (SiO<sub>2</sub>), abundância de bactérias totais (BT) e atividade bacteriana (PB). Estações de coleta: CM, BI e 5K.

Tabela 2: Matriz de correlação de Spearman (r) obtida com os dados adquiridos durante os “transects” de 2002 e 2003. Temperatura (Temp), salinidade (Sal), oxigênio dissolvido (OD), clorofila *a* (Cl *a*), nitrogênio amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), fósforo total (PT), silicato (SiO<sub>2</sub>), abundância de bactérias totais (BT), HNA, LNA, e atividade bacteriana (PB). 95% de significância, \*p < 0,05; \*\*p<0,01

	Temp	Sal	OD	Cl <i>a</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	PT	SiO <sub>2</sub>	BT	HNA	LNA	PB
Temp	1,00	0,23	-0,88**	0,88**	0,92**	0,88**	0,08	0,90*	0,88**	0,47	0,80**	0,73*	0,88**	0,69
Sal		1,00	0,48*	-0,46	-0,59**	-0,69**	0,03	-0,66**	-0,68**	-0,76**	-0,42	-0,57*	-0,05	-0,68**
OD			1,00	-0,80**	-0,92**	-0,87**	0,20	-0,89**	-0,88**	-0,71**	-0,92**	-0,94**	-0,64**	-0,87**
Cl <i>a</i>				1,00	0,86**	0,75**	-0,29	0,84**	0,81**	0,64**	0,90**	0,85**	0,71**	0,83**
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>					1,00	0,92**	-0,12	0,97**	0,96**	0,81**	0,90**	0,95**	0,52*	0,92**
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>						1,00	-0,01	0,93**	0,95**	0,71**	0,81**	0,88**	0,38	0,90**
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>							1,00	-0,07	-0,12	-0,26	-0,33	-0,17	-0,73**	-0,01
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>								1,00	0,98**	0,80**	0,88**	0,96**	0,47	0,96**
PT									1,00	0,79**	0,86**	0,93**	0,47	0,93**
SiO <sub>2</sub>										1,00	0,63**	0,75**	0,33	0,74**
BT											1,00	0,94**	0,76**	0,86**
HNA												1,00	0,58**	0,95**
LNA													1,00	0,43
PB														1,00

## **6.2 – Coletas mensais**

### **6.2.1 – Parâmetros físicos e químicos**

#### **6.2.1.1 – Temperatura da água**

Os dados de temperatura da água obtidos durante as coletas mensais na BG são apresentados na Figura 17a e na Tabela 3. Os resultados variaram de 20 a 27°C na enseada da Urca, de 21 a 33°C na praia de Ramos, e de 20,5 a 29°C na ilha de Paquetá. Os maiores e os menores valores médios foram encontrados, respectivamente, na praia de Ramos ( $25,75 \pm 2,68^\circ\text{C}$ ; CV% 10) e na Urca ( $23,62 \pm 1,86^\circ\text{C}$ ; CV% 9). Em Paquetá, a média foi de  $24,47 \pm 2,74^\circ\text{C}$ , com variabilidade de 11% entre os dados. Coeficientes de variação baixos também ocorreram nas outras áreas de estudo. Na enseada da Urca, em Ramos e em Paquetá as medianas foram, respectivamente, iguais a 24, 25,75 e 24,5°C.

Uma forte influência sazonal foi observada em todas as regiões de coleta. Os valores mais elevados de temperatura foram encontrados na época chuvosa, principalmente durante os meses quentes de verão (Urca – abril/03; Paquetá – fevereiro/04; Ramos – março/03). O oposto ocorreu no período seco, especialmente no inverno, quando os menores resultados de temperatura foram registrados (todas as estações - agosto/04).

#### **6.2.1.2 – Salinidade**

Na enseada da Urca, os resultados de salinidade oscilaram entre o valor mínimo de 28,96 S e máximo de 35,8 S (Figura 17b e Tabela 3). As medianas (33,07 S) e as médias ( $32,55 \pm 1,83$  S) mais elevadas foram observadas nessa estação de coleta, que apresentou uma pequena variabilidade entre os dados (CV% 6). Na praia de Ramos, os dados de salinidade variaram entre 14,24 e 29,05 S, atingindo a média ( $23,18 \pm 3,89$  S; CV% 17) e a mediana (23,04 S) mais baixa de todas as áreas estudadas. Na ilha de Paquetá, a salinidade média da água ficou em torno de  $28,05 \pm 4,36$  S (CV% 16), com os teores variando entre 18,36 e 32,71 S. Nessa estação de coleta, a mediana foi igual a 29,23 S.

Um claro padrão sazonal também foi observado. Em todas as estações, os maiores resultados de salinidade foram encontrados na época de estiagem (Urca – outubro/04; Paquetá – setembro/04; Ramos – setembro/03). Por sua vez, os menores valores ocorreram no período chuvoso, principalmente nos meses de verão (Urca e Ramos – janeiro/04; Paquetá –

fevereiro/04). A forte precipitação conseqüentemente pode justificar o baixo resultado encontrado na praia de Ramos no dia 30 de janeiro de 2004.

### **6.2.1.3 – pH**

Os dados de pH obtidos durante essa etapa do estudo estão indicados na Figura 17c e na Tabela 3. Os maiores valores médios ( $8,24 \pm 0,2$ ; CV% 2) e medianos (8,3) ocorreram na ilha de Paquetá, onde o pH oscilou entre 7,7 e 8,57. Os menores resultados foram encontrados em Ramos: de 7,56 a 8,6. Nessa estação a média foi de  $7,96 \pm 0,25$  (CV% 3) e a mediana de 7,94. Na enseada da Urca, os níveis de pH variaram entre 7,71 e 8,57 atingindo a média de  $8,15 \pm 0,2$  (CV% 2). Nessa área, a mediana foi igual a 8,17. Uma baixa variabilidade entre os dados ocorreu em todas as estações de coleta. Devido a problemas operacionais, determinações de pH não foram realizadas em março de 2004 nas três áreas de estudo, e em janeiro de 2005 na ilha de Paquetá.

Diferenças sazonais significativas não foram observadas em relação aos valores de pH. Na enseada da Urca, na praia de Ramos e na ilha de Paquetá, os resultados mais elevados foram encontrados em janeiro/05, fevereiro/04 e abril/04. Os menores valores foram registrados em dezembro/03 (Urca e Paquetá) e novembro/04 (Ramos).

### **6.2.1.4 – Oxigênio Dissolvido**

Os teores de oxigênio dissolvido na água oscilaram entre os valores mínimos e máximos de 2,67 e 6,79 mL.L<sup>-1</sup> na enseada da Urca, de 0,06 a 5,04 mL.L<sup>-1</sup> na praia de Ramos, e de 2,39 a 8,01 mL.L<sup>-1</sup> na ilha de Paquetá (Figura 17d e Tabela 3). Maiores e menores valores médios foram encontrados respectivamente, na ilha de Paquetá ( $4,81 \pm 1,1$  mL.L<sup>-1</sup>; CV% 23) e na praia de Ramos ( $1,73 \pm 1,41$  mL.L<sup>-1</sup>; CV% 81). A maior variabilidade entre os dados foi observada nessa última estação. Em Paquetá, a mediana foi de 4,84 mL.L<sup>-1</sup>, e em Ramos de 1,41 mL.L<sup>-1</sup>. Na enseada da Urca as concentrações médias ficaram em torno de  $3,78 \pm 0,93$  mL.L<sup>-1</sup>, atingindo 25% de variabilidade entre os dados. Nessa estação, a mediana foi de 3,62 mL.L<sup>-1</sup>.

Os menores resultados de OD foram encontrados em março/03 na Urca, abril/03 em Ramos, e maio/03 em Paquetá. Por sua vez, os maiores valores ocorreram em maio/04 (Urca e Paquetá) e novembro/04 (Ramos). Esse parâmetro abiótico também não apresentou uma clara distribuição sazonal.

### 6.2.1.5 – Clorofila *a*

As médias ( $15,21 \pm 7,88 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e as medianas ( $13,65 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) mais baixas de clorofila *a* foram registradas na Urca (Figura 17e e Tabela 3). Uma variabilidade moderada (CV% 52) ocorreu nessa estação, onde os dados oscilaram entre 2,66 e  $32,82 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os valores médios ( $136,32 \pm 82,28 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; CV% 60) e medianos ( $152,91 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) mais elevados ocorreram na praia de Ramos. Nessa área, os dados variaram entre 18,03 e  $251,38 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em Paquetá, os teores de clorofila *a* oscilaram entre 6,06 e  $153,11 \mu\text{g.L}^{-1}$ , com um valor médio de  $45,64 \pm 34,74 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Uma alta variabilidade entre os dados também

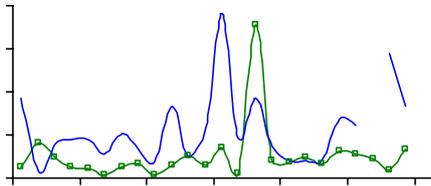
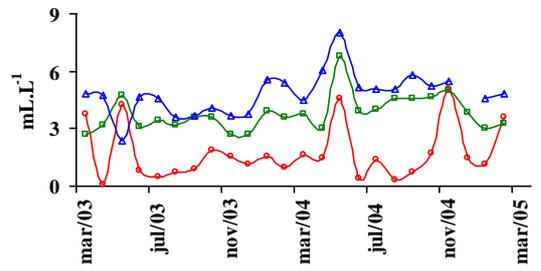
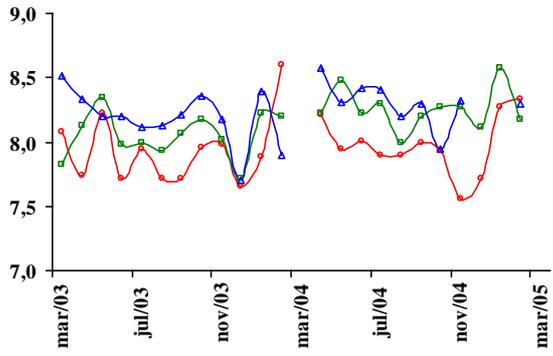
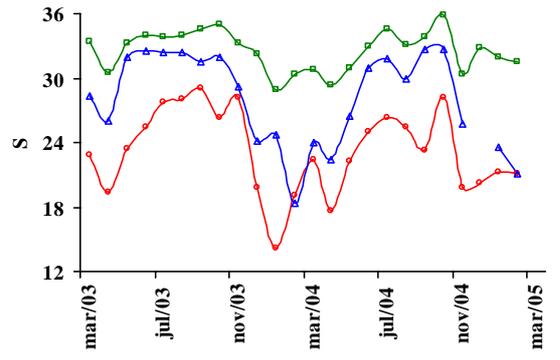
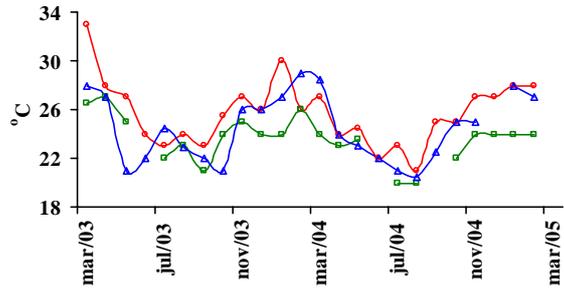
(Figura 18a e Tabela 3). Nessa estação a mediana foi 3,74  $\mu\text{M}$  e os resultados mínimos e máximos iguais a <0,05 e 25,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. As maiores médias (134,13  $\pm$  35,51  $\mu\text{M}$ ) e medianas (136,23  $\mu\text{M}$ ) ocorreram em Ramos. Esse ponto de coleta apresentou a menor variação entre os dados (CV% 26), que oscilaram de 61,83 a 209,29  $\mu\text{M}$ . Na enseada da Urca, esse nutriente variou de 2,68 a 18,41  $\mu\text{M}$ , atingindo uma média de 7,36  $\pm$  3,84  $\mu\text{M}$  (CV% 52) e uma mediana de 6,3  $\mu\text{M}$ . Devido a problemas analíticos, dados de nitrogênio amoniacal não foram obtidos na ilha de Paquetá em novembro de 2003.

Em relação à distribuição temporal, os maiores (Urca – abril/04, Ramos – maio/03 e Paquetá – agosto/03) e os menores (Urca – janeiro/04, Ramos – novembro/03, e Paquetá – abril e maio/03) resultados de nitrogênio amoniacal foram encontrados, respectivamente, nas estações seca e chuvosa.

#### **6.2.1.8 – Nitrito**

Os resultados de nitrito oscilaram de 0,63 a 2,38  $\mu\text{M}$  na Urca, de 0,94 a 4,04  $\mu\text{M}$  em Ramos, e de 0,23 a 2,03  $\mu\text{M}$  em Paquetá (Figura 18b e Tabela 3). Os maiores e menores valores médios foram registrados, respectivamente, na praia de Ramos (2,05  $\pm$  0,74  $\mu\text{M}$ ; CV% 36) e na ilha de Paquetá (0,91  $\pm$  0,48  $\mu\text{M}$ ; CV% 52). Nessas estações as medianas foram iguais a 2,09 e 0,79  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Na enseada da Urca, esse nutriente inorgânico alcançou a média de 1,23  $\pm$  0,44  $\mu\text{M}$  (CV% 36) e a mediana de 1,25  $\mu\text{M}$ . Em todas as regiões de coleta, variabilidades moderadas foram observadas entre os dados.

Na Urca (junho/03) e em Paquetá (julho/03), os valores mais elevados de nitrito foram encontrados na estação seca. Na praia de Ramos, esse nutriente atingiu suas maiores concentrações na época chuvosa (março/03). Os menores teores foram registrados em janeiro e setembro/2004 na enseada da Urca, janeiro/2004 em Paquetá e julho/03 em Ramos.



variabilidade entre os dados foi registrada nessa última estação de coleta. Na Urca a mediana foi igual a 1,21  $\mu\text{M}$  e em Ramos,  $<0,05 \mu\text{M}$ . Na ilha de Paquetá, os níveis médios ficaram em torno de  $0,2 \pm 0,39 \mu\text{M}$  (CV% 193). Em todas essas regiões, os valores mínimos registrados foram  $<0,05 \mu\text{M}$ . Apesar disso, as concentrações máximas desse nutriente corresponderam a 7,7  $\mu\text{M}$ , 1,94  $\mu\text{M}$  e 1,47  $\mu\text{M}$ , na enseada da Urca, na praia de Ramos e na ilha de Paquetá, respectivamente.

Na praia de Ramos (março/03) e na ilha de Paquetá (novembro/04), os maiores resultados de nitrato foram encontrados na estação chuvosa. Resultados inferiores a 0,05  $\mu\text{M}$  ocorreram em vários meses ao longo dos anos em ambas as áreas de coleta. Na enseada da Urca, as maiores e as menores concentrações, foram registradas, respectivamente, em junho e setembro/03, e janeiro e fevereiro/04.

#### **6.2.1.10 – Nitrogênio total**

Os teores de nitrogênio total oscilaram entre 9,31 e 47,52  $\mu\text{M}$  na Urca, 72,86 e 380,33  $\mu\text{M}$  em Ramos, e 14,7 e 57,59  $\mu\text{M}$  em Paquetá (Figura 18d e Tabela 3). Esse nutriente atingiu níveis médios de  $24,08 \pm 9,5 \mu\text{M}$ ,  $210,49 \pm 70,63 \mu\text{M}$  e  $33,57 \pm 12,39 \mu\text{M}$ , respectivamente, em cada uma dessas regiões de coleta. As medianas foram maiores em Ramos (215,97  $\mu\text{M}$ ) e menores na Urca (22,32  $\mu\text{M}$ ). Os coeficientes de variação alcançaram 39% na enseada da Urca, 33% na praia de Ramos e 37% na ilha de Paquetá, indicando uma variabilidade moderada em todas as áreas estudadas.

Em relação à distribuição sazonal, esse parâmetro abiótico atingiu seus maiores valores em outubro/04 (Urca), agosto/04 (Ramos) e agosto/03 (Paquetá). Os menores resultados de nitrogênio total foram registrados, em janeiro/05 na Urca e em Ramos, e em junho, julho e setembro/04 na ilha de Paquetá.

#### **6.2.1.11 – Ortofosfato**

O ortofosfato oscilou de 0,67 a 2,79  $\mu\text{M}$  na enseada da Urca, de 4,87 a 28,64  $\mu\text{M}$  na praia de Ramos e de 0,29 a 2,35  $\mu\text{M}$  na ilha de Paquetá (Figura 19a e Tabela 3). Maiores e menores valores médios foram obtidos, respectivamente, em Ramos ( $13,66 \pm 5,47 \mu\text{M}$ ; CV% 40) e em Paquetá ( $0,81 \pm 0,49 \mu\text{M}$ ; CV% 61). Como é possível perceber, as maiores variabilidades entre os dados ocorreram nessa estação de coleta. As medianas foram iguais a 12,85  $\mu\text{M}$  em Ramos e 0,69  $\mu\text{M}$  em Paquetá. Na enseada da Urca, os níveis médios

alcançados ficaram em torno de  $1,37 \pm 0,47 \mu\text{M}$ , com uma mediana de  $1,33 \mu\text{M}$  e uma variabilidade moderada (CV% 34%) entre os dados.

Na enseada da Urca, as maiores e menores concentrações de ortofosfato, ocorreram, respectivamente em abril/04 e maio/03. Na praia de Ramos, o valor mínimo foi registrado em março/03 e o máximo, em agosto/04. Por sua vez, na ilha de Paquetá, esse nutriente inorgânico alcançou seus maiores e menores teores em dezembro/05 e setembro/04, respectivamente.

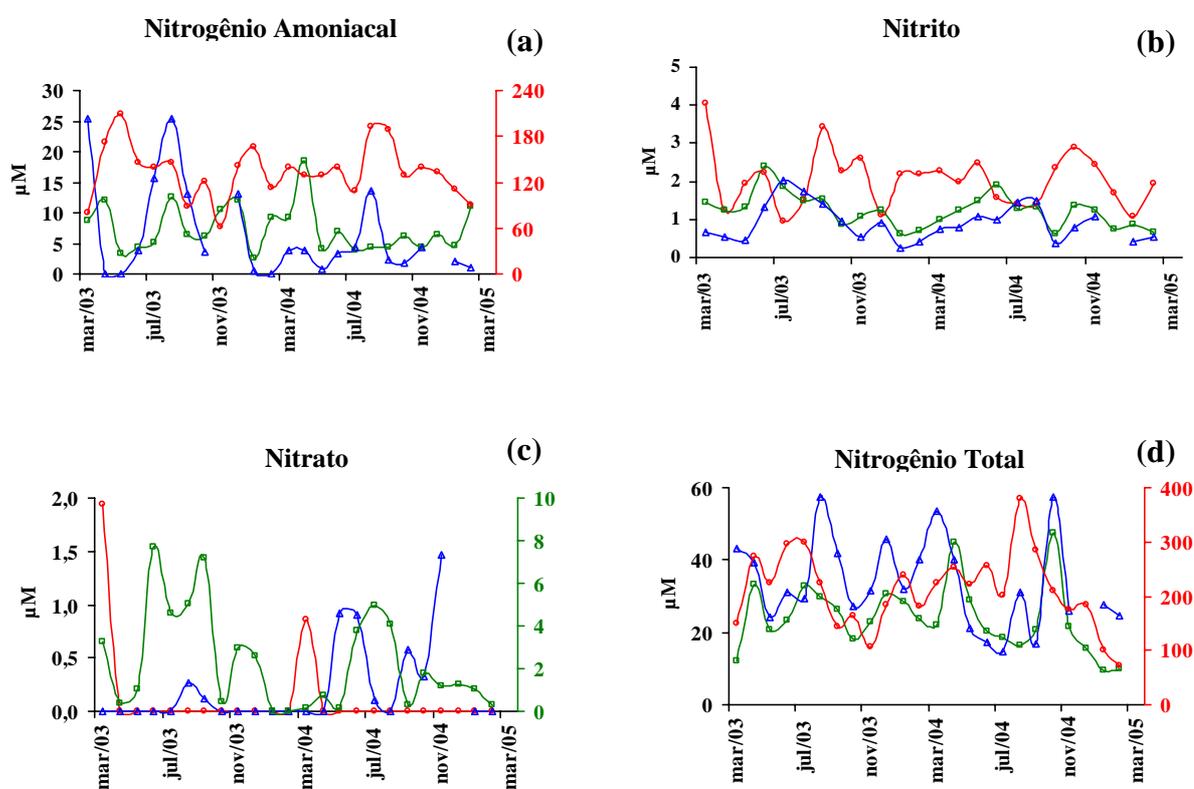


Figura 18: Resultados de nitrogênio amoniacal (a), nitrito (b), nitrato (c) e nitrogênio total (d) obtidos na enseada da Urca, na praia de Ramos e em Paquetá no período de março de 2003 a fevereiro de 2005. Dados de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total estão indicados na escala secundária.

#### 6.2.1.12 – Fósforo total

Os resultados de fósforo total estão indicados na Figura 19b e na Tabela 3. Na enseada da Urca, esse nutriente oscilou entre o valor mínimo de  $1,69 \mu\text{M}$  e máximo de  $4,6 \mu\text{M}$ . As

menores médias ( $2,4 \pm 0,68 \mu\text{M}$ ) e medianas ( $2,27 \mu\text{M}$ ) foram registradas nessa estação de coleta, que apresentou uma variabilidade moderada (CV% 28) entre os dados. Por sua vez, as medianas ( $18,31 \mu\text{M}$ ) e os níveis médios ( $18,18 \pm 6,69 \mu\text{M}$ ; CV% 37) mais elevados foram encontrados na praia de Ramos, onde os resultados oscilaram de 1,85 a  $30,78 \mu\text{M}$ . A maior variabilidade entre os dados ocorreu na ilha de Paquetá (CV 51%), onde as concentrações médias atingiram  $3,13 \pm 1,6 \mu\text{M}$  e a mediana  $2,91 \mu\text{M}$ . Nesse local de estudo, os teores de fósforo total oscilaram entre  $0,99 \mu\text{M}$  e  $7,49 \mu\text{M}$ . Devido a problemas analíticos, dados de fósforo total não foram obtidos na ilha de Paquetá em novembro de 2004.

Na enseada da Urca, em Ramos e em Paquetá, os valores máximos de fósforo total ocorreram, respectivamente, em maio, agosto e março/04. As menores concentrações foram observadas em setembro/04 na Urca, novembro/04 e março/03 em Ramos, e junho/03 em Paquetá.

#### **6.2.1.13 – Silicato**

Os teores de silicato obtidos durante o presente estudo estão indicados na Figura 19c e na Tabela 3. Os maiores valores médios foram encontrados na praia de Ramos ( $58,95 \pm 23,55 \mu\text{M}$ ), onde esse parâmetro variou de 18,54 a  $124,39 \mu\text{M}$ . Uma variabilidade moderada entre os dados foi registrada nessa estação (CV% 40), que apresentou  $52,63 \mu\text{M}$  de mediana. O oposto ocorreu na Urca, onde os níveis de silicato oscilaram entre o valor mínimo de  $4,63 \mu\text{M}$  e máximo de  $49,32 \mu\text{M}$ . A maior variabilidade entre os dados ocorreu nesse local de coleta (CV% 63), que apresentou concentrações médias e medianas em torno de  $17,1 \pm 10,73 \mu\text{M}$  e  $13,65 \mu\text{M}$ , respectivamente. Em Paquetá, o silicato oscilou entre 14,39 e  $77,51 \mu\text{M}$ , alcançando  $36,31 \pm 18,42 \mu\text{M}$  de média e  $31,55 \mu\text{M}$  de mediana. O coeficiente de variação indicou uma alta variabilidade entre os resultados (CV% 61) nessa área de estudo. Devido a problemas analíticos, dados de silicato não foram obtidos em fevereiro de 2005 na praia de Ramos.

Dados de silicato foram mais elevados durante a época chuvosa, Urca e Paquetá em fevereiro/04, e praia de Ramos em janeiro/04. Nas três diferentes áreas de estudo, os menores valores ocorreram no período de seca, principalmente em outubro/04.

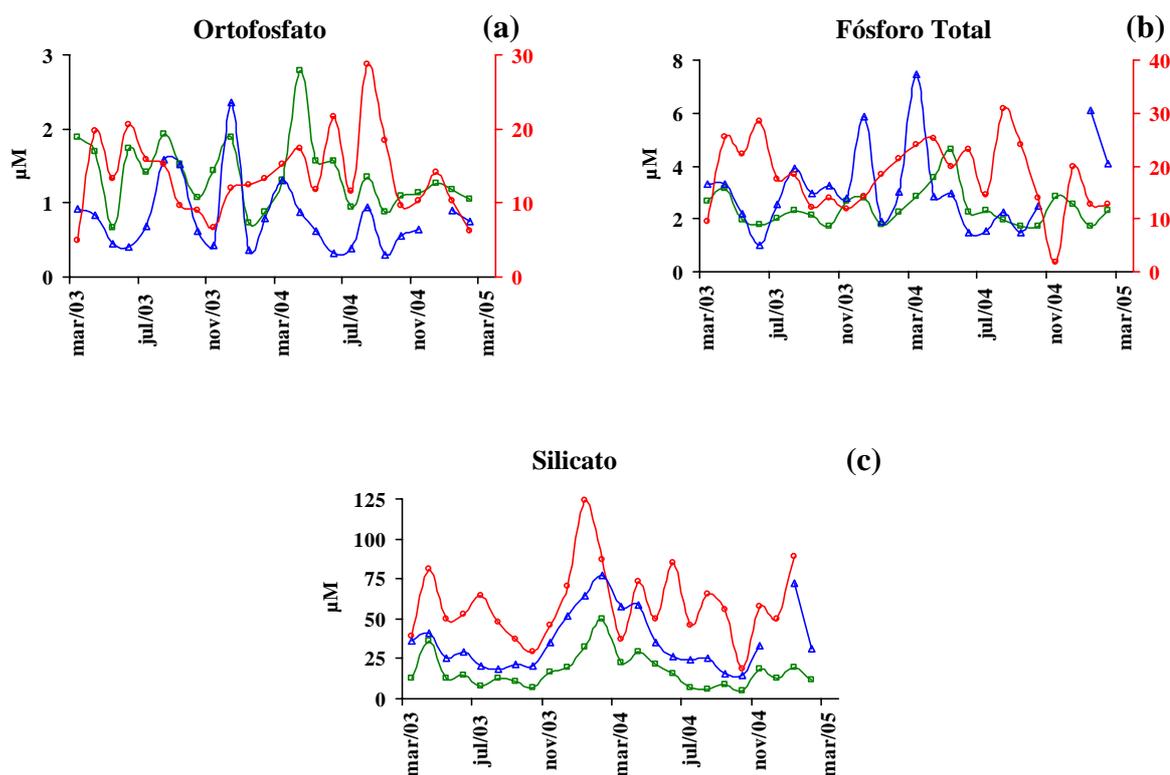


Figura 19: Resultados de ortofosfato (a), fósforo total (b) e silicato (c) obtidos na **enseada da Urca**, na **praia de Ramos** e em **Paquetá** no período de março de 2003 a fevereiro de 2005. Dados de ortofosfato e fósforo total estão indicados na escala secundária.

## 6.2.2 – Parâmetros microbiológicos

### 6.2.2.1 – Abundância de bactérias totais

Os resultados de bactérias totais oscilaram entre o mínimo de  $5,49 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e máximo de  $5,86 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na Urca. Em Ramos a variação ficou entre  $2,01 \times 10^6$  e  $3,99 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. Na ilha de Paquetá, as contagens oscilaram entre  $2,4 \times 10^6$  e  $2,21 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> (Figura 20a e Tabela 4). As maiores e as menores médias geométricas foram registradas, respectivamente, na praia de Ramos ( $1,75 \times 10^7 \pm 9,89 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) e na Urca ( $1,42 \times 10^6 \pm 1,72 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>). Em Paquetá, a abundância de bactérias totais atingiu a média geométrica de  $7,86 \times 10^6 \pm 5,84 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Os dados apresentaram um padrão sazonal de distribuição ao longo dos anos, com os maiores resultados tendo sido encontrados na estação chuvosa (Urca – dezembro/04, Ramos e Paquetá – fevereiro/05) e os menores, principalmente, na seca (Urca – setembro/04, Ramos – dezembro/04 e Paquetá – julho/04).

Tabela 3: Resumo dos parâmetros físicos e químicos obtidos no período de março de 2003 a fevereiro de 2005 na BG. Média, mediana, desvio padrão, coeficiente de variação (CV%), número de dados (N), e valores mínimos e máximos foram calculados para: temperatura (Temp) (°C), salinidade (Sal) (S), pH, OD (mL.L<sup>-1</sup>), clorofila *a* (chl *a*) (µg.L<sup>-1</sup>), MPS (mg.L<sup>-1</sup>), nitrogênio amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>) (µM), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (µM), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (µM), nitrogênio total (NT) (µM), ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (µM), fósforo total (PT) (µM) e silicato (SiO<sub>2</sub>) (µM).

Urca	Temp	Sal	pH	OD	Chl <i>a</i>	MPS	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NT	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	PT	SiO <sub>2</sub>
Média	23,62	32,55	8,15	3,78	13,65	53,21	7,36	1,23	2,28	24,08	1,37	2,4	17,1
Mediana													

### 6.2.2.2 – Abundância de bactérias HNA

As abundâncias de bactérias HNA são apresentadas na Figura 20b e na Tabela 4. As médias geométricas mais elevadas foram encontradas na praia de Ramos ( $1,34 \times 10^7 \pm 8,3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>), onde esse parâmetro microbiológico variou de  $6,211,62 \times 10^6$  a  $3,33 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>. O oposto foi verificado na enseada da Urca. Nessa estação de coleta, as bactérias HNA oscilaram entre o valor mínimo de  $2,77 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e máximo de  $4,59 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, atingindo a média geométrica de  $9,54 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Na ilha de Paquetá, as células com alto teor aparente de ácidos nucleicos variaram entre  $1,59 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e  $1,9 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, alcançando a média geométrica de  $5,07 \times 10^6 \pm 4,67 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Em relação à distribuição temporal, as bactérias HNA apresentaram suas maiores contagens na época chuvosa: dezembro/04 na enseada da Urca, janeiro e fevereiro/05 em Ramos e em Paquetá. O oposto foi observado no período de seca: Urca – agosto/03, Ramos – setembro/03 e dezembro/04, e ilha de Paquetá – julho/04.

### 6.2.2.3 – Abundância de bactérias LNA

As abundâncias de bactérias LNA variaram de  $1,76 \times 10^5$  a  $1,66 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na Urca, de  $3,71 \times 10^5$  a  $8,38 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na praia de Ramos, e de  $7,11 \times 10^5$  a  $6,06 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> na ilha de Paquetá (Figura 20c e Tabela 4). As maiores médias geométricas foram obtidas em Ramos ( $3,72 \times 10^6 \pm 2,05 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>). O padrão oposto foi observado na enseada da Urca, que apresentou a menor média geométrica de células LNA ( $4,45 \times 10^5 \pm 4,39 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>). Em Paquetá, as abundâncias de bactérias com baixo teor aparente de ácidos nucleicos ficaram em torno de  $2,62 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Sazonalmente, os valores mais elevados foram observados no período chuvoso: em janeiro/05 na Urca, em fevereiro/04 na praia de Ramos, e em novembro/04 na ilha de Paquetá. As menores contagens de bactérias LNA foram registradas principalmente durante a época de seca. Na Urca, os dados mais baixos ocorreram em novembro/03, julho/03 e abril/04; na praia de Ramos em dezembro/04 e julho/04; e na ilha de Paquetá em setembro/04.

osul HNA e orreram

### 6.2.2.4 – Percentual de bactérias HNA e LNA

Os percentuais de bactérias HNA e LNA estão apresentados na Figura 21. Em média, os ma

onde esse parâmetro microbiológico oscilou entre o valor mínimo de 59,8% e máximo de 865%. O oposto foi observado na ilha de Paquetá, que apresentou os menores percentuais médios de bactérias HNA ( $64,9 \pm 8,1\%$ ; CV% 13). Nessa estação de coleta, os resultados variaram entre 50,7 e 85,9%. Na enseada da Urca, as bactérias HNA oscilaram entre 47,1 e 89,5%, alcançando níveis médios de  $67,7 \pm 9,1\%$  (CV% 14). Uma pequena variabilidade entre os dados foi observada em todas as áreas estudadas.

Em relação às bactérias LNA, os maiores e menores percentuais médios ocorreram, respectivamente, na ilha de Paquetá ( $34,4 \pm 8,0\%$ ; CV% 23) e na praia de Ramos ( $22,4 \pm 7,6\%$ ; CV% 34). Nesses locais, tais percentuais oscilaram entre 13,8 e 49,2% e entre 13,1 e 40,1%, respectivamente. Uma variabilidade moderada foi observada entre os dados obtidos em ambas as estações. Na enseada da Urca, os percentuais de células LNA atingiram uma média de  $32,1 \pm 7,7\%$ , com 24% de variabilidade entre os dados. Os valores máximos e mínimos atingidos na Urca foram, respectivamente, de 50% e 19,3%.

Ainda foi possível perceber que as bactérias HNA ocorreram predominantemente na praia de Ramos, a estação localizada mais internamente na baía. O padrão oposto foi verificado para as bactérias LNA, que tiveram maior ocorrência nas regiões submetidas a maior influência de águas oceânicas: enseada da Urca e ilha de Paquetá.

Os percentuais de ambos os sub-grupos não apresentaram um padrão sazonal claro. No entanto, os maiores percentuais de células HNA foram observados principalmente durante a época chuvosa: janeiro, março e dezembro/04 na Urca, junho e outubro/04 e janeiro/05 em Ramos, e janeiro e fevereiro/05 em Paquetá. Os resultados mais baixos ocorreram em março, agosto e setembro/03 na Urca, setembro e outubro/03 e maio/04 em Ramos, e maio e agosto/03 em Paquetá. Em relação às bactérias LNA, os menores percentuais foram registrados principalmente no período chuvoso: janeiro e dezembro/04 na Urca, outubro, junho e agosto/04 e janeiro/05 em Ramos, e fevereiro/05 em Paquetá. Os dados mais elevados ocorreram em março, agosto e setembro/03 na Urca, em setembro e outubro/03 e maio/04 em Ramos, e em agosto e maio/03 em Paquetá.

#### **6.2.2.5 – Atividade bacteriana**

Os resultados de atividade bacteriana estão apresentados na Figura 20d e na Tabela 4. Os maiores e menores valores médios foram encontrados, respectivamente, na praia de Ramos ( $4,93 \pm 3,13 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; CV% 63) e na ilha de Paquetá ( $0,53 \pm 0,67 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ; CV% 127). Na enseada da Urca, os níveis médios de atividade bacteriana ficaram em torno de  $0,68 \pm 0,61$

$\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (CV% 90). Como é possível perceber, os coeficientes de variação indicaram uma alta variabilidade entre os dados obtidos em todas as estações de coleta. Na Urca, a atividade bacteriana oscilou entre o valor mínimo de  $0,06 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e máximo de  $2,35 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Na praia de Ramos a variação ficou entre  $0,37$  e  $10,6 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Por sua vez, em Paquetá os resultados oscilaram entre  $0,07$  e  $3,35 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Nesses locais de coleta, as medianas foram iguais a  $0,55$ ,  $3,8$  e  $0,36 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente.

Os dados de atividade bacteriana não demonstraram um padrão sazonal claro ao longo dos anos. Na enseada da Urca (março/03 e 04) e em Paquetá (março/03 e fevereiro/05), os maiores valores ocorreram no período chuvoso. Na praia de Ramos, as atividades mais elevadas foram registradas nos meses de inverno: junho e agosto/04. Por sua vez, os menores resultados de produção bacteriana ocorreram na época chuvosa: outubro e novembro/03 na Urca, setembro e outubro/03 na ilha de Paquetá, e outubro e novembro/03 na praia de Ramos.

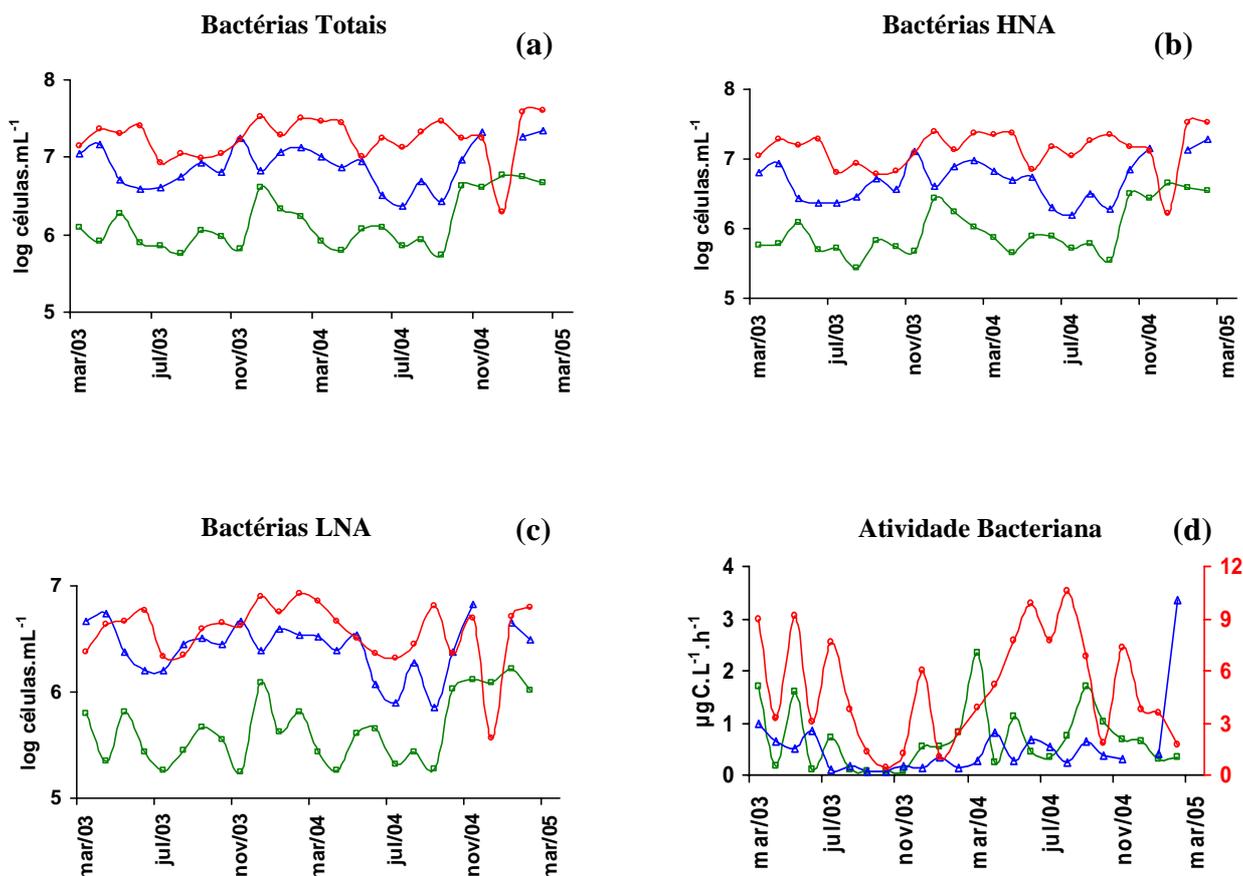


Figura 20: Abundância de bactérias totais (a), HNA (b) e LNA (c), e atividade bacteriana (d) obtidos na enseada da Urca, na praia de Ramos e em Paquetá no período de março de 2003 a fevereiro de 2005. Dados de atividade bacteriana estão indicados na escala secundária.

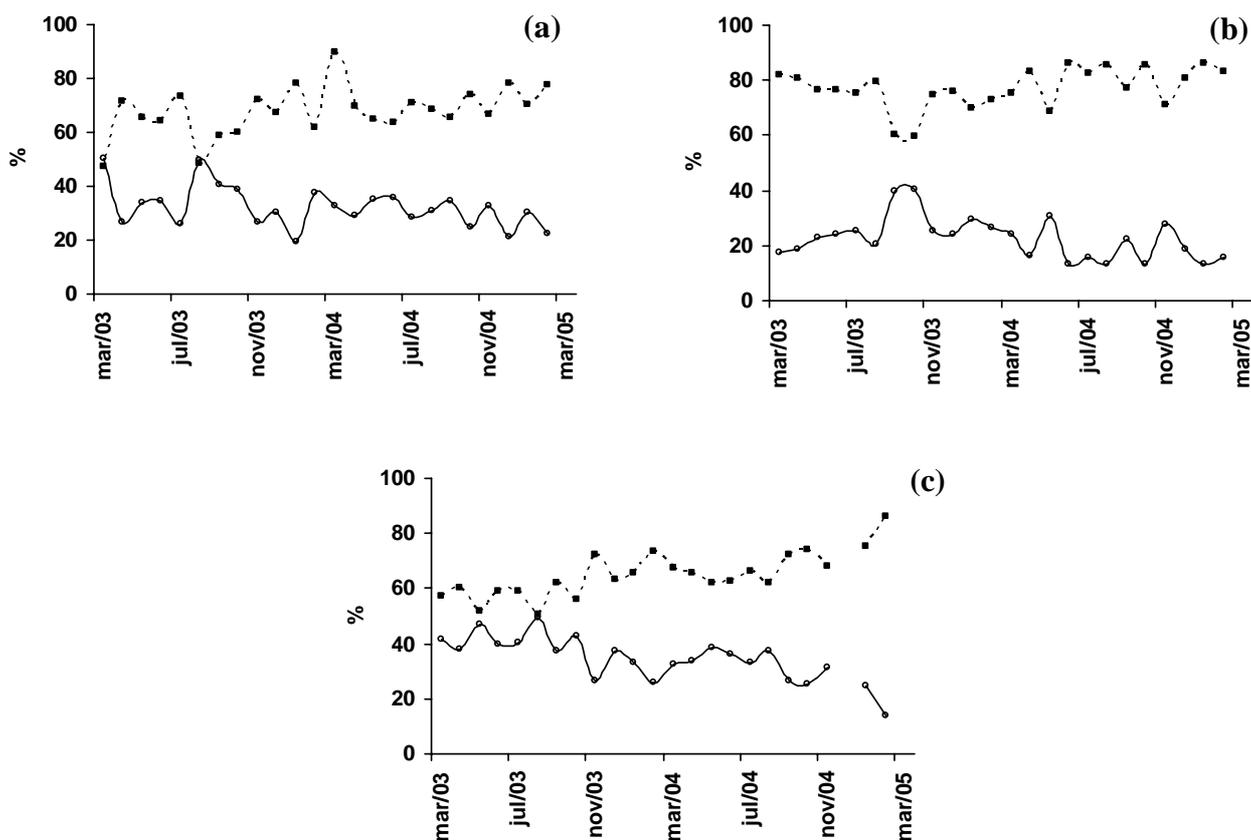


Figura 21: Percentuais de bactérias HNA (---■---) e LNA (—○—) obtidos na enseada da Urca (a), na praia de Ramos (b) e em Paquetá (c) no período de março de 2003 a fevereiro de 2005.

## 6.2.2.6 – Diversidade de bactérias oxidantes de amônia

### 6.2.2.6.1 – Extração do DNA ambiental

A qualidade do DNA extraído da amostra coletada na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004 foi verificada em um gel de agarose 1% (w/v) (Figura 22). DNA genômico de boa qualidade (fragmentado, porém com poucas quebras) foi obtido indicando que o procedimento de extração utilizado foi adequado. É interessante ressaltar que poucos produtos de degradação de ácidos nucleicos foram gerados, pois bandas únicas de DNA apareceram no gel de agarose.



Figura 22: Gel de agarose com o DNA extraído da amostra coletada na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004. Estação de coleta (UR) e controle (C) – *Escherichia coli* em cultura.

#### 6.2.2.6.2 – Amplificação do DNA bacteriano

A amplificação do DNA das bactérias oxidantes de amônia foi verificada em um gel de agarose 1% (w/v) (Figura 23). Produtos de PCR de tamanho adequado (491 pares de bases) foram obtidos na enseada da Urca a partir de reações realizadas com os iniciadores *amoA*-1F e *amoA*-2R.

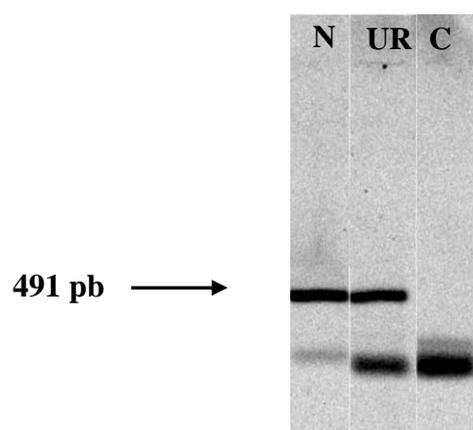


Figura 23: Gel de agarose com os produtos de PCR obtidos a partir do DNA extraído da amostra coletada na enseada da Urca no dia 26 de outubro de 2004. *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718D) (N), estação de coleta (UR) e controle negativo (C) - água.



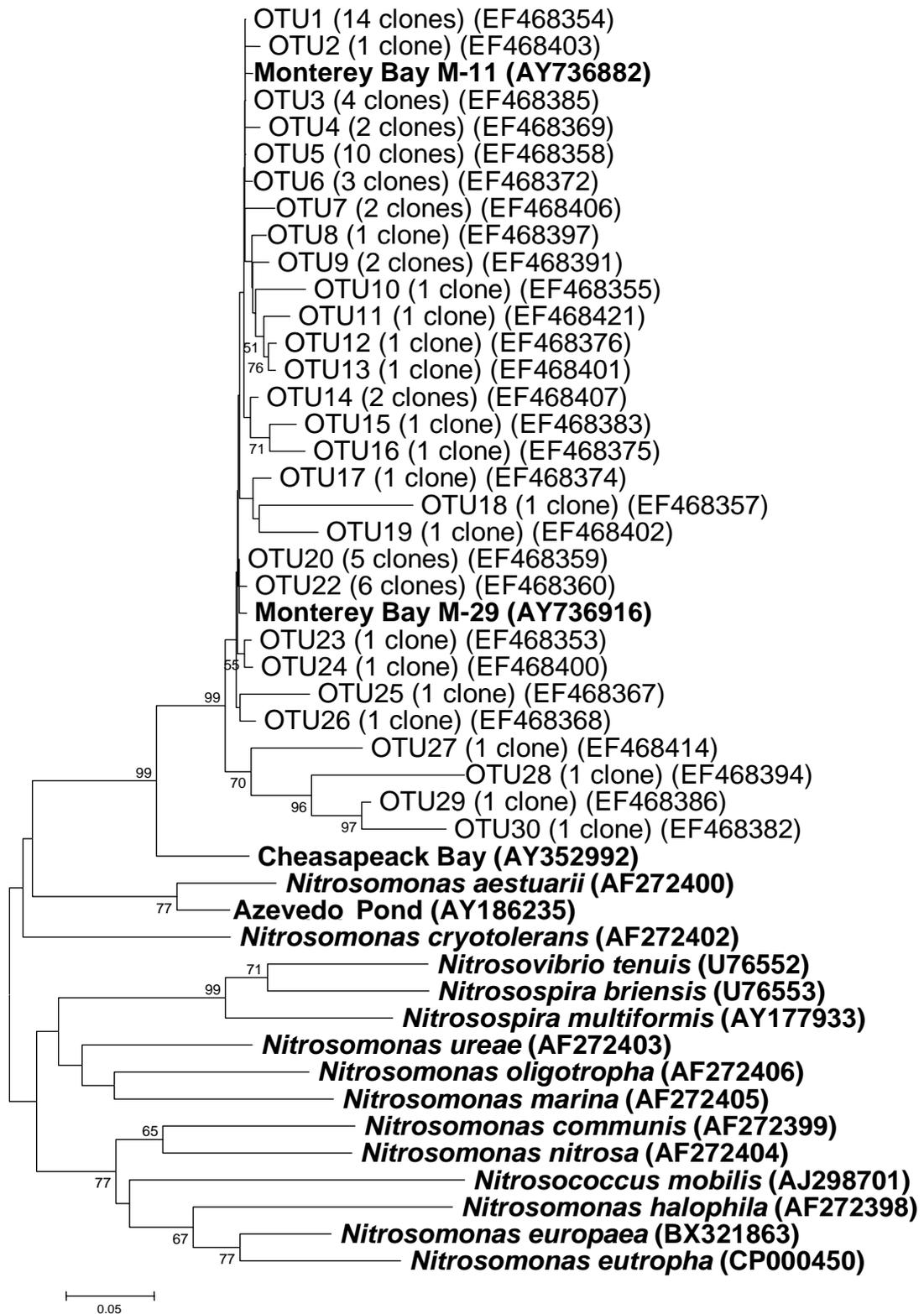


Figura 24: Relações filogenéticas obtidas entre as seqüências do gene *amoA* das bactérias oxidantes de amônia presentes na enseada da Urca. As seqüências adquiridas no GenBank estão em negrito. As análises de “bootstrap” foram realizadas com 1000 réplicas.

### 6.2.3 – Análise estatística

#### 6.2.3.1 – Relação entre bactérias e fatores bióticos e abióticos - Correlação de Spearman

Os coeficientes de correlação de Spearman ( $r$ ) obtidos com os dados adquiridos durante as coletas mensais na BG estão apresentados na Tabela 5. As correlações foram consideradas significativas a 95% de significância ( $p < 0,05$ ). Algumas das correlações estão descritas abaixo. As bactérias totais se correlacionaram positiva e significativamente com a temperatura (0,49), clorofila *a* (0,72), nitrogênio amoniacal (0,44), nitrogênio total (0,66), ortofosfato (0,39), fósforo total (0,69), silicato (0,74), células HNA (0,99) e LNA (0,93) e atividade bacteriana (0,50). Correlações positivas ainda ocorreram com o MPS (0,01) e nitrito (0,17). Negativamente, esses microorganismos se correlacionaram com o pH (-0,10) e de modo significativo com a salinidade (-0,80), OD (-0,26), nitrato (-0,63).

Correlações significativas foram observadas entre as bactérias HNA e a salinidade (-0,80), o OD (-0,27), o nitrato (-0,62), a temperatura (0,48), a clorofila *a* (0,72), o nitrogênio amoniacal (0,45), o nitrogênio total (0,68), o ortofosfato (0,41), o fósforo total (0,70), o silicato (0,73), a atividade bacteriana (0,52), e as bactérias totais (0,99) e LNA (0,90). Positivamente, as células HNA ainda se correlacionaram com o nitrito (0,17) e o MPS (0,01) e negativamente com o pH (-0,11). As bactérias LNA se correlacionaram de maneira significativa com a temperatura (0,49), a clorofila *a* (0,68), o nitrogênio amoniacal (0,34), o nitrogênio total (0,58), o ortofosfato (0,27), o fósforo total (0,60), o silicato (0,69), as bactérias totais (0,93), as células HNA (0,90), a atividade bacteriana (0,32), a salinidade (-0,74), e o nitrato (-0,61). Correlações positivas também foram encontradas com o MPS (0,04) e o nitrito (0,13) enquanto que correlações negativas foram observadas com o pH (-0,03) e o OD (-0,14).

A atividade bacteriana se correlacionou positivamente com a temperatura (0,20). De modo significativo, as correlações positivas foram observadas com a clorofila *a* (0,51), o nitrogênio amoniacal (0,55), o nitrito (0,35), o nitrogênio total (0,56), o ortofosfato (0,58), o fósforo total (0,54), o silicato (0,46), as abundâncias de bactérias totais (0,50), HNA (0,52) e LNA (0,32). Negativamente, esse parâmetro microbiológico se correlacionou significativamente com a salinidade (-0,52), com o OD (-0,36) e com o nitrato (-0,36). Correlações negativas ainda foram observadas entre a atividade bacteriana e o pH (-0,21) e o MPS (-0,003).

Tabela 5: Matriz de correlação de Spearman (r) obtida com os dados adquiridos no período de março de 2003 a fevereiro de 2005 na BG. Temperatura (Temp), salinidade (Sal), pH, oxigênio dissolvido (OD), clorofila *a* (Cl *a*), material particulado em suspensão (MPS), nitrogênio amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrogênio total (NT), ortofosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), fósforo total (PT), silicato (SiO<sub>2</sub>), abundância de bactérias totais (BT), HNA, LNA e atividade bacteriana (PB). 95% de significância, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01

	Temp	Sal	pH	OD	Cl <i>a</i>	MPS	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NT	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	PT	SiO <sub>2</sub>	BT	HNA	LNA	PB
Temp	1,00	-0,61**	-0,13	-0,05	0,49**	0,09	0,19	-0,02	-0,34**	0,29**	0,18	0,37**	0,51**	0,49**	0,48**	0,49**	0,20
Sal		1,00	0,14	0,20	-0,74**	0,04	-0,43**	-0,13	0,70**	-0,67**	-0,45**	-0,72**	-0,91**	-0,80**	-0,80**	-0,74**	-0,52**
pH			1,00	0,54**	-0,12	-0,06	-0,53**	-0,36**	0,12	-0,45**	-0,57**	-0,35**	-0,17	-0,10	-0,11	-0,03	-0,21
OD				1,00	-0,11	-0,09	-0,72**	-0,41**	0,19	-0,54**	-0,78**	-0,59**	-0,30**	-0,26*	-0,27**	-0,14	-0,36**
Cl <i>a</i>					1,00	0,005	0,44**	0,35**	-0,54**	0,63**	0,42**	0,65**	0,61**	0,72**	0,72**	0,68**	0,51**
MPS						1,00	0,10	0,11	-0,008	0,23	0,13	0,12	0,10	0,01	0,01	0,04	-0,003
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /NH <sub>3</sub>							1,00	0,66**	-0,32**	0,74**	0,89**	0,71**	0,42**	0,44**	0,45**	0,34**	0,55**
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>					3			1,00	0,02	0,48**	0,65**	0,39**	0,06	0,17	0,17	0,13	0,35**
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>									1,00	-0,59**	-0,21	-0,52**	-0,75**	-0,63**	-0,62**	-0,61**	-0,05

66  
\*

### 6.2.3.2 – Análise de Componentes Principais (ACP)

A integração dos resultados físicos, químicos e biológicos obtidos durante as coletas mensais na BG é apresentada na Figura 25. A análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando 16 variáveis (parâmetros analisados) e 71 observações (amostras coletadas). As coordenadas das variáveis nos eixos fatoriais da análise de componentes principais estão indicadas na Tabela 6.

É possível perceber que o plano fatorial 1-2 explicou 70,09% da variabilidade total dos dados. O fator 1 explicou 55,06% dessa variabilidade. A temperatura, a clorofila *a*, o material particulado em suspensão, o nitrogênio amoniacal, o nitrito, o nitrogênio total, o ortofosfato, o fósforo total, o silicato, a abundância de bactérias totais, a contagem de células HNA e LNA, e a atividade bacteriana se correlacionaram negativamente com o fator 1. Por sua vez, a salinidade, o oxigênio dissolvido e o nitrato se correlacionaram positivamente com esse eixo. As diferenças espaciais existentes entre as áreas de coleta foram evidenciadas através desse fator, que representa o gradiente de qualidade de água da baía. As amostras coletas na enseada da Urca e na ilha de Paquetá ocuparam o lado direito e positivo do gráfico enquanto que aquelas obtidas na praia de Ramos distribuíram-se na parte esquerda e negativa do eixo 1.

O fator 2 explicou 15,03% da variação entre os resultados. Uma correlação negativa foi observada com a temperatura, o oxigênio dissolvido, a clorofila *a*, o silicato e a abundância de bactérias totais, HNA e LNA. Correlações positivas foram estabelecidas com a salinidade, o material particulado em suspensão, o nitrogênio amoniacal, o nitrito, o nitrato, o nitrogênio total, o ortofosfato, o fósforo total e a atividade bacteriana. A distribuição dos resultados físicos, químicos e biológicos em relação ao fator 2 sugerem o padrão sazonal existente dentro desse ecossistema costeiro. É possível notar que as amostras adquiridas durante os meses de inverno se distribuíram predominantemente na parte superior e positiva do gráfico. O oposto foi verificado para as amostras obtidas durante os meses quentes de verão, que ocorreram preferencialmente no lado negativo e inferior do eixo 2.

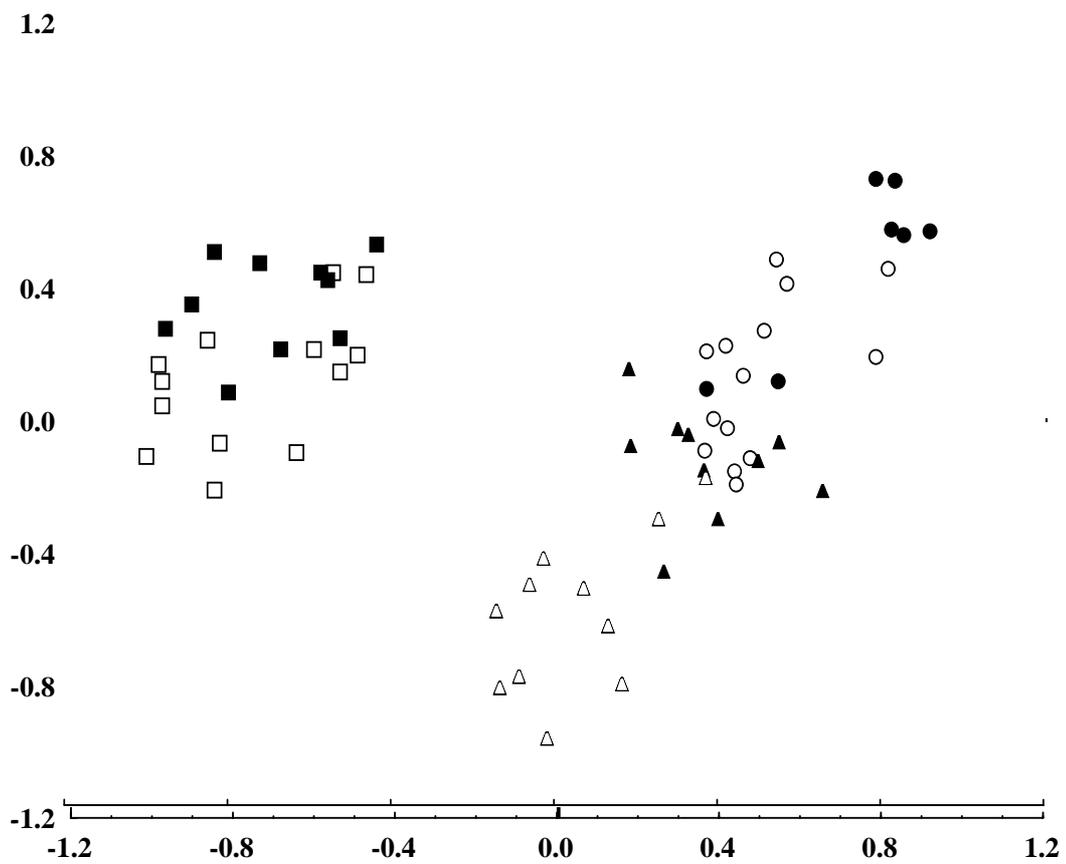


Tabela 6: Coordenadas das variáveis nos eixos fatoriais da análise de componentes principais. Referência à Figura 25 (n = 71, \*p<0,05).

Fatores	1	2
Variabilidade de explicação	(55,06%)	(15,03%)
Temperatura	-0,4767	-0,3887
Salinidade	0,8069*	0,3080
Oxigênio Dissolvido	0,6703*	-0,4843
Clorofila <i>a</i>	-0,7740*	-0,2031
MPS	-0,0785	0,1851
Nitrogênio amoniacal	-0,8022*	0,5118*
Nitrito	-0,4592	0,6293*
Nitrato	0,5916*	0,4787
Nitrogênio Total	-0,9154*	0,2869
Ortofosfato	-0,8730*	0,4498
Fósforo Total	-0,9084*	0,2721
Silicato	-0,7993*	-0,3364
Atividade Bacteriana	-0,7266*	0,2096
Bactérias Totais	-0,8551*	-0,3671
Bactérias HNA	-0,8698*	-0,3412
Bactérias LNA	-0,7693*	-0,4414

## 7 - Discussão

A baía de Guanabara é um ecossistema costeiro semi-fechado de natureza estuarina (Amador, 1980). Estuários são ambientes altamente produtivos e dinâmicos que suportam uma teia trófica bastante complexa (Braga *et al.*, 2000). Apesar da grande importância ecológica e sócio-econômica, a maioria dos estuários atualmente está sujeita à inúmeras pressões antrópicas (Hewson & Fuhrman, 2004). Por exemplo, o aporte de efluentes domésticos e a conseqüente alta disponibilidade de matéria orgânica favorece o elevado crescimento microbiano que vem sendo normalmente observado dentro desses corpos d'água (Schultz *et al.*, 2003). Esses problemas acabam por afetar os múltiplos usos desses ambientes, tais como a pesca, o lazer, o turismo, a balneabilidade, e a reprodução e crescimento de diversas espécies, destruindo-os “quase que completamente como entidade biológica” (Odum, 1995) e como fins econômicos.

Os estuários são regiões de interface continente-oceano caracterizadas por apresentar fortes gradientes físicos, químicos e biológicos que se estabelecem pela mistura entre as águas marinhas e dulcícolas. Os níveis de poluição associados aos padrões de circulação e a renovação das águas contribuem para gerar os gradientes de temperatura, salinidade e nutrientes típicos dos estuários. Tais gradientes, juntamente com a lise viral e a predação protista exercem uma grande influência sobre a dinâmica microbiana, afetando a distribuição espacial e sazonal do bacterioplâncton (Schultz *et al.*, 2003; Horner-Devine *et al.*, 2003).

A BG é caracterizada por apresentar diversas regiões com diferentes níveis de qualidade de água (Mayr *et al.*, 1989). Dessa forma, é possível perceber que a presença de micro-ambientes e as complexas interações existentes entre os fatores bióticos e abióticos acabam dificultando a determinação dos parâmetros que controlam a abundância, a atividade e a diversidade das bactérias presentes nesse corpo d'água. Os fatores físicos, químicos e biológicos, que afetam direta ou indiretamente os parâmetros bacterianos, se modificam bastante ao longo do gradiente estuarino fazendo com que variações significativas ocorram entre regiões da baía separadas por curtas distâncias (Paranhos, 2002). De acordo com Mayr *et al.* (1989) e Villac *et al.* (1991), as variações sazonais dos parâmetros ambientais também afetam os componentes biológicos do sistema influenciando a distribuição e a composição dos organismos planctônicos.

Portanto, a determinação dos padrões espaciais e temporais das bactérias e dos fatores ambientais é de fundamental importância para se obter uma maior compreensão sobre a dinâmica e funcionamento da BG. Além disso, a composição dos agrupamentos bacterianos e

a presença de genes ecologicamente relevantes, como por exemplo, aqueles envolvidos na ciclagem biogeoquímica do nitrogênio, também são informações de extrema importância para um maior entendimento a respeito da estrutura microbiana e dos processos que ocorrem nesse sistema. Conseqüentemente, estudos como esse que associa o inventário taxonômico das espécies bacterianas aos parâmetros bióticos e abióticos, à ciclagem biogeoquímica e aos impactos antrópicos são de grande relevância para a ecologia microbiana aquática.

## 7.1 – Caracterização ambiental e microbiológica

Os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da BG variaram ao longo do gradiente estuarino e estiveram fortemente relacionados aos diferentes níveis de qualidade de água de cada uma das regiões estudadas. Tais diferenças são explicadas pelos distintos perfis batimétricos, fontes de poluição e padrões de circulação encontrados em cada uma dessas áreas (Mayr *et al.*, 1989). Os resultados obtidos confirmaram o acelerado processo de degradação previamente descrito por Hagler *et al.* (1986), Mayr *et al.* (1989), Lavrado *et al.* (1991), Paranhos & Mayr (1993), Paranhos *et al.* (1993), Contador & Paranhos (1996), FEEMA (1990, 1998), Paranhos *et al.* (1998, 2001), Gonzalez *et al.* (2000) e Andrade *et al.* (2003), que também observaram diferenças nos fatores bióticos e abióticos da baía em relação às épocas do ano e às áreas de coleta.

A grande variabilidade dos dados de temperatura e salinidade, e as correlações negativas existentes entre eles ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5) confirmaram os diferentes regimes hidrológicos de cada uma das regiões de coleta. Os resultados estiveram de acordo com aqueles obtidos por Paranhos *et al.* (1993) e Paranhos & Mayr (1993), que descreveram valores de temperatura e de salinidade, variando respectivamente, de 19 a 31°C e de 13 a 33 S para a BG. Os dados de salinidade obtidos no presente estudo indicaram o grande aporte continental (águas menos salinas) nas regiões mais internas da baía e a forte influência das águas costeiras (mais salinas) nas estações oceânicas. Esse padrão espacial nos níveis de salinidade é um reflexo da natureza estuarina desse corpo d'água (maior influência fluvial nas áreas mais internas) e da ocupação humana no entorno da baía que vem ocorrendo de um modo desordenado e sem um planejamento prévio adequado (Mayr *et al.*, 1989; Paranhos & Mayr 1993).

Os resultados também podem ser explicados pelos distintos padrões de circulação encontrados na baía. De acordo com Amador (1997), a BG teve 10% de sua área superficial aterrada desde a década de 30, um processo que têm provocado graves conseqüências

ambientais. Esses aterros foram principalmente realizados nas regiões mais internas da baía, e modificaram o sistema de circulação do corpo d'água. Além dos aterros, outros fatores tais como, o desmatamento das encostas circundantes e a canalização dos rios também contribuíram e muito, para a restrição da circulação das águas (Amador, 1980, 1997). Essas ações têm aumentado as taxas de sedimentação da BG para níveis bem acima dos naturais (Amador, 1997; Godoy *et al.*, 1998), tornando esse ecossistema cada dia mais raso. Tais condições dificultam a entrada da água do mar durante o movimento de maré, principalmente nas áreas mais rasas, que passam a apresentar um maior tempo de residência e uma menor capacidade de diluição de esgoto.

Portanto, os baixos teores de salinidade observados no canal da Maré e na praia de Ramos refletem a grande quantidade de águas poluídas que são lançadas diariamente nessas regiões através de rios. Também decorrem da fraca renovação hídrica existente nesses micro-ambientes em virtude de suas altas taxas de assoreamento (Amador, 1997). Por sua vez, os resultados encontrados nas estações de coleta situadas ao longo do canal de circulação da baía demonstraram uma dinâmica mistura entre as águas oceânicas e continentais, confirmando a natureza estuarina desse ecossistema (Paranhos *et al.*, 1998).

Os dois fatores abióticos citados acima refletiram o comportamento sazonal que é tipicamente observado no Rio de Janeiro: maiores valores de temperatura e menores de salinidade no verão. De acordo com Mayr *et al.* (1989), as altas taxas pluviométricas registradas no verão normalmente ultrapassam a intensa evaporação provocando uma diluição das águas da baía durante essa época do ano. O aumento nos níveis de água doce da BG durante a estação chuvosa podem consequentemente explicar os baixos resultados de salinidade que foram encontrados nos meses de janeiro e fevereiro na enseada da Urca (28,9 S), na ilha de Paquetá (18,3 S) e em Ramos (14,2 S). A distribuição sazonal dos valores de temperatura e salinidade da BG já tinha sido descrita anteriormente por outros pesquisadores. Mayr *et al.* (1989) encontraram os maiores e os menores resultados de ambos os parâmetros, respectivamente, em fevereiro (28°C) e junho (22°C), e agosto (30 S) e janeiro (21 S). Da mesma maneira, no estudo realizado por Paranhos & Mayr (1993), esses autores obtiveram os valores mais elevados e mais baixos de salinidade, respectivamente, nos meses de agosto (33 S) e de fevereiro (13 S).

Variações sazonais e espaciais nos dados de temperatura e salinidade também foram observadas em outros sistemas estuarinos do mundo. Braga *et al.* (2000), encontraram valores de salinidade oscilando entre 19,3 e 32,7 S, respectivamente, nas áreas de maior e menor influência dulcícola. Ao longo das estações do ano, os níveis mais elevados de salinidade

foram registrados na primavera. Por sua vez, no ambiente temperado do rio York, um sub-estuário da baía de Chesapeake, os dados de salinidade aumentaram de 0,3 a 16,3 S à medida que as estações se aproximavam dessa baía (Schultz *et al.*, 2003). Nesse ecossistema costeiro, os valores de temperatura variaram entre 6,3 e 27,3°C, com os maiores resultados sendo registrados no verão.

Os dados de pH obtidos durante o presente estudo também demonstraram as diferenças ambientais existentes entre as áreas de coleta. Valores mais elevados foram encontrados nas áreas de maior influência oceânica. O oposto ocorreu na praia de Ramos, onde os menores resultados de pH confirmaram o grande aporte de águas continentais ricas em matéria orgânica. O consumo da matéria orgânica pelas bactérias heterotróficas diminui o oxigênio da água (Carmouze *et al.*, 1995), que quase sempre é mantido em baixas concentrações nas áreas mais internas da baía em resposta a difícil renovação hídrica provocada por aterros antrópicos (Lavrado *et al.*, 1991). Isso foi corroborado pelas correlações significativamente negativas observadas entre os teores de oxigênio e as concentrações de nutrientes na água (Tabelas 2 e 5). Apesar dos baixos teores de OD, atividade biológica continua sendo detectada em tais regiões (Mayr *et al.*, 1989). Através de seus metabolismos, os organismos presentes produzem e liberam gás carbônico pela respiração, gás esse que em maiores quantidades que o oxigênio, acaba reduzindo o pH da água pela formação de ácido carbônico (Esteves, 1998). As correlações significativamente positivas encontradas entre os dados de pH e de OD confirmam o exposto acima ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = 0,54$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5).

Uma variação espacial semelhante nos dados de pH foi observada por Gonzalez *et al.* (2000), que encontraram valores oscilando de 8,1 a 8,34 nas regiões de melhor qualidade de água e de 7,66 a 8,45 nas áreas mais eutrofizadas da baía. Esse mesmo padrão de distribuição também foi observado na baía de Santos (Braga *et al.*, 2000) e na baía de Chesapeake (Wong, 1979), onde os valores de pH variaram, respectivamente, de 5,7 a 8,5 e de 7,5 a 8,3, com o aumento da salinidade. Durante o presente trabalho, o pH não apresentou nenhum padrão sazonal claro. Tais resultados contrastam com Paranhos (2002) que descreveu em seu estudo uma tendência sazonal do pH, com os maiores e menores valores, sendo encontrados, respectivamente, no verão e no inverno. Os dados desse autor foram coletados semanalmente, numa escala de tempo mais detalhada, o que poderia justificar as diferenças nos padrões de distribuição ao longo do tempo.

Através das análises de OD foi possível perceber que esse parâmetro abiótico oscilou ao longo do gradiente estuarino, aumentando de concentração à medida que as estações se

aproximavam do Oceano Atlântico. Como citado anteriormente, os inúmeros aterros existentes nas regiões mais internas da baía dificultam a circulação e a renovação das águas que se tornam estagnadas e com baixos teores de oxigênio (Mayr *et al.*, 1989; Lavrado *et al.* 1991). Durante o presente estudo, o canal da Maré apresentou-se anóxico. Tais condições impõem um metabolismo anaeróbico para os microrganismos presentes nessa área, criando uma pressão seletiva que favorece a atividade de arqueias metanogênicas (Vieira *et al.*, 2007a) e bactérias anaeróbicas (Vieira *et al.*, 2007b). Por sua vez, a praia de Ramos apresentou uma grande variabilidade nos dados (0,06 a 5,04 mL.L<sup>-1</sup>, CV% 81) (Tabela 3), condição típica de ambientes hipereutrofizados com alta produção fitoplanctônica.

A elevada produção fitoplanctônica, consequência da alta disponibilidade de nutrientes na região (Mayr *et al.*, 1989; Villac, 1990), foi confirmada pelos dados de clorofila e pelas correlações significativamente positivas encontradas entre eles (Tabela 5). Assim como o OD, os resultados de clorofila *a* também apresentaram uma ampla variação, com os maiores e os menores teores sendo registrados, respectivamente, nas áreas mais internas e mais externas da baía. As diferenças espaciais existentes entre as estações de coleta foram confirmadas pelas correlações significativamente negativas encontradas entre os dados de salinidade e clorofila *a* ( $r = -0,46$ , Tabela 2;  $r = -0,74$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5). Os valores de clorofila *a* estiveram dentro da faixa de variação descrita por Paranhos (2002): de 0,66 a 58,24  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e de 9,51 a 7,26 a 356,80  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, nas áreas de melhor e pior qualidade ambiental da BG. Os dados de OD encontrados durante o presente estudo também foram semelhantes aos obtidos por Paranhos (2002), que observou concentrações de oxigênio variando entre 0,18 e 6,25 mL.L<sup>-1</sup> na enseada da Urca e entre 0,00 e 9,46 mL.L<sup>-1</sup> na praia de Ramos. Outros ecossistemas costeiros também apresentaram esse mesmo padrão de distribuição em relação à mistura estuarina. Por exemplo, níveis mais elevados de OD (4,84 a 5,69 mL.L<sup>-1</sup>) foram registrados nas regiões de maior influência oceânica da baía de Santos (Braga *et al.*, 2000). Por sua vez, os maiores valores de clorofila *a* (31,6 a 40,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) do estuário do rio York (Schultz *et al.*, 2003) foram encontrados nas regiões de maior aporte continental.

Nenhum padrão sazonal de distribuição foi encontrado para os dados de oxigênio da BG. Assim como o pH, os resultados de OD também não estiveram de acordo com aqueles descritos por Mayr *et al.* (1989) e Paranhos (2002), que obtiveram os maiores e os menores teores, respectivamente, no verão e no inverno. Por sua vez os dados de clorofila *a* foram maiores na época chuvosa e menores, na seca. Segundo Mayr *et al.* (1989), tais resultados podem ser explicados pelo aumento da produtividade primária nos meses quentes de verão que ocorre em resposta a intensa insolação normalmente observada nessa época do ano. Uma

tendência temporal semelhante nos teores de clorofila *a* foi observada no trabalho de Paranhos (2002). Valores elevados desse parâmetro também foram encontrados na BG durante épocas chuvosas por Mayr & Paranhos (2000) (20 a 78  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). A influência da sazonalidade nos dados de clorofila *a* também foi demonstrada no estuário do rio York por Schultz *et al.* (2003), que descreveram os maiores teores desse parâmetro nos meses de verão.

Os resultados de MPS também foram maiores no interior da baía. O material particulado alcança a BG através dos rios e dos esgostos domésticos que deságuam principalmente no fundo desse ecossistema, confirmando a grande influência de águas continentais nessas regiões (Mayr *et al.*, 1989). A comparação com estudos anteriormente realizados na BG permitiu identificar um acréscimo nos teores de materiais particulados desse ecossistema, principalmente nas regiões mais externas. Gonzalez *et al.* (2000), encontraram valores de MPS variando de 12,3 a 24,4  $\text{mg.L}^{-1}$  na Urca e de 14,79 a 70,8  $\text{mg.L}^{-1}$  em Ramos. Paranhos *et al.* (2001), coletando amostras semanais entre julho de 1998 e setembro de 1999, registraram níveis médios que alcançaram 21,39 e 42,51  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, nas duas áreas citadas acima. Esses autores verificaram valores mínimos e máximos de materiais particulados em suspensão oscilando, respectivamente, de 6,2 a 51,6  $\text{mg.L}^{-1}$  na enseada da Urca e de 12,8 a 87,43  $\text{mg.L}^{-1}$  na praia de Ramos. Assim como observado por Paranhos (2002), uma tendência sazonal clara nos dados de MPS também não foi identificada durante o período amostral em que o presente estudo foi realizado. No trabalho desse pesquisador, valores médios de 27,95  $\text{mg.L}^{-1}$  (6,94 a 60,75  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e de 45,4  $\text{mg.L}^{-1}$  (17 a 92  $\text{mg.L}^{-1}$ ), foram encontrados, respectivamente na Urca e em Ramos.

O gradiente trófico existente na BG também foi claramente demonstrado pelos dados de nutrientes. Com exceção do nitrato, todos os outros nutrientes foram mais abundantes nas áreas mais internas da baía, caracterizadas por uma difícil renovação das águas e por um grande aporte de efluentes domésticos (Mayr *et al.*, 1989). Diferenças nas concentrações de nutrientes também foram observadas por Lavrado *et al.* (1991) e Paranhos (2002), que relacionaram esse fato aos distintos níveis de poluição orgânica encontrados em cada uma das regiões desse ecossistema. A eutrofização é o pior problema pelo qual a baía vem sendo submetida (Paranhos *et al.*, 1995). A população da cidade do Rio de Janeiro produz aproximadamente 465 toneladas de Demanda Bioquímica de Oxigênio, das quais apenas 68 toneladas são tratadas de modo muito precário (FEEMA, 1990). Tanto o esgoto “*in natura*” quanto o tratado são lançados diretamente na BG, condição que contribui para agravar o seu atual estado de eutrofização. A eutrofização representa um processo natural que ocorre durante o envelhecimento de um ecossistema devido à redução do seu volume de água e a

reciclagem dos nutrientes presentes (Esteves, 1998). Dessa forma, é possível perceber que a eutrofização natural é benéfica, pois aumenta a produção primária e conseqüentemente toda a teia trófica. No entanto, quando o enriquecimento por nutrientes ocorre de um modo muito rápido e durante um curto intervalo de tempo, como o que tem sido registrado na BG, o ambiente entra em colapso provocando graves conseqüências para a biota local.

Todos os nutrientes (exceto o nitrato) apresentaram correlações negativas com a salinidade (Tabelas 2 e 5). Tais correlações indicaram que estes elementos inorgânicos sofreram diluição e remoção ao longo do estuário à medida que os pontos de coleta se aproximavam das regiões mais costeiras. Apesar de terem sido negativas, as correlações com o nitrito (Tabela 5) não foram significativas, fato que talvez possa ser explicado pela instabilidade do composto, de natureza intermediária entre a amônia e o nitrato (Libes, 1992). É interessante destacar também o padrão inverso de distribuição do nitrato ao longo do canal de circulação, com os maiores valores tendo sido registrados nas áreas mais externas à baía. Diferenças nas concentrações e nas formas de nitrogênio ao longo do estuário indicam a ocorrência do processo de nitrificação em suas águas. Esse processo é mais elevado em águas oxigenadas (Könneke *et al.*, 2005) e foi previamente descrito para a BG por Paranhos *et al.* (1998, 2001). A nitrificação é principalmente realizada por dois grupos filogeneticamente distintos de bactérias quimioautotróficas (Bothe *et al.*, 2000): as bactérias oxidantes de amônia transformam a amônia em nitrito que é subseqüentemente convertido a nitrato por microrganismos oxidantes de nitrito (Mobarry *et al.*, 1996). Vários estudos disponíveis na literatura têm demonstrado os efeitos do oxigênio sobre a atividade das bactérias nitrificantes (Ye & Thomas, 2001), indicando que a oxidação da amônia normalmente não é realizada em baixa oxigenação. Esse grupo de microrganismos foi um pouco melhor estudado durante o presente estudo e os resultados são discutidos no item 7.3.

Como citado anteriormente, as regiões mais internas da baía são caracterizadas por apresentar um longo tempo de residência, que associado às altas taxas de decomposição da matéria orgânica por bactérias heterotróficas, contribui significativamente para diminuir os níveis de oxigênio da água. Tais condições dificultam a atividade de nitrificação e podem explicar os valores elevados de nitrogênio amoniacal (Figura 8 e Tabela 3) encontrados nas estações mais internas. O oposto foi verificado nas áreas mais externas da baía, onde a eficiência do processo é estimulada pelos maiores níveis de oxigenação. As correlações positivas obtidas entre o nitrato e o OD ( $r = 0,20$ , Tabela 2;  $r = 0,19$ , Tabela 5) e o nitrato e a salinidade ( $r = 0,03$ , Tabela 2;  $r = 0,70$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5) suportam a explicação acima. Cabe também ressaltar que a variabilidade dos nutrientes ao longo do gradiente estuarino da BG

pode ainda ser atribuída às variações em suas concentrações nos rios antes do desague na baía, à sua transferência entre as fases dissolvida e particulada na coluna d'água, e à sua deposição nos sedimentos (Paranhos, 2002).

Os resultados obtidos estiveram dentro da faixa de valores previamente descritos para a BG (Gonzalez *et al.*, 2000; Paranhos *et al.*, 2001; Paranhos, 2002): <0,05 a 311,52  $\mu\text{M}$  de amônia, 0,05 a 4,54  $\mu\text{M}$  de nitrito, <0,05 a 10,97  $\mu\text{M}$  de nitrato, 0,65 a 520,82  $\mu\text{M}$  de nitrogênio total, <0,02 a 22,5  $\mu\text{M}$  de ortofosfato, 0,02 a 27,48  $\mu\text{M}$  de fósforo total, e de 0,4 a 176,8  $\mu\text{M}$  de silicato, que confirmaram o padrão de distribuição espacial observado no presente trabalho. Através dos resultados é possível perceber que os níveis de eutrofização da BG são mais elevados que aqueles encontrados em outros sistemas aquáticos brasileiros, tais como a baía de Santos (Braga *et al.*, 2000) e a baía de Paranaguá (Knoppers *et al.*, 1987; Brandini *et al.*, 1988). Até mesmo quando comparada com outros ambientes do mundo, como por exemplo, a baía de São Francisco (Murrell *et al.*, 1999), a baía de Chesapeake (Harding & Perry, 1997) e o Mar Báltico (Pinhassi & Hagström, 2000), a BG ainda é considerada um dos sistemas aquáticos com maiores níveis de poluição. Por exemplo, os níveis de ortofosfato (0,01 a 10  $\mu\text{M}$ ) e de amônia (0,1 a 50  $\mu\text{M}$ ) encontrados na baía de Izmir, Turquia, por Kucuksezgin *et al.* (2006) estiveram bem abaixo do que aqueles descritos para a BG.

De um modo geral, os elementos inorgânicos, principalmente a amônia, o nitrogênio total e o fósforo total, foram maiores nos meses de inverno. Esses resultados talvez possam ser explicados pela menor diluição das águas da baía que normalmente é registrada na estação seca. De acordo com Mayr *et al.* (1989), tal condição ocorre em resposta aos níveis de precipitação que tendem a diminuir durante essa época do ano. Além disso, a ausência de estratificação termal na coluna d'água em decorrência dos menores valores de temperatura, ainda tornam possível uma circulação vertical mais homogênea, explicando os resultados mais elevados de nutrientes que foram encontrados nos meses de inverno (Mayr *et al.*, 1989). Como foi possível perceber, os dados de silicato também apresentaram uma forte tendência sazonal, com os maiores valores sendo observados durante a época chuvosa. Esses valores confirmam o grande aporte de águas fluviais na BG, principalmente após as fortes chuvas de verão, quando a influência da bacia de drenagem aumenta dentro desse ecossistema.

Como observado para outros estuários do mundo, os gradientes físicos e químicos encontrados na BG contribuíram para gerar padrões espaciais distintos nos parâmetros bacterianos desse ecossistema, que foram típicos de águas estuarinas misturadas e se relacionaram bem com as condições tróficas de cada uma das áreas estudadas. Como citado anteriormente, a salinidade nos estuários é uma consequência do balanço entre o aporte de

águas dulcícolas e a influência da maré. Estudos sobre regulação realizados por Solic & Krstulovic (1992) têm demonstrado que as águas marinhas exercem uma ação adversa sobre a sobrevivência de bactérias alóctones, podendo conseqüentemente explicar os menores resultados de abundância e atividade bacterianas encontrados nas estações mais oceânicas. Além disso, as áreas mais externas da BG ainda estão sujeitas a uma maior influência das marés que promovem uma grande variabilidade na qualidade das águas e uma maior diluição/remoção dos microrganismos. As diferenças espaciais citadas acima foram confirmadas pelas correlações significativamente negativas observadas entre as bactérias totais e a salinidade ( $r = -0,42$ , Tabela 2;  $r = -0,80$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5) e a atividade bacteriana e a salinidade ( $r = -0,68$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = -0,52$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5).

Outros fatores ambientais, tais como a disponibilidade de nutrientes, covariam com a salinidade e também podem controlar a distribuição bacteriana (Schultz *et al.*, 2003). No presente trabalho uma forte correspondência entre os níveis de nutrientes e a distribuição das bactérias (Tabelas 2 e 5) foi detectada. Os maiores resultados de abundância e atividade bacterianas foram encontrados nas regiões mais internas e mais eutrofizadas desse ecossistema. Esses resultados estiveram de acordo com aqueles descritos por Paranhos (2002) que estudando a BG no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000 obtiveram os maiores valores médios de abundância ( $1,01 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) e atividade bacteriana ( $7,35 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) na região mais poluída e menos salina da baía.

Esse padrão conservativo de distribuição das bactérias em relação ao gradiente trófico e de salinidade também foi observado por outros pesquisadores. Por exemplo, Farjalla (1998), trabalhando com amostras de água provenientes de quatro lagoas costeiras de Macaé, norte do estado do Rio de Janeiro, encontrou valores de atividade bacteriana que variaram de 0,11 a  $1,27 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, para o ambiente mais oligotrófico e para o mais eutrofizado. Por sua vez, Gonzalez *et al.* (2006), analisando o número de bactérias presentes na Lagoa Rodrigo de Freitas e nas praias de Ipanema e do Leblon, observaram valores que variaram entre  $6,9 \times 10^6$  e  $3,2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> dependendo do grau de eutrofização de cada uma das áreas de coleta. Joux *et al.* (2005) estudando a influência do rio Rhône na costa do Mar Mediterrâneo, verificaram que a abundância do bacterioplâncton diminuiu ao longo da pluma fluvial ( $1,5 \times 10^6$  a  $0,3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>) com o aumento da salinidade. Da mesma maneira, Hoppe *et al.* (1998) trabalhando em três regiões do fiorde Schlei, localizado ao norte da Alemanha, obtiveram valores de atividade bacteriana variando entre 0,0013 e  $0,022 \mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente, nas áreas mais e menos salinas.

De acordo com Azam *et al.* (1983) e Kolm *et al.* (1997), as bactérias são mais abundantes em associação à matéria orgânica em suspensão, representando, portanto, um excelente indicador de poluição ambiental quando são encontradas em grandes números populacionais. É interessante ressaltar que além dos compostos químicos, os efluentes domésticos também são fontes de microrganismos que apesar de não serem originários do ambiente, podem permanecer ativos e se proliferarem dentro da baía (Cébron *et al.*, 2003). Como descrito anteriormente, a BG recebe diariamente grandes quantidades de materiais particulados em suspensão através dos rios e dos efluentes antrópicos. Segundo Azam & Long (2001), os materiais particulados em suspensão apresentam uma grande diversidade microbiana e um intenso metabolismo heterotrófico devido à presença de enzimas digestivas secretadas por inúmeros microrganismos associados que degradam a matéria orgânica ligada a essas partículas. As correlações positivas observadas entre o MPS e os nutrientes (Tabelas 5) e o MPS e a abundância de bactérias totais ( $r = 0,01$ , Tabela 5) confirmam o descrito acima e podem explicar os elevados valores de bactérias encontrados nas regiões mais internas da baía.

Os parâmetros bacterianos também acompanharam o padrão de distribuição da clorofila *a* ao longo do estuário. Como descrito para outros ambientes estuarinos (Hoch & Kirchman, 1993; Sañudo-Wilhelmy & Taylor, 1999; Murrel, 2003), as correlações positivas encontradas entre a abundância bacteriana e a clorofila ( $r = 0,90$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = 0,72$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5), e a atividade bacteriana e a clorofila ( $r = 0,83$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5) sugerem que os parâmetros bacterianos estiveram fortemente relacionados a produtividade primária. Dados disponíveis na literatura indicam que os produtos de origem fotossintética são preferencialmente utilizados pelas bactérias como fonte de energia enquanto captam nutrientes do meio para a realização de suas atividades metabólicas (Azam *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1988; Hoch & Kirchman, 1993). Essa relação foi verificada, por exemplo, por Zdanowski & Figueiras (1999), que trabalhando na Ría de Vigo, na Espanha, confirmaram que as bactérias são os principais consumidores primários dos ecossistemas aquáticos. Os altos valores de abundância e atividade bacterianas encontrados nas regiões mais internas da baía, os elevados teores de clorofila *a* e as correlações positivas (Tabelas 2 e 5) observadas entre eles ainda sugerem que tanto as populações bacterianas quanto as fitoplanctônicas da BG crescem em resposta ao mesmo fator ambiental, provavelmente a disponibilidade de nutrientes.

Esse mesmo padrão de distribuição também foi observado na BG por Paranhos *et al.* (2001) e Paranhos (2002). O comportamento das bactérias em relação ao fitoplâncton também

foi descrito em outros ambientes naturais (Cole *et al.*, 1988; Sañudo-Wilhelmy & Taylor, 1999; Corzo *et al.*, 2005; Joux *et al.*, 2005). Por exemplo, Corzo *et al.* (2005) verificaram que o número de bactérias presentes nos estreitos Drake, Bransfield e Gerlache oscilaram entre  $0,78$  e  $9,4 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> estando positivamente correlacionado ao estoque de clorofila *a* dessas regiões da Antártica. No estudo realizado por Andrade *et al.* (2004), esses autores encontraram valores de abundância e atividade bacterianas variando de  $2,1$  a  $9,7 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> e de  $0,0046$  a  $1,266$  µgC.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente nas áreas de menor e maior concentração de clorofila *a* do Oceano Atlântico Sudoeste, confirmando dessa maneira que o material de origem fotossintética é um importante substrato para o crescimento microbiano.

Correlações positivas também foram observadas entre a abundância e a atividade bacterianas ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = 0,50$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5), sugerindo que o aumento no número celular esteve fortemente relacionado à atividade metabólica. Isto significa que os fatores de crescimento que condicionam o metabolismo bacteriano influenciam as taxas de divisão celular provocando um aumento na população de bactérias (Billen *et al.*, 1990). Através da citometria em fluxo foi possível perceber que dois sub-grupos bacterianos ocorreram na BG, com predomínio de células HNA. O forte sinal de fluorescência apresentado por essa população é considerado por Troussellier *et al.* (1999) como indicativo de uma elevada atividade bacteriana, e por isso, seus percentuais vêm sendo utilizados como indicadores da presença de células ativas em diversos ambientes (Jellet *et al.*, 1996; Gasol *et al.*, 1999). Estudos sobre taxas de incorporação de <sup>3</sup>H-leucina em células separadas por citometria em fluxo têm confirmado que as bactérias HNA são os membros ativos da comunidade microbiana aquática, responsáveis pela maior parcela da produção de biomassa bacteriana (Longnecker *et al.*, 2006).

Portanto, o sub-grupo HNA é constituído por células maiores que apresentam uma elevada taxa de crescimento, ocorrendo predominantemente em áreas com grande disponibilidade de nutrientes, como por exemplo, o canal da Maré (83,4%) e a praia de Ramos (77,1%) (Troussellier *et al.*, 1999; Lebaron *et al.*, 2001). Isso foi confirmado pelas correlações positivas observadas entre essas células e os teores de nutrientes e de clorofila *a* ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 2;  $r = 0,72$ ,  $p < 0,05$ , Tabela 5), fato que explica o decréscimo nos percentuais de bactérias HNA com a proximidade do oceano. Tais correlações também foram descritas para outros ambientes aquáticos. Corzo *et al.* (2005) demonstraram a relação positiva entre as populações de células HNA e os níveis de clorofila no ecossistema Antártico, enquanto que Nishimura *et al.* (2005), estudando a distribuição sazonal do

bacterioplâncton do Lago Biwa, no Japão, observaram que a composição deste grupo é fortemente afetada pela disponibilidade de fósforo.

Por sua vez, o grupo LNA é constituído por células menores e pouco fluorescentes, características que refletem a baixa taxa metabólica e de crescimento desses microrganismos (Gasol *et al.*, 1999). De acordo com Gasol *et al.* (1999), esse sub-grupo é representado por pequenos procariotos ativos, por microrganismos mortos (células inteiras ou em pedaços, que não são capazes de crescer mesmo quando postas nas melhores condições nutricionais possíveis) ou dormentes (células inativas mas capazes de reassumir crescimento se colocadas em ambientes ricos em nutrientes). A observação de células com estas condições fisiológicas deve-se a grande capacidade do fluorocromo Syto13 de se associar aos ácidos nucleicos (Lebaron

Dessa maneira, o exposto acima talvez explique os maiores percentuais de células LNA que foram encontrados nas regiões mais externas da BG. É interessante ressaltar que existem evidências na literatura de que os grupos HNA e LNA são constituídos pelos mesmos filotipos microbianos, que diferem apenas no nível de atividade metabólica (Gasol & del Giorgio, 2000; Lebaron *et al.*, 2001; Servais *et al.*, 2003).

A presença de populações diferindo em seus conteúdos aparentes de ácidos nucléicos é característica das comunidades bacterianas pelágicas (Corzo *et al.*, 2005) e têm sido observada em diversos outros ecossistemas aquáticos (Jellett *et al.*, 1996; Gasol *et al.*, 1999; Gasol & del Giorgio, 2000). Marie *et al.* (1997), analisando amostras provenientes do canal Inglês e do Mar Mediterrâneo, na França, verificaram a dominância de duas populações bacterianas dentro desses corpos d'água, populações essas que estiveram fortemente relacionadas ao grau de eutrofização de cada um dos ambientes. Gasol *et al.* (1999) descreveram proporções de células HNA variando entre 15% nas contagens de bactérias totais do Oceano Atlântico a mais de 95% em reservatórios eutrofizados. Esses microrganismos também dominaram as águas ricas em nutrientes da costa do Mar Mediterrâneo (Servais *et al.*, 2003) e da Bacia de Bedford, no Canadá (Li & Dickie, 2001), representando, respectivamente, 63 a 70% e 58 a 78% das bactérias totais encontradas nesses sistemas. Por sua vez, Gonzalez *et al.* (2006) encontraram, respectivamente, 66% e 53% de células HNA e LNA em seu estudo realizado na Lagoa Rodrigo de Freitas no Rio de Janeiro. Já o predomínio de bactérias LNA (57%) no Oceano Atlântico sudoeste e os maiores percentuais de células HNA na BG foram previamente descritos no trabalho de Andrade *et al.* (2003).

Os dados de HNA e LNA relatados no presente estudo estiveram de acordo com aqueles descritos por Paranhos (2002). Trabalhando na BG durante o período de janeiro de 1999 a dezembro de 2000, esse autor encontrou valores de bactérias HNA e LNA, oscilando respectivamente, de  $1,11 \times 10^4$  a  $1,33 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> e de  $1,44 \times 10^5$  a  $6,35 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Assim como neste trabalho, seu maior resultado também foi obtido na área hipereutrofizada e o menor, na estação menos eutrófica.

Embora a atividade bacteriana não tenha apresentado uma distribuição sazonal clara, os dados de bactérias totais, HNA e LNA foram mais elevados na época chuvosa (verão). Esses resultados confirmaram a forte influência da bacia de drenagem na BG. Como citado anteriormente, fortes chuvas torrenciais normalmente acontecem durante os meses quentes de verão (Paranhos & Mayr, 1993). Dessa forma, o grande aporte de águas continentais, ricas em microrganismos, entram na baía através dos rios, aumentando o número de bactérias nesse ambiente. As correlações positivas com a temperatura corroboram esse padrão de distribuição

das bactérias ao longo das estações do ano (Tabela 5). Os dados obtidos no presente estudo foram bastante semelhantes aos de Paranhos (2002) que também encontrou as maiores abundâncias bacterianas no verão. Esta tendência sazonal das bactérias também foi observada na Bacia de Bedford, no Canadá (Li & Dickie, 2001) e no mar Mediterrâneo (Rodrigues *et al.*, 2000), onde os ciclos de abundância do bacterioplâncton estiveram correlacionados aos ciclos anuais de temperatura.

Através desse estudo foi possível perceber uma separação entre os resultados dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos obtidos na BG durante o período de verão e de inverno. Tal separação foi confirmada pela análise de componentes principais, que indicou que depois do gradiente de poluição, a variação sazonal representa o segundo fator mais importante para explicar a variabilidade dos dados de qualidade de água da baía.

## **7.2 – Diversidade bacteriana**

Estudos sobre biodiversidade podem focar diversas escalas geográficas (do molecular ao global) e biológicas (de população a comunidades), sendo normalmente realizados através de uma visão interdisciplinar. A biodiversidade está relacionada com a diversidade dos seres vivos e dos ecossistemas sendo representada pela diversidade genética, de espécies e de habitats (Garcia, 1995; Clementino, 2006). De uma maneira geral, esses trabalhos enfatizam principalmente as plantas e os animais, sendo dada pouca atenção aos microrganismos. Apesar disso, a diversidade microbiana é muito grande e ainda bastante desconhecida (Pedrós-Alió, 2006). Portanto, a aquisição de informações a respeito da diversidade microbiana é de grande importância, pois permitirá que novas possíveis formas de metabolismo sejam descobertas. Além disso, estudos sobre diversidade microbiana são de fundamental importância para se melhor entender os mecanismos evolutivos e descobrir microrganismos potencialmente exploráveis na medicina, na indústria e em processos biotecnológicos.

A diversidade é normalmente avaliada através de índices que fornecem uma medida conjunta de dois componentes: a riqueza de espécie que considera o número total de espécies presentes em um determinado ambiente e a abundância relativa dessas diferentes espécies. No entanto cabe ressaltar, que atualmente, duas questões sobre diversidade vêm sendo fortemente debatidas entre os pesquisadores dedicados ao estudo da ecologia microbiana. Uma delas é a respeito de como se deve definir espécie bacteriana (Acinas *et al.*, 2004; Giovannoni & Stingl, 2005), um assunto de grande controvérsia. Em microbiologia, o conceito de espécie é definido

através da hibridização DNA-DNA (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt *et al.*, 2002). A partir dessa metodologia, dois microrganismos são considerados como sendo da mesma espécie quando apresentam mais que 70% de similaridade entre os seus DNAs. Apesar de ser muito útil, a técnica de hibridização exige que os microrganismos a serem comparados estejam isolados, o que a torna difícil de ser utilizada em estudos ambientais. De acordo com Joux & Lebaron (1995), as bactérias cultiváveis representam apenas 1% do número de bactérias totais presentes nos ecossistemas aquáticos. Dessa forma, vários pesquisadores têm sugerido que a definição de espécie microbiana seja baseada na seqüência gênica dos microrganismos (Gevers *et al.*, 2005). Conseqüentemente, em estudos ambientais as espécies bacterianas são normalmente definidas com base no gene estrutural presente na sub-unidade pequena do ribossomo (SSU rDNA) (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Segundo essa definição, duas cepas bacterianas são consideradas como sendo da mesma espécie quando apresentam mais que 97% de similaridade entre as bases nitrogenadas do gene 16S. Apesar da importância, estudos disponíveis na literatura têm demonstrado que o 16S rDNA não possui resolução adequada para delinear espécie e estudos taxonômicos baseados nesse gene podem acabar subestimando o verdadeiro número de espécies bacterianas de um ambiente (Stackebrandt & Goebel, 1994). O presente estudo apresenta uma visão global da diversidade bacteriana existente ao longo do gradiente estuarino da BG e, portanto, uma definição de espécie não seria necessária. Estudos como este normalmente tem avaliado a diversidade bacteriana com base em outras unidades, como por exemplo, o número de bandas em um gel de eletroforese com gradiente desnaturante (DGGE) ou o número de clones em uma biblioteca genômica (Pedrós-Alió, 2006). Dessa forma, os resultados são agrupados em Unidades Taxonômicas Operacionais (do inglês “Operational Taxonomic Units” - OTUs), categorias que de acordo com Pedrós-Alió (2006) são mais adequadas para serem utilizadas em estudos de microrganismos.

O outro assunto que vêm sendo questionado refere-se à quantidade ótima de seqüências que devem ser analisadas para que uma avaliação adequada da diversidade microbiana de um sistema seja realizada (Kemp & Aller, 2004b; Acinas *et al.*, 2004). Para isso, uma distinção entre os termos diversidade e biodiversidade se faz necessária. Segundo os conceitos propostos por Margalef (1994), biodiversidade significa a informação taxonômica total de um ecossistema, enquanto que a diversidade representa o inventário dos componentes mais abundantes que estão presentes em um determinado ambiente durante um momento específico. Portanto, as espécies de microrganismos em crescimento ativo, bem adaptados às condições de um determinado ambiente, que são encontrados durante todo o tempo e em altas

abundâncias, representam a diversidade microbiana desse sistema. Cabe, no entanto ressaltar que dentro de um corpo d'água também existem espécies raras, ou seja, microrganismos que apresentam crescimento lento e ocorrem em baixos números populacionais. Apesar de possuírem tais características, as espécies raras podem se tornar abundantes caso as condições ambientais mudem e se tornem mais adequadas para o seu crescimento. Da mesma forma, em condições adversas, as espécies dominantes também podem acabar se tornando raras. Então, por definição, as espécies raras juntamente com aquelas abundantemente encontradas, constituem a biodiversidade de um ambiente (Pedrós-Alió, 2006).

A diversidade bacteriana normalmente é determinada através de métodos moleculares após amplificação do gene ribossomal 16S pela técnica do PCR. Para esse tipo de amplificação, iniciadores universais específicos para o domínio Bacteria são utilizados. Diversos estudos têm demonstrado que esses iniciadores hibridizam predominantemente com os genes encontrados em maiores quantidades na amostra, sendo as técnicas dependentes de PCR capazes apenas de detectar as espécies que representam mais que 1% do número de bactérias totais presentes no ambiente (Muyzer *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 2000). De acordo com Pedrós-Alió (2006), estudos que objetivam avaliar os aspectos funcionais de um determinado ecossistema devem enfatizar somente os organismos mais representativos, ou seja, uma parcela da biodiversidade. O presente trabalho apresenta informações sobre a diversidade bacteriana da BG obtidas a partir de técnicas de clonagem e sequenciamento gênico. Nesse caso, apenas as Unidades Taxonômicas Operacionais mais abundantes foram enfatizadas. Segundo Sogin *et al.* (2006), essas informações são suficientes para uma descrição das funções básicas do ecossistema e para identificar os principais grupos bacterianos envolvidos na cadeia trófica e na ciclagem biogeoquímica.

Através dos resultados foi possível perceber que a comunidade de bactérias presentes na BG é bastante diversa. Assim como observado para outros estuários do mundo (Crump *et al.*, 2004; Hewson & Fuhrman, 2004; Kan, 2006), a composição da comunidade bacteriana da BG também sofreu alteração ao longo do gradiente estuarino estando fortemente relacionada às condições de qualidade de água de cada uma das áreas estudadas. Alguns grupos foram cosmopolitas, enquanto que outros ocorreram exclusivamente em determinadas áreas da baía. A BG é um ecossistema dinâmico submetido a um grande aporte continental (rios e efluentes antrópicos) e oceânico (ação das marés). Devido a presença de inúmeros aterros, os padrões de mistura são diferenciados dentro da baía, podendo ocorrer tempos de residência de até 20 dias nas regiões de menor circulação de águas (FEEMA, 1990). Tais condições são suficientes para promover diferenciação de nichos o que poderia explicar a hetero

bacterioplâncton encontrado na BG. A relação entre a renovação hídrica e a composição da comunidade bacteriana também foi verificada no estuário do rio Parker, EUA, por Crump *et al.* (2004).

De um modo geral o grupo das alfa-Proteobacterias dominou as águas da BG, com 130 das 374 sequências totais obtidas. Apesar de ter sido encontrado em todos os 3 ambientes estudados, esse grupo bacteriano apresentou seus maiores e menores percentuais, respectivamente, na estação 5K (52,5%) e no canal da Maré (9,8%). Segundo Gonzalez & Moran (1997), as alfa-Proteobacterias são numericamente abundantes em águas costeiras, sendo detectadas em pequenos percentuais nos ambientes dulcícolas ou com baixos valores de salinidade. Os resultados estiveram de acordo com aqueles obtidos por Selje *et al.* (2005), que trabalhando no estuário Weser, na Alemanha, também verificaram o predomínio das alfa-Proteobacterias. Assim como observado na BG, os maiores percentuais de ocorrência também foram encontrados nas áreas marinhas e os menores nas regiões de grande aporte continental, onde esse grupo bacteriano representou, respectivamente, 83% e 27% dos dados totais.

É interessante destacar que uma grande quantidade de sequências de alfa-Proteobacterias encontradas na BG esteve relacionada à bactéria *Pelagibacter ubique*, um microrganismo constantemente observado em bibliotecas genômicas de ecossistemas marinhos e estuarinos (Field *et al.*, 1997; Rappé *et al.*, 1997). *Pelagibacter ubique*, o primeiro membro cultivado do grupo SAR11 (Rappé *et al.*, 1997; Venter *et al.*, 2004), cresce preferencialmente em condições oligotróficas, duplicando sua população a cada 29 horas. Por apresentar um número elevado de transportadores em sua superfície celular, essa bactéria é capaz de captar de modo eficiente os nutrientes do meio, incorporando-os em sua biomassa, até mesmo quando eles estão presentes em baixas quantidades (Rappé *et al.*, 2002). Além disso, a bactéria *Pelagibacter ubique* ainda apresenta a capacidade de metabolizar diferentes fontes disponíveis de carbono (Giovannoni *et al.*, 2005), característica que lhe confere uma vantagem adaptativa explicando, talvez, a sua grande abundância e distribuição cosmopolita.

Por sua vez, as beta-Proteobacterias ocorreram em baixos percentuais (2,1%) e somente na estação BI. Uma vez que a maioria de seus componentes apresenta baixa taxa de sobrevivência em águas com salinidade acima de 10 S (Painchaud *et al.*, 1995), esse grupo bacteriano é predominantemente encontrado em ambientes dulcícolas (Glöckner *et al.*, 1999). Apesar de pouco observadas nas bibliotecas genômicas de ecossistemas marinhos, as beta-Proteobacterias foram encontradas na costa de Oregon, EUA, por Suzuki *et al.* (1997). Bactérias oxidantes de amônia desta subclasse também foram descritas por Voytec & Ward (1995) em am

tenham observado através de análises químicas a ocorrência do processo de nitrificação nas águas da BG, nenhuma sequência relacionada a bactérias oxidantes de amônia foram recuperadas nas bibliotecas 16S desse ecossistema. A ausência de sequências relacionadas a esse grupo de microrganismos ecologicamente importantes talvez possa ser explicada pelo seu baixo número populacional em relação à abundância bacteriana total. Isso conseqüentemente dificulta a recuperação do DNA desses microrganismos e a sua subsequente amplificação pela técnica de PCR. Dessa forma, estudos que objetivam avaliar as bactérias oxidantes de amônia presentes em um ambiente normalmente utilizam iniciadores específicos para esse grupo microbiano (Rotthauwe *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). No presente estudo as bactérias oxidantes de amônia da subclasse das beta-Proteobacteria foram avaliadas mais detalhadamente pela utilização de iniciadores específicos para o gene marcador *amoA*. A discussão dos resultados obtidos é apresentada no capítulo 7.3.

Assim como as alfa, as gama-Proteobacterias também foram bastante abundantes nas águas da baía, com 69 das 374 sequências recuperadas. O predomínio desse grupo bacteriano também foi observado em outros ecossistemas aquáticos do mundo. Por exemplo, Eilers *et al.* (2001), estudando a comunidade bacteriana do Mar do Norte, verificaram que as gama-Proteobacterias representaram 10 a 20% das contagens totais obtidas através de FISH. No trabalho realizado por Kisand & Wikner (2003), esse grupo microbiano dominou os isolados bacterianos obtidos no Mar Báltico através de técnicas de cultivo. Na BG, essa subclasse esteve presente nas três bibliotecas 16S, apresentando seus maiores e menores percentuais, respectivamente, na estação BI (31,3%) e no canal da Maré (6,1%). Cinco sequências relacionadas à *Nitrococcus mobilis* foram encontradas na estação BI. Esses microrganismos estão envolvidos na oxidação do nitrito a nitrato e sua ocorrência nas águas da baía suportam a idéia sobre a presença do processo de nitrificação dentro desse ecossistema. Uma grande quantidade de filotipos associados à degradação de petróleo, tais como *Neptunomonas naphthovorans*, *Oceanospirillum kriegii* e *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* também foram encontrados nas estações BI e 5K. A possível presença de espécies com essas características nas águas da baía indica a adaptação da comunidade microbiana aos incidentes periódicos com óleo e gasolina, e aos derrames acidentais com petróleo que acontecem nesse ambiente (Paranhos & Ximenez, 2000; Meniconi *et al.*, 2002; Meniconi & Barbanti, 2007). Esses microrganismos possuem um sistema celular sofisticado que os possibilita utilizar hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia. Bactérias degradadoras de petróleo da subclasse das gama-Proteobacterias também foram identificadas nos estuários dos

rios Tâmbisa por McKew *et al.* (2007) e Ria de Aveiro, em Portugal, por Henriques *et al.* (2004).

Ao contrário das alfa- e das gama-, as delta- e as epsilon-Proteobacterias não apresentaram uma distribuição cosmopolita, ocorrendo apenas em áreas específicas da baía. Delta-Proteobacterias, por exemplo, foram observadas em baixos percentuais e somente nas estações BI (1,4%) e 5K (5,1%). Já as epsilon-Proteobacterias foram identificadas no canal da Maré (1,2%) e no ponto BI, onde constituíram o terceiro grupo de maior dominância dessa última região (16,7%). As sequências obtidas estiveram relacionadas à *Arcobacter nitrofigilis*, uma bactéria de vida livre fixadora de nitrogênio, que já foi observada em ecossistemas estuarinos ricos nesse elemento (Alfourtit *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2004). Apesar de presentes em tais ambientes, pouco se sabe até o momento sobre os fatores que controlam a distribuição espacial e vertical desses microrganismos. Além disso, o papel dessas bactérias na dinâmica e ciclagem dos nutrientes também não está bem definido (Zehr *et al.*, 2003). É interessante, no entanto, ressaltar que a presença de organismos com determinadas capacidades metabólicas dentro de um corpo d'água, não significa necessariamente que eles estejam realizando tais atividades. Isso foi constatado, por exemplo, no estudo realizado por Jenkins *et al.* (2004) na baía de Chesapeake, um ecossistema que apresenta limitação de nitrogênio em algumas épocas do ano. Esses autores, trabalhando com o gene *nifH*, um dos genes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio, verificaram que os microrganismos que continham tal gene ocorreram durante todo o tempo, até mesmo quando a atividade de fixação não era detectada. Os resultados desse estudo indicaram que em determinadas épocas do ano, os microrganismos fixadores de nitrogênio que persistiam na baía de Chesapeake não fixavam o nitrogênio molecular e que a expressão do gene *nifH* estava sendo controlada por algum fator ambiental, provavelmente a alta disponibilidade do elemento (Zehr *et al.*, 2003). Com base no exposto acima é possível especular que a atividade de fixação de nitrogênio também possa estar sendo inibida na BG, o que explicaria a presença de microrganismos com esse tipo de metabolismo em águas com elevadas concentrações de amônia, como é o caso desse ecossistema.

Apesar de distribuídas por toda a baía, as bactérias do grupo das *Cytophaga* foram principalmente encontradas no canal da Maré, constituindo o segundo grupo de maior dominância dessa estação (14 das 81 sequências recuperadas). Várias sequências obtidas na BG estiveram potencialmente relacionadas à bactéria *Cytophaga fucicola*, um coco Gram negativo frequentemente encontrado em ambientes aquáticos (Pinhassi *et al.*, 1997). Bactérias do gênero *Cytophaga* produzem uma grande quantidade de enzimas extracelulares (Kirchman

*et al.*, 2004) que as tornam capazes de degradar vários tipos de substratos, como por exemplo, proteínas, carboidratos e diversas macromoléculas de difícil utilização, tais como pesticidas, celulose e quitina (Glöckner *et al.*, 1999). Essas características explicam a distribuição cosmopolita desses microrganismos. As bactérias *Cytophaga* também possuem capacidade de movimentação e produzem um muco externo de polissacarídeos que facilita a adesão a partículas e a subsequente degradação da matéria orgânica em suspensão (Crump *et al.*, 1999). Como descrito anteriormente, o canal da Maré é uma região hiper-eutrofizada onde grandes quantidades de efluentes domésticos e industriais são lançadas diariamente sem tratamento prévio adequado. A alta disponibilidade de materiais orgânicos existentes nessa área da baía talvez possa explicar os resultados encontrados.

Diversos trabalhos sobre abundância bacteriana têm demonstrado que juntamente com as *Cytophaga*, as Flavobacteria constituem um dos grupos mais numerosos dos ecossistemas aquáticos (Cottrell & Kirchman, 2000). Esses microrganismos também utilizam vários tipos de substratos orgânicos o que explica sua ampla distribuição geográfica (Kirchman, 2002). Nas bibliotecas 16S da BG, membros dessa classe representaram 7,4% das seqüências totais obtidas no canal da Maré, 8,7% no BI e 7% no 5K. Apesar de terem sido encontradas em baixos percentuais, os dados de Flavobacteria obtidos no presente estudo estão de acordo com vários outros disponíveis na literatura que também objetivaram verificar a diversidade bacteriana de sistemas aquáticos através de bibliotecas rRNA (Cottrell & Kirchman, 2000; Eilers *et al.*, 2000). Cottrell & Kirchman (2000), por exemplo, utilizaram bibliotecas SSU rDNA e contagens por FISH, para comparar a composição da comunidade bacterioplancônica presente na costa da Califórnia, EUA. Através da hibridização in situ com sondas fluorescentes, esses autores verificaram que bactérias da classe das Flavobacterias foram os organismos mais abundantes da região. No entanto, as bibliotecas 16S construídas com as mesmas amostras de água, indicaram a predominância das alfa-Proteobacterias e que somente 5 dos 169 clones obtidos durante o estudo correspondiam às Flavobacterias. Eilers *et al.* (2000) também encontraram discrepâncias entre os resultados de abundância e das bibliotecas genômicas. Esses pesquisadores não identificaram nenhuma seqüência de Flavobacteria na biblioteca 16S de uma amostra coletada no Mar do Norte, enquanto que as contagens bacterianas indicaram que esse era um dos grupos mais abundantes da estação. Da mesma forma, Kisand & Wikner (2003), estudando a comunidade bacteriana do Mar Báltico através de técnicas dependentes de cultivo, verificaram que as Flavobacterias constituíram o segundo maior grupo em dominância. De acordo com Selje *et al.* (2005), existem diversas possíveis razões que talvez expliquem tais diferenças. Estudos de filogenia molecular vêm

demonstrando que as Flavobacterias encontram-se predominantemente associadas a partículas, compreendendo uma fração muito pequena da comunidade bacteriana de vida livre (DeLong *et al.*, 1993; Crump *et al.*, 1999). Cabe lembrar que no presente trabalho, apenas a comunidade de vida livre foi analisada, o que poderia justificar os resultados encontrados na BG.

Bactérias do gênero *Bacteroides*, foram identificadas apenas no canal da Maré, com 5 dos 81 clones recuperados. A maioria desses clones esteve relacionada à espécie *Bacteroides merdae*. Os microrganismos desse gênero são todos anaeróbicos e principalmente encontrados no intestino humano, constituindo mais de 30% dos isolados fecais (Manz *et al.*, 1996). Apesar de fazer parte da microflora normal dos seres humanos, os *Bacteroides* são oportunistas, podendo causar infecções de pele, na pélvis, no tórax, no pescoço, na cabeça e no sistema nervoso central. A condição anóxica do canal da Maré favorece a ocorrência desses microrganismos e a sua presença nessa estação está de acordo com o grande aporte de esgotos domésticos nessa parte da baía (Mayr *et al.*, 1989).

Apesar das diferenças observadas ao longo do gradiente estuarino, de um modo geral as bactérias Bacteroidetes predominaram na área mais interna da baía. Esse grupo é formado pelas *Cytophaga*, *Flavobacteria*, *Flexibacter* e *Bacteroides*, e constituem uma comunidade bastante diversa. Os resultados encontrados na BG foram semelhantes àqueles obtidos por Bernhard *et al.* (2005a), que trabalhando na baía de Tillamook, em Óregon, EUA, observaram o maior predomínio de Bacteroidetes nas regiões de maior influência continental.

As Actinobacterias, também conhecidas como actinomicetos, representam um filo constituído por bactérias Gram positivas com alto teor de GC. Esses microrganismos têm sido observados em grandes quantidades nos ecossistemas terrestres onde contribuem de modo significativo para a degradação da matéria orgânica e de biopolímeros complexos, tais como a lignocelulose, a hemicelulose, a pectina, a queratina e a quitina (McCarthy & Williams, 1992). Dados disponíveis na literatura indicam que algumas Actinobacterias de solo também podem se manter metabolicamente ativas dentro de ambientes aquáticos (Moran *et al.*, 1995). Outros estudos baseados em técnicas moleculares revelaram que alguns membros dos gêneros *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Streptomyces* e *Salinospora* são autóctones dos ecossistemas marinhos (Bull *et al.*, 2005). Na BG, Actinobacterias foram observadas nos três pontos de coleta, com seus maiores percentuais de ocorrência sendo registrados no canal da Maré (13,5%), uma área submetida a grande influência continental. Esses resultados foram similares àqueles obtidos por Crump *et al.* (1999), que estudando as comunidades bacterianas presentes no rio

Columbia, EUA, no seu estuário e nas áreas oceânicas adjacentes, acabaram verificando o predomínio de Actinobacterias nas regiões de maior aporte dulcícola.

Bactérias do filo Firmicutes também foram predominantemente encontradas na estação mais poluída da BG. Esse grupo de microrganismos dominou as águas do canal da Maré (22,2%), com 18 dos 81 clones recuperados. Várias sequências estiveram relacionadas à bactérias patogênicas, como por exemplo, os *Staphylococcus*. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Agogué *et al.* (2005), que objetivando comparar a diversidade da comunidade bacteriana de duas regiões da costa do Mar Mediterrâneo bastante distintas em termos de qualidade de água, observaram que nas áreas eutrofizadas e mais oligotróficas, as bactérias Firmicutes representaram, respectivamente 29% e 10% dos grupos taxonômicos encontrados.

As cianobactérias, microrganismos de grande importância para a produtividade primária aquática, também foram observadas nas águas da baía. Bactérias fotossintetizantes do grupo dos *Synechococcus* foram encontradas apenas na estação 5K, onde representaram 6,4% das seqüências totais obtidas. Por sua vez, os *Prochlorococcus* ocorreram em todas as estações de coleta. As seqüências de *Prochlorococcus* obtidas no presente estudo estiveram relacionadas aos *Prochlorococcus marinus*, o menor organismo fotossintetizante atualmente conhecido. Essa cianobactéria é adaptada para viver em condições de baixas concentrações de nutrientes, ocorrendo em grandes números populacionais na superfície de oceanos temperados e tropicais (Sullivan *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstraram que os *Prochlorococcus marinus* dividem-se em pelo menos dois ecotipos com capacidades distintas para utilização da luz, do nitrogênio e do fósforo (DeLong & Karl, 2005; Sullivan *et al.*, 2003). Atualmente, a grande diversidade existente dentro de cada grupo microbiano vem sendo reconhecida e o termo ecotipo foi criado para designar duas ou mais populações de microrganismos fisiológica e geneticamente relacionados, porém com nichos ecológicos diferentes (Rocap *et al.*, 2003; DeLong & Karl, 2005).

Os dados observados na BG foram semelhantes aos de Bernhard *et al.* (2005a), que analisando através de bibliotecas 16S a diversidade bacteriana presente ao longo do gradiente estuarino da baía de Tillamook, em Óregon, EUA, também verificaram a maior ocorrência de cianobactérias em águas marinhas. Cabe, no entanto ressaltar que apesar dos dois gêneros de bactérias fotoautotróficas terem sido observados na estação oceânica 5K, seqüências relacionadas à *Synechococcus* foram predominantemente encontradas. Segundo informações descritas na literatura (Zubkov *et al.*, 2003), os *Prochlorococcus* dominam os ambientes mais oligotróficos enquanto que os *Synechococcus* ocorrem preferencialmente em áreas

mesotróficas. Apesar das diferenças existentes entre as áreas de estudo da BG, os resultados de nutrientes confirmam a forte influência desse ecossistema na qualidade trófica das águas adjacentes, o que poderia justificar a maior taxa de recuperação de *Synechococcus* na estação 5K quando comparada aos *Prochlorococcus*. Estudos realizados por PETROBRAS (2001) indicaram que em áreas oligotróficas do Oceano Atlântico sudoeste, os valores médios de ortofosfato, fósforo total e nitrato alcançam, respectivamente, 0,08, 0,28 e 2,48  $\mu\text{M}$ . Nessas regiões oceânicas, o nitrito normalmente não é detectável podendo, no entanto, atingir concentrações de 0,02  $\mu\text{M}$ .

Bactérias Planctomycetes e Verrucomicrobia também só foram observadas no ponto 5K, representando respectivamente, 0,6% e 1,2% das sequências recuperadas. Planctomycetes formam um filo dentro do domínio Bacteria caracterizado pela presença de microrganismos com uma parede celular sem peptidoglicana e um nucleóide compartimentalizado por membrana (Lindsay *et al.*, 2001). Atualmente existem quatro gêneros conhecidos de Planctomycetes: o *Planctomyces*, o *Gemmata*, o *Isophaera* e o *Pirellula*. Essas bactérias encontram-se amplamente distribuídas, tendo sido observadas em vários ecossistemas dulcícolas, marinhos, estuarinos e terrestres (Glöckner *et al.*, 1999; Pimentel-Elardo *et al.*, 2003). Apesar de contrariar o que foi citado acima, os baixos percentuais de Planctomycetes obtidos na BG foram corroborados por trabalhos como os de DeLong *et al.* (1993). Esses autores identificaram que os clones rRNA desses microrganismos ocorrem predominantemente em macroagregados, uma parcela da comunidade microbiana que não foi analisada durante o presente estudo.

Por sua vez, os clones rRNA do filo Verrucomicrobia estiveram relacionados a bactéria marinha *Fucophilus fucoidanalyticus*, um microrganismos aeróbico com capacidade de degradar fucóides (Sakai *et al.*, 2003; Descamps *et al.*, 2006). Fucóides são polissacarídeos constituídos por resíduos de fucose-L-sulfatada e produzidos por algas marrons do filo Phaeophyta. Esses resíduos têm sido bastante investigados devido ao seu potencial como anticoagulantes, como inibidores de infecções virais e até mesmo como anticancerígenos (Descamps *et al.*, 2006). Dessa maneira é possível perceber que a presença de sequências relacionadas a bactérias capazes de decompor fucóides nas águas da baía acabam demonstrando o enorme potencial biotecnológico desse ecossistema.

Os resultados encontrados na BG estão de acordo com outros disponíveis na literatura (Bouvier & del Giorgio, 2002; Crump *et al.*, 2004; Hewson & Fuhrman, 2004) que também demonstraram a heterogeneidade da comunidade bacteriana em ecossistemas estuarinos. Bouvier & del Giorgio (2002), por exemplo, verificaram as diferenças na diversidade

bacteriana ao longo do gradiente de salinidade da baía de Chesapeake através de FISH enquanto que Crump *et al.* (2004), utilizaram DGGE, para estudar a distribuição desses microrganismos no estuário do rio Parker, em Massachussetts, EUA. Portanto, as semelhanças observadas na distribuição espacial das bactérias presentes em ambientes distintos que foram analisados através de diferentes metodologias sugerem uma resposta global da comunidade microbiana aos gradientes tróficos e de salinidade dos estuários.

As diferenças espaciais encontradas na BG foram claramente evidenciadas pela análise de correspondência, que indicou uma forte correlação entre a composição da comunidade e os parâmetros ambientais. Como citado anteriormente, a região hipereutrofizada do canal da Maré apresentou as piores condições de qualidade de água, exibindo os níveis mais altos de nutrientes, clorofila *a* e MPS. Nessa estação, uma grande quantidade de sequências relacionadas a bactérias oportunistas/patogênicas foram recuperadas confirmando a forte influência antrópica nessa parte da baía. As associações estiveram de acordo com os resultados previamente descritos para o canal da Maré (Hagler & Hagler, 1981; Mayr *et al.*, 1989), uma região fortemente degradada que é anóxica a maior parte do tempo, por causa do grande lançamento de efluentes domésticos “*in natura*” e a fraca renovação hídrica. Essas condições de desequilíbrio favorecem a ocorrência de determinados grupos microbianos, provocando dessa forma, uma baixa na diversidade. O oposto foi observado na estação oceânica 5K, que devido as suas melhores condições ambientais, apresentou uma maior diversidade bacteriana.

O presente estudo, de caráter inédito para a BG, apresentou uma caracterização da comunidade bacteriana de vida livre existente nesse corpo d’água e suas variações em relação às flutuações ambientais. Através das análises de rarefação foi possível perceber que apenas uma parcela da comunidade bacteriana pôde ser analisada, sendo a diversidade de eubactérias da BG muito maior do que aquela apresentada. Por exemplo, sequências relacionadas à *Escherichia coli*, *Vibrio* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* não foram detectadas em nenhuma das bibliotecas 16S desse estudo. Apesar disso, tais microrganismos foram observados em altas densidades populacionais, respectivamente, nos trabalhos de Paranhos *et al.* (1995), Hagler *et al.* (1986) e Araújo *et al.* (1990), através de técnicas de cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos por Eilers *et al.* (2000), que trabalhando no Mar do Norte, encontraram dominância de *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Alteromonas* nos isolados ambientais, apesar de tais microrganismos não terem sido recuperados nas bibliotecas 16S desse ambiente.

Embora a diversidade bacteriana total não tenha sido analisada no presente estudo, um inventário dos principais grupos taxonômicos foi obtido e tais informações contribuem significativamente para um maior entendimento sobre a diversidade, estrutura e dinâmica da baía. A metodologia utilizada no presente estudo possibilita uma avaliação mais ampla do ambiente, permitindo inclusive a determinação de microrganismos viáveis porém não cultiváveis que estejam presentes na amostra. Através de comparação com outros estudos, foi possível perceber que a baía pode ser utilizada como modelo para se entender a distribuição espacial das comunidades bacterianas presentes em outros estuários impactados do mundo. Os dados gerados também demonstraram a presença de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos, entre eles a produção de agentes terapêuticos, enzimas e polímeros, e na biorremediação de poluentes. Cabe ainda ressaltar que uma grande quantidade de seqüências relacionadas a bactérias não cultivadas e não identificadas foram obtidas no presente estudo. Tais resultados incentivam a realização de futuros trabalhos baseados em cultivo e técnicas moleculares mais detalhadas, como por exemplo, o pirosequenciamento (Sogin *et al.*, 2006) a fim de se melhor compreender a estrutura e a dinâmica dos microrganismos presentes nesse corpo d'água.

### **7.3 – Presença de gene relacionado ao processo de nitrificação**

As análises químicas realizadas na BG durante as coletas mensais e ao longo dos “transects” confirmaram a idéia sobre a ocorrência do processo de nitrificação nas águas desse ecossistema costeiro. Apesar disso, nenhuma seqüência relacionada às bactérias oxidantes de amônia foi encontrada nas bibliotecas 16S da baía. Como discutido anteriormente (item 7.2), a ausência de seqüências relacionadas a esse grupo microbiano nas bibliotecas 16S da BG talvez possa ser explicada pelos baixos números populacionais desses microrganismos em relação à abundância bacteriana total presente no ambiente. A maioria das bactérias nitrificantes são quimioautotróficas e seu crescimento lento poderia justificar a baixa abundância relativa citada acima (Ward *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000). Esse baixo número populacional conseqüentemente favorece a hibridização dos iniciadores universais com o material genético das espécies dominantes, tornando mais difícil a amplificação do DNA de bactérias oxidantes de amônia pela técnica do PCR (Pedrós-Alió, 2006). Dessa maneira, trabalhos que objetivam determinar a presença e a diversidade das bactérias nitrificantes em amostras ambientais normalmente utilizam iniciadores específicos para esse grupo microbiano (Rotthauwe *et al.*, 1997; Bothe *et al.*, 2000).

Com base no que foi exposto acima, uma das amostras coletadas mensalmente na enseada da Urca foi selecionada a fim de que a presença e a diversidade genética das bactérias oxidantes de amônia pudessem ser determinadas. Esses microrganismos ecologicamente importantes para o ciclo global do nitrogênio realizam a primeira etapa do processo de nitrificação, convertendo a amônia em nitrito (Rotthauwe *et al.*, 1997). Tal transformação é catalisada pela enzima amônia monooxigenase (AMO), cujo sítio ativo é codificado pelo gene *amoA* (Cébron *et al.*, 2003; O'Mullan & Ward, 2005). Portanto, essa parte do estudo teve como objetivo detectar a presença do gene marcador *amoA* nas águas da BG com o propósito de identificar as bactérias relacionadas ao processo de oxidação da amônia nesse ambiente. A enseada da Urca foi escolhida como ponto de coleta por apresentar altos níveis de oxigenação, condição que favorece o processo de nitrificação (Paranhos *et al.*, 1998).

O gene marcador *amoA* vêm sendo crescentemente utilizado em estudos sobre diversidade molecular de bactérias oxidantes de amônia de ecossistemas aquáticos (Caffrey *et al.*, 2003; Cébron *et al.*, 2003; O'Mullan & Ward, 2005; Bernhard *et al.*, 2005b; Beman & Francis, 2006). Comparações com seqüências depositadas no GeneBank confirmaram que todos os clones obtidos no presente trabalho correspondiam a seqüências do gene *amoA*. As análises filogenéticas agruparam as seqüências em 29 unidades taxonômicas operacionais, que por sua vez, se dividiram em dois clusters principais. Todas as seqüências obtidas foram bastante distintas de espécies de bactérias oxidantes de amônia descritas na literatura e fortemente relacionadas a clones não cultivados e encontrados na baía de Monterey por O'Mullan & Ward (2005). De acordo com Purkhold *et al.* (2000), esse tipo de resultado é normalmente encontrado em amostras ambientais, sendo impossível definir se as seqüências obtidas representam cepas distintas de um organismo descrito ou se elas são provenientes de uma espécie não conhecida.

A baía de Monterey é um estuário semiprotégido, localizado na costa central da Califórnia, EUA, e fortemente influenciado pelas águas do Oceano Pacífico. Essa baía é constantemente afetada pela corrente fria da Califórnia e por fenômenos de ressurgência que dominam a região durante seis meses do ano (Graham & Largier, 1997). A ressurgência provocada por ventos ou pelo Canyon Submarino de Monterey fornece água rica em nutrientes para dentro da baía aumentando, conseqüentemente a produtividade desse ecossistema (Graham & Largier, 1997). No Rio de Janeiro, o fenômeno da ressurgência é normalmente observado entre setembro e março (Valentin, 1984), período em que a amostra de água para análise das bactérias oxidantes de amônia foi coletada. Tal fenômeno ocorre na região costeira de Cabo Frio e é induzido por ventos de nordeste que predominam no verão. A

fonte de ressurgência em Cabo Frio é a Água Central do Atlântico Sul (ACAS), proveniente de 200 m de profundidade e caracterizada por apresentar baixos valores de temperatura e altas concentrações de nitrato. Dados disponíveis na literatura indicam que a BG, apesar da distância, é influenciada pelas águas provenientes da ressurgência de Cabo Frio (Franchito *et al.*, 1998). Com base nisso, é possível especular que a presença de seqüências similares em áreas geograficamente distintas, tais como a BG e a baía de Monterey, sugere que fatores ambientais semelhantes, tal como a ressurgência costeira, talvez estejam regulando a comunidade de bactérias oxidantes de amônia nesses ambientes. A ocorrência de clones semelhantes em ambos os corpos d'água ainda sugere que eles são provenientes de uma espécie de microrganismo oxidante de amônia que é dominante em regiões oceânicas.

Através do presente estudo foi possível verificar a presença do gene marcador *amoA* na BG, que conseqüentemente confirmou a hipótese sobre o processo de nitrificação dentro desse ambiente. Estudos sobre a dinâmica dos nutrientes, principalmente os compostos nitrogenados, e sobre a diversidade microbiana envolvida em tais processos são de grande importância para determinar o impacto da poluição na BG e avaliar o seu potencial de auto-recuperação. Os resultados obtidos contribuem para aumentar o conhecimento a respeito de um processo ecologicamente importante, fornecendo, pela primeira vez, informações sobre as bactérias oxidantes de amônia na baía de Guanabara. Apesar disso, avaliações mais detalhadas devem ser realizadas para se obter uma maior compreensão sobre as taxas de nitrificação e a diversidade microbiana presente nesse ambiente. A observação de um grande número de clones relacionados a organismos não cultivados também reforça a extrema necessidade para o desenvolvimento de novas metodologias de cultivo e um maior esforço no sentido de se descrever tais microrganismos.

## 8 - Conclusões

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

⇒ A Baía de Guanabara é um importante ecossistema costeiro onde os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos variam ao longo do gradiente trófico e de salinidade, assim como entre as épocas do ano. Maiores valores de abundância e atividade bacteriana foram encontrados nas áreas mais internas da baía, caracterizadas por apresentar um maior nível de eutrofização e pela presença de águas menos salinas.

⇒ A comunidade bacteriana presente na Baía de Guanabara é bastante diversa e constituída por populações mistas de origem dulcícola, estuarina e marinha. A composição da comunidade bacteriana sofreu alteração ao longo do estuário e esteve relacionada às condições de qualidade de água de cada uma das áreas estudadas. Um maior número de clones deve ser seqüenciado a fim de se verificar a diversidade de eubactérias presentes em cada uma dessas áreas e verificar as diferenças existentes entre elas.

⇒ A presença do gene marcador *amoA* na Baía de Guanabara, e o primeiro registro da biodiversidade de bactérias oxidantes de amônia nesse ambiente, pode sugerir novas hipóteses sobre o processo de nitrificação.

## Referências Bibliográficas

- Aas, P.; Lyons, M.M.; Pledger, R.; Mitchell, D.L. & Jeffrey, W.H., 1996. Inhibition of bacterial activities by solar radiation in nearshore waters and the Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.*, 11: 229-238.
- Acinas, S.G.; Klepac-Ceraj, V.; Hunt, D.E.; Pharino, C.; Ceraj, I.; Distel, D.L. & Polz, M.F., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature*, 430: 551-554.
- Affourtit, J.; Zehr, J.P. & Paerl, H.W., 2001. Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuse River estuary, North Carolina. *Microb. Ecol.*, 41: 114-123.
- Agogué, H.; Casamayor, E.O.; Bourrain, M.; Obernosterer, I.; Joux, F.; Herndl, G.H. & Lebaron, P., 2005. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54 (2): 269-280.
- Amador, E.S., 1980. Assoreamento da Baía de Guanabara – Taxas de sedimentação. *An. Acad. Bras. Cienc.* 52 (4): 723-742.
- Amador, E.S., 1997. *Baía de Guanabara e ecossistemas periféricos: homem e natureza*. Reproarte Gráfica e Editora, Rio de Janeiro, 539 pp.
- Amann, R.I.; Binder, B.J.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R. & Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- Amann, R.I.; Ludwig, W. & Schleifer, K-H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59 (1): 143-169.
- Andrade, L.; Gonzalez, A.M.; Araujo, F.V. & Paranhos, R., 2003. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. *J. Microbiol. Methods* 19: 89-94.
- Andrade, L.; Gonzalez, A.M.; Valentin, J.L. & Paranhos, R.; 2004. Bacterial abundance and production in the southwest Atlantic Ocean. *Hydrobiologia*, 511: 103-111.
- Araujo, M.A.; Guimarães, V.F.; Mendonça-Hagler, L.C.S. & Hagler, A.N., 1990. *Staphylococcus aureus* and fecal streptococci in fresh and marine surface waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 21 (2): 141-147.
- Araújo, F.V.; Van Weerelt, M.D.M.; Franco, G.M.O.; Soares, C.G.A.; Hagler, A.N. & Mendonça-Hagler, L.C., 1991. *Classification based on coliform count of coastal waters in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil*. In: (Maggon, O.T.; Convex, H.; Tippie, V.; Tobin, L.T. & Clarke, D., eds.), Proc. 7th Symp. On Coastal and Ocean Management – Coastal Zone 91, Am. Soc. Civil Engin., New York, pp: 3246-3258.
- Arrigo, K.R.; Dieckmann, G.; Gosselin, M.; Robinson, D.H.; Fritsen, C.H. & Sullivan, C.W., 1995. High resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo Sound, Antarctica: biomass, nutrient, and production profiles within a dense microalgal bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 127: 1-3.
- Azam, F.; Fenchel, T.; Field, J.G.; Gray, J.S.; Meyer-Reil, L.A. & Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 257-263.
- Azam, F. & Cho, B.C., 1987. Bacterial utilization of organic matter in the sea. In: (Fletcher, M.; Gray, T.R.G. & Jones, J.G., eds.), *Ecology of microbial communities*. Cambridge University Press, 261-281.
- Azam, F. & Long, R.A., 2001. Sea snow microcosms. *Nature*, 29:497-498.
- Azam, F. & Worden, A.Z., 2004. Microbes, molecules and marine ecosystems. *Science*, 303: 1622-1624.
- Bano, N. & Hollibaugh, J.T., 2000. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1960-1969.

- Barcina, I.; Lebaron, P. & Vives-Rego, J., 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 1-9.
- Barreto, A.S., 1992. Evolução de clorofila e fósforo na Baía de Guanabara no período de 1980 a 1990. *Monografia de Graduação, Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 60 pp.*
- Bastviken, D. & Tranvik, L., 2001. The leucine incorporation method estimates bacterial growth equally well in both oxic and anoxic lake waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7): 2916-2921.
- Beman, J.M. & Francis, C.A., 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernutrified subtropical estuary: Bahia del Tobarí, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7767-77.
- Benloch, S.; Rodríguez-Valera, F.; Acinas, S.G. & Martínez-Murcia, A.J., 1996. Heterotrophic bacteria, activity and bacterial diversity in two coastal lagoons as detected by culture and 16S rRNA genes PCR amplification and partial sequencing. *Hydrobiologia*, 329: 3-17.
- Bernhard, A.E.; Colbert, D.; McManus, J. & Field, K., 2005a. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52: 115-128.
- Bernhard, A.E.; Donn, T.; Giblin, A.E. & Stahl, D.A., 2005b. Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environ. Microbiol.*, 7: 1289-1297.
- Billen, G., Servais, P. & Becquevort, S., 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia*, 207: 37-42.
- Bollmann, A. & Laanbroek, H.J., 2002. Influence of oxygen partial pressure and salinity on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the Schelde estuary. *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 239-247.
- Bothe, H.; Jost, G.; Schloter, M.; Ward, B. B. & Witzel, K-P., 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 673-690.
- Bouvier, T.C. & del Giorgio, P.A., 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.*, 47 (2): 453-470.
- Bowden, W.B., 1977. Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1229-1232.
- BRASIL, 1976. *Roteiro da costa sul – Brasil, Rio de Janeiro*. Ministério da Marinha, Diretoria de Hidrografia e Navegação, pp: 49-78.
- Braga, E.S.; Bonetti, C.V.D.H.; Burone, L. & Bonetti, J., 2000. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the baixada santista estuarine system – Brazil. *Mar. Poll. Bull.*, 40: 165-173.
- Brandini, F.P.; Thamm, C.A. & Ventura, I., 1988. Ecological studies in the Bay of Paranaguá. Seasonal and spatial variations of nutrients and chlorophyll *a*. *Nerítica*, 3 (1): 1-30.
- Bratbak, G., 1985. Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1488-1493.
- Brito, E.M.; Guyoneaud, R.; Goñi-Urriza, M.; Ranchou-Peyruse, A.; Verbaere, A.; Crapez, M.A.C.; Wasserman, J.C.A. & Duran, R., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol.*, 157 (8): 752-762.
- Bull, A.T.; Stach, J.E.; Ward, A.C. & Goodfellow, M., 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87 (3): 65-79.

- Button, D.K.; Robertson, B.R. & Jüttner, F., 1996. Microflora of a sub-alpine lake: bacterial populations, size and DNA distribution, and their dependence on phosphate. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 21: 87-101.
- Caffrey, J.M.; Harrington, N.; Solem, I. & Ward, B.B., 2003. Biogeochemical processes in a small California estuary. 2. Nitrification activity community structure and role in nitrogen budgets. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 248: 17-40.
- Calvó, L. & Garcia-Gil, L.J., 2004. Use of *amoB* as a new molecular marker for ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Meth.*, 57: 69-78.
- Carlson, C.A. & Ducklow, H.W., 1996. Growth of bacterioplankton and consumption of dissolved organic carbon in the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 10: 69-85.
- Carmouze, J.P.; Bernardes, M. & Domingos, P., 1995. Asfixia das lagoas costeiras do Estado do Rio de Janeiro. *França-Flash Meio Ambiente*, 4: 2-3.
- Casamayor, E.O.; Schäfer, H.; Bañeras, L.; Pedrós-Alió, C. & Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from 2 neighboring sulfurous lake: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 499-508.
- Cébron, A.; Berthe, T. & Garnier, J., 2003. Nitrification and nitrifying in the lower Seine river and estuary (France). *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (12): 7091-7100.
- Cébron, A. & Garnier, J., 2005. Nitrobacter and Nitrospira genera as representatives of nitrite-oxidizing bacteria: detection, quantification and growth along the lower Seine River (France). *Wat. Res.* 39: 4979-4992.
- Chrost, R.H. & Faust, M.A., 1999. Consequences of solar radiation on bacterial secondary production and growth rates in subtropical coastal water (Atlantic Coral Reef off Belize, Central America). *Aquat. Microb. Ecol.*, 20: 39-48.
- Clarke, A. & Leakey, R.J.G., 1996. The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients and the microbial community in a nearshore Antarctic marine ecosystem. *Limnol Oceanogr.*, 41 (6): 1281-1294.
- Chróst, R.J. & Faust, M.A., 1999. Consequences of solar radiation on bacterial secondary production and growth rates in subtropical coastal water (Atlantic coral reef off Belize, Central America). *Aquat. Microb. Ecol.*, 20: 39-48.
- Church, M.J.; Ducklow, H.W. & Karl, D.M., 2004. Light dependence of [<sup>3</sup>H]leucine incorporation in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (7): 4079-4087.
- Clementino, M.B.M., 2006. *Utilização de marcadores moleculares no estudo da taxonomia e da biodiversidade de organismos dos domínios Archaea e Bactéria*. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, 120 pp.
- Cole, J.J.; Findlay, S. & Pace, M.L., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43: 1-10.
- Cole, J.R.; Chai, B.; Marsh, T.L.; Farris, R.J.; Wang, Q.; Kulam, S.A.; Chandra, S.; McGarrell, D.M.; Schmidt, T.M.; Garrity, G.M. & Tiedje, J.M., 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.*, 31: 442-443.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, 2005. *Resolução CONAMA Nº 357, Ministério do Meio Ambiente*.
- Contador, L. & Paranhos, R., 1996. Water quality trends in Urca inlet (Guanabara Bay, Brazil) from 1986 to 1992. *Arq. Biol. Tecnol.*, 39 (3): 735-744.
- Corzo, A.; Rodríguez-Gálvez, S.; Lubian, L.; Sobrino, C.; Sangrá, P. & Martínez, A., 2005. Antarctic marine bacterioplankton subpopulations discriminated by their apparent content of nucleic acids differ in their response to ecological factors. *Polar Biol.*, 29: 27-39.

- Cottrell, M.T. & Kirchman, D.L., 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12): 5116-5122.
- Cottrell, M.T.; Waidner, L.A.; Yu, L. & Kirchman, D.L., 2005. Bacterial diversity of metagenomic and PCR libraries from the Delaware River. *Environ. Microbiol.*, 7 (12): 1883-1895.
- CNEXO, 1983. *Manuel des analyses chimiques au milieu marin*. (Aminot, A. & Chassieupied, M., eds.), Cnexo – BNDO Documentation, Brest, France, 397 pp.
- Crump, B.C. & Baross, J.A., 1996. Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia river estuarine turbidity maxima. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138: 265-273.
- Crump, B.C.; Armbrust, E.V. & Baross, J.A., 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3192-3204.
- Crump, B.C.; Hopkinson, C.S.; Sogin, M.L; & Hobbie, J.E., 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: Combined influence of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1494-1505.
- Daum, M.; Zimmer, W.; Papen, H.; Kloos, K.; Nawrath, K. & Bothe, H., 1998. Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Cur. Microbiol.*, 37: 281-288.
- Del Giorgio, P.A.; Bird, D.F.; Prairie, Y.T. & Planas, D., 1996. Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green nucleic acid stain syto 13. *Limnol Oceanogr.*, 41 (4): 783-789.
- DeLong, E.F.; Franks, D.G. & Alldredge, A.L., 1993. Phylogenetic diversity of aggregate-attached versus free-living marine bacterial assemblages. *Limnol. Oceanogr.*, 38: 924-934.
- DeLong, E.F. & Karl, D.M., 2005. Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature*, 437: 336-342.
- DENEMET, 1992. *Normais Climatológicas (1961-1990) – Estação Aterro do Flamengo*. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, Secretaria Nacional de Irrigação, Departamento Nacional de Meteorologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Descamps, V.; Colin, S.; Lahaye, M.; Jam, M.; Richard, C.; Potin, P.; Barbeyron, T.; Yvin, J-C. & Kloareg, B., 2006. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Mar. Biotechnol.*, 8 (1): 27-39.
- Dixon, J.L. & Turley, C.M., 2001. Measuring bacterial production in deep-sea sediments using <sup>3</sup>H-thymidine incorporation: ecological significance. *Microb. Ecol.*, 42 (4): 549-561.
- Edwing, B.; Hillier, L.; Wendl, M. & Green, P., 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Gen. Res.*, 8: 175-185.
- Eilers, H.; Pernthaler, J.; Glöckner, F.O. & Amann, R., 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3044-3051.
- Eilers, H.; Pernthaler, J.; Peplies, J.; Glöckner, F.O.; Gerdts, G. & Amann, R., 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5134-5142.
- Esteves, F.A., 1998. *Fundamentos de Limnologia*. Editora Interciência, RJ, 574p.
- Farjalla, V.F., 1998. Nutrientes limitantes ao crescimento do bacterioplâncton nas lagoas Carapebus, Comprida, Cabiúnas e Iodada. In: (Esteves, F. A., ed.), *Ecologia das lagoas costeiras do parque nacional da restinga de Jurubatiba e do município de Macaé, RJ*, NUPEM, UFRJ, pp: 147-157.

- FEEMA, 1980. *Diagnóstico ambiental do estado do Rio de Janeiro*. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente – FEEMA, Rio de Janeiro, Série Técnica 8/79, 55 pp.
- FEEMA, 1990. *Projeto de recuperação gradual do ecossistema da Baía de Guanabara*. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente – FEEMA, RJ, 2º volume, 203 pp.
- FEEMA, 1998. *Qualidade de água da Baía de Guanabara 1990/1997*. Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente – FEEMA, Rio de Janeiro, 100p.
- Feliatra, F. & Bianchi, M., 1993. Rates of nitrification and carbon uptake in the Rhone River plume (Northwestern Mediterranean Sea). *Microb. Ecol.*, 26 (1): 21-28.
- Field, K.G.; Wright, G.T.; Rappé, M.; Urbach, E.; Kergin, K. & Giovannoni, S.J., 1997. Diversity and depth-specific distribution of SAR11 cluster rRNA genes from marine planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 63-70.
- Flaten, G.A.F.; Castberg, T.; Tanaka, T. & Thingstad, T.F., 2003. Interpretation of nutrient-enrichment bioassays by looking at sub-populations in a marine bacterial community. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33: 11-18.
- Fogg, G.E., 1995. Some comments on picoplankton and its importance in the pelagic ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9: 33-39.
- Ford, D.L.; Churchwell, R.L. & Kachtick, R.L., 1980. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 52: 2726-2745.
- Franchito, S.H.; Rao, V.B.; Stech, J.L. & Lorenzetti, J.A., 1998. The effect of coastal upwelling on the sea-breeze circulation at Cabo Frio, Brazil: a numerical experiment. *Ann. Geophys.*, 16 (7): 866-881.
- Francisco, D.E.; Mah, R.A. & Rabin, A.C., 1973. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria. *Trans. Am. Micros. Soc.*, 92: 416-421.
- Freitag, T.E. & Prosser, J.I., 2004. Differences between Betaproteobacterial ammonia-oxidizing communities in marine sediments and those in overlying water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (6): 3789-3793.
- Fuchs, B.M.; Woebken, D.; Zubkov, M.V.; Burkill, P. & Amann, R., 2005. Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39: 145-157.
- Fuhrman, J.A. & Azam, F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 66: 109-120.
- Fuhrman, J.A. & Noble, R.T., 1995. Virus and protist cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol. Oceanog.*, 40 (7): 1236-1242.
- Fuhrman, J.A., 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399: 541-548.
- Furtado, A.L.S.; Casper, P. & Esteves, F.A., 2001. Bacterioplankton abundance, biomass and production in a Brazilian coastal lagoon and in two German lakes. *An. Acad. Bras. Ci.*, 73 (1): 39-49.
- Garcia, E.S., 1995. Biodiversity biotechnology and health. *Cad. Saúde Pública*, 11: 495-500.
- Garrity, G., 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Bergey's manual trust, Michigan State University, East Lansing.
- Gasol, J.M.; Zweifel, U.L.; Peters, F.; Fuhrman, J.A. & Hagström, A., 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (10): 4475-4483.
- Gasol, J.M. & Del Giorgio, P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci. Mar.*, 64 (2): 197-224.

- 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. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 733-739.
- Gin, K.Y.H.; Chisholm, S.W. & Olson, R.J., 1999. Seasonal and depth variation in microbial size spectra at the Bermuda Atlantic time series station. *Deep-Sea Res.I*, 46: 1221-1245.
- Giovannoni, S.J. & Stingl, U., 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature*, 15: 343-348.
- Giovannoni, S.J.; Tripp, H.J.; Givan, S.; Podar, M.; Vergin, K.L.; Baptista, D.; Bibbs, L.; Eads, J.; Richardson, T.H.; Noordewier, M.; Rappé, M.S.; Short, J.M.; Carrington, J.C. & Mathur, E.J., 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*, 309: 1242-1245.
- Glöckner, F.O.; Fuchs, B.M. & Amann, R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3721-3726.
- Godoy, J.M.; Moreira, I.; Bragança, M.J.; Wanderley, C. & Mendes, L.B., 1998. A study of Guanabara Bay sedimentation rates. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 227 (1-2): 157-160.
- Golovatcheva, R.S., 1976. Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. *Microbiology*, 45: 329-331.
- Gonzalez, J.M.; Sherr, E.B. & Sherr, B.F., 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (3): 583-589.
- Gonzalez, A.M.; Paranhos, R.; Andrade, L. & Valentin, J., 2000. Bacterial production in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) evaluated by <sup>3</sup>H-leucine incorporation. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 43 (5): 493-500.
- Gonzalez, A.M.; Paranhos, R. & Lutterbach, M.T.S., 2006. Heterotrophic bacteria abundances in Rodrigo de Freitas Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). *Braz. J. Microbiol.*, 37: 428-433.
- Gonzalez, J.M. & Moran, M.A., 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the  $\alpha$ -subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4237-4246.
- Graham, W.M. & Largier, J.L., 1997. Upwelling shadows as nearshore retention sites: the example of northern Monterey Bay. *Cont. Shelf Res.*, 17: 509-532.
- Grasshoff, K.; Erhardt, M. & Kremling, K., 1999. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie Weinheim, 600pp.
- Grommen, R.; Dauw, L. & Verstraete, W., 2005. Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52: 1-11.
- Guimarães, V.F.; Araújo, M.A.V.; Hagler, L.C.M. & Hagler, A.N., 1993. *Pseudomonas aeruginosa* and other microbial indicators of pollution in fresh and marine waters of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 8: 313-322.
- Guindulain, T. & Vives-Rego, J., 2002. Involvement of RNA and DNA in the staining of *Escherichia coli* by SYTO 13. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34: 1-7.
- Guixa-Boixereu, N., Vaqué, D., Gasol, J.M. & Pedrós-Alió, C., 1999. Distribution of viruses and their potential effect on bacterioplankton in an oligotrophic marine system. *Aquat. Microb. Ecol.*, 19: 205-213.
- Hadas, O. & Berman, T., 1998. Seasonal abundance and vertical distribution of protozoa (flagellates, ciliates) and bacteria in Lake Kinneret, Israel. *Aquat. Microb. Ecol.*, 14: 161-170.
- Hagler, A.N. & Hagler, L.C.M., 1981. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 173-178.

- Hagler, A.N.; Mendonça-Hagler, L.C.; Santos, E.A.; Farage, S.; Silva Filho, J.B.; Schrank, A. & de Oliveira, R.B., 1986. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *Sci. Total Envir.*, 58: 151-160.
- Hagström, Å.; Pinhassi, J. & Zweifel, U.L., 2000. Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21: 231-244.
- Harding, L.W.H. & Perry, E.S., 1997. Long-term increase of phytoplankton biomass on Chesapeake Bay, 1950-1994. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 39-52.

- Iriberry, J.; Unanue, M.; Ayo, B.; Barcina, I. & Egea, L., 1990. Bacterial production and growth rate estimation from [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (2): 483-487.
- Jacquet, S.; Lennon, J-F.; Marie, D. & Vaulot, D., 1998. Picoplankton population dynamics in coastal water of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 43 (8): 1916-1931.
- Jellett, J.F.; Li, W.K.W.; Dickie, P.M.; Boraies, A. & Kepkay, P.E., 1996. Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometry and single carbon substrate utilization. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 136: 213-225.
- Jenkins, B.D.; Steward, G.F.; Short, S.M.; Ward, B.B. & Zehr, J.P., 2004. Fingerprinting diazotrophic communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1767-1776.
- Jochem, F.J.; Lavrentyev, P.J. & First, M.R., 2004. Growth and grazing rates of bacteria groups with different apparent DNA content in the Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 145, 1213-1225.
- Jorgensen, N.O.G., 1992. Incorporation of [<sup>3</sup>H]leucine and [<sup>3</sup>H]valine into protein of freshwater bacteria: uptake kinetics and intracellular isotope dilution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3638-3646.
- Joux, F. & Lebaron, P., 1995. Applications en écologie bactérienne des sondes oligonucléotidiques fluorescents par les techniques d'hybridation et de cytométrie. *Océanis*, 21 (1): 125-138.
- Joux, F. & Lebaron, P., 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (9): 3643-3647.
- Joux, F.; Servais, P.; Naudin, J.J.; Lebaron, P.; Oriol, L. & Courties, C., 2005. Distribution of picophytoplankton and bacterioplankton along a river plume gradient in the Mediterranean Sea. *Vie et Milieu*, 55 (3-4): 197-208.
- Jürgens, K. & Güde, H., 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 112: 169-188.
- Jürgens, K.; Arndt, H. & Zimmermann, H., 1997. Impact of metazoan and protozoan grazers on bacterial biomass distribution in microcosms experiments. *Aquat. Microb. Ecol.*, 12: 131-138.
- Kan, J.J.; Crump, B.C.; Wang, K. & Chen, F., 2006. Bacterioplankton community in Chesapeake Bay: Predictable or random assemblages. *Limnol. Oceanogr.*, 51: 2157-2169.
- Karl, D.M., 1979. Measurement of microbial activity and growth in the ocean by rates of stable ribonucleic acid synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 850-860.
- Kelly, K.M. & Chistoserdov, A.Y., 2001. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35: 85-95.
- Kemp, P.F. & Aller, J.Y., 2004a. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47: 161-177.
- Kemp, P.F. & Aller, J.Y., 2004b. Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough? *Limnol. Oceanogr.*, 2: 114-125.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 11-20.
- Kirchman, D. & Mitchell, R., 1982. Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 200-209.
- Kirchman, D.; K'nees, E. & Hodson, R., 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 599-607.

- Kirchman, D.L., 1993. Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In: (Kemp, P.F.; Sherr, B.F.; Sherr, E.B. & Cole, J.J., eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Pub., pp. 509-512.
- Kirchman, D.L.; Yu, L.; Fuchs, B.M. & Amann, R., 2001. Structure of bacterial communities in aquatic systems as revealed by filter PCR. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 13-22.
- Kirchman, D.L., 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 39: 91-100.
- Kirchman, D.L.; Dittel, A.I.; Findlay, S.E.G. & Fischer, D., 2004. Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquat. Microb. Ecol.*, 35: 243-257.
- Kisand, V. & Wikner, J., 2003. Combining culture-dependent and -independent methodologies for estimation of richness of estuarine bacterioplankton consuming riverine dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (6): 3607-3616.
- Kjerfve, B.; Ribeiro, C.H.A.; Dias, G.T.M.; Fillippo, A.M. & Quaresma, V.S., 1997. Oceanographic characteristic of an impact bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Cont. Shelf. Res.*, 17 (13): 1609-1643.
- Klotz, M.G.; Alzerreca, J.J.; Norton, J.M., 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia-oxidizing bacteria: a third member of the *amo* operon? *FEMS Microbiol. Lett.*, 150: 65-73.
- Knoppers, B.A.; Brandini, F.P. & Thamm, C., 1987. Ecological studies in the bay of Paranaguá. Some physical and chemical characteristics. *Nerítica*, 2 (1): 1-36.
- Kolm, H.E.; Giamberardino Filho, R.E. & Korman, M.C., 1997. Spatial distribution and temporal variability of heterotrophic bacteria in the sediments of Paranaguá and Antonina Bays, Paraná, Brazil. *Rev. Microbiol.* 28, 230-238.
- Könneke, M.; Bernhard, A.E.; Torre, J.R.; Walker, C.B.; Waterbury, J.B. & Stahl, D.A., 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437: 543-546.
- Kowalchuk, G.A. & Stephen, J.R., 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 485-529.
- Kucuksezgin, F.; Kontas, A.; Altay, O.; Uluturhan, E. & Darilmaz, E., 2006. Assessment of marine pollution in Izmir Bay: nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environ. Int.*, 32: 41-51.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I.B. & Nei, M., 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245.
- Lacerda, L.D.; Souza, C.M.M. & Pestana, M.H.D., 1988. Geochemical distribution of Cd, Cu, Cr and Pb in sediments of estuarine areas along the southeastern Brazilian coasts. In: (Seeliger, U.; Lacerda, L.D. & Patchineelam, S.R., eds.), *Metals in Coastal Environ. of Latin America*, Springer-Verlag, pp: 86-99.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: (Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Willey, New York, pp: 115-175.
- Lavrado, H.; Mayr, L.M.; Carvalho, V. & Paranhos, R., 1991. Evolution (1980-1990) of ammonia and dissolved oxygen in Guanabara Bay, RJ, Brazil. In: (Maggon, O.T.; Convex, H.; Tippie, V.; Tobin, L.T. & Clarke, D., eds.), *Proc. 7th Symp. On Coastal and Ocean Management – Coastal Zone 91*, Am. Soc. Civil Engin., NY, pp: 3234-3245.
- Larsson, U. & Hagstrom, A., 1982. Fractionated phytoplanktonic primary production, exudates release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.*, 67: 57-70.
- Lebaron, P. & Joux, F., 1994. Flow cytometric analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplankitis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (12): 4345-4350.

- Lebaron, P.; Troussellier, M.; Got, P., 1994. Accuracy and precision of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. *J. Microbiol. Meth.*, 19: 89-94.
- Lebaron, P.; Parthuisot, N. & Catala, P., 1998. Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (5): 1725-1730.
- Lebaron, P.; Servais, P.; Agogué, H.; Courties, C. & Joux, F., 2001. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allow us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems? *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (4): 1775-1782.
- Lebaron, P.; Servais, P.; Baudox, A.C.; Bourrain, M.; Courties, C. & Parthuisot, N., 2002. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 131-140.
- Légendre, L. & Légendre, P., 1998. *Ecologie numérique*. Tome 2: La structure des données écologiques. Collection d' écologie, 13. Masson, Paris et les Presses de l'Universit  du Québec, 254 pp.
- Li, W.K.W.; Jellett, J.F. & Dickie, P.M., 1995. DNA distribution in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanog.*, 40: 1485-1495.
- Li, W.K.W. & Dickie, P.M., 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton and viroplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*, 44: 236-246.
- Libes, S.M., 1992. *An introduction to marine biogeochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Canada, 734p.
- Lindsay, M.R.; Webb, R.I.; Strous, M.; Jetten, M.S.; Butler, M.K.; Forde, R.J. & Fuerst, J.A., 2001. Cell compartmentalization in planctomycetes: novel types of structural organization for the bacterial cell. *Arch. Microbiol.*, 175: 413-429.
- Lindström, E.S., 2000. Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.*, 40: 104-113.
- Longnecker, K.; Sherr, B.F. & Sherr, E.B., 2006. Variation in cell-specific rates of leucine and thymidine incorporation by marine bacteria with high and with low nucleic acid content off the Oregon coast. *Aquat. Microb. Ecol.*, 43: 113-125.
- Macrae, A., 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Braz. J. Microbiol.*, 31: 77-82.
- Malmstrom, R.R.; Cottrell, M.T.; Elifantz, H. & Kirchman, D.L., 2005. Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6): 2979-2986.
- Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Vancanneyt, M. & Schleifer, K.H., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142: 1097-1106.
- Margalef, R., 1994. Diversity and biodiversity – their possible meaning in relation with the wish for sustainable development. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 66 (Suppl. 1): 3-14.
- Marie, D.; Partensky, F.; Jacquet, S. & Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1): 186-193.
- Mayr, L.M.; Tenenbaum, D.R.; Villac, M.C.; Paranhos, R.; Nogueira, C.R.; Bonecker, S.L.C. & Bonecker, A.C., 1989. Hydrobiological characterization of Guanabara Bay. In: (Maggon, O. T. & Neves, C., eds.), *Coastlines of Brazil*. Am. Soc. Civil Engin., New York, pp: 124-139.
- Mayr, L.M. & Paranhos, 2000. Qualidade das águas da Baia de Guanabara. *Gest o sustent vel da Baia de Guanabara – Seminário Internacional, CIDS-EBAP-FGV*, 68pp.

- McCaig, A.E.; Embley, T.M. & Prosser, J.I., 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 120: 363-368.
- McCarthy, A.J. & Williams, S.T., 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review. *Gene*, 115 (1-2): 189-192.
- McKew, B.A.; Coulon, F.; Osborn, A.M.; Timmis, K.N. & McGenity, T.J., 2007. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environ. Microbiol.*, 9 (1): 165-176.
- McTavish, H.; Fuchs, J.A. & Hooper, A.B., 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.*, 175: 2436-2444.
- Meniconi, M.F.G.; Gabardo, I.T.; Carneiro, M.E.R.; Barbanti, S.M.; Silva, G.C. & Massone, C.G., 2002. Brazilian oil spills chemical characterization - Case studies. *Environ. Forens.*, 3: 303-321.
- Meniconi, M.F.G. & Barbanti, S.M., 2007. Case study: evaluation of hydrocarbon sources in Guanabara Bay, Brazil. In: (Wang, Z. & Stout, S.A.), *Oil spill environmental forensics, fingerprinting and source identification*. Elsevier, pp: 505-536.
- Moeseneder, M.M.; Winter, C. & Herndl, G.J., 2001. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnol. Oceanogr.*, 46 (1): 95-107.
- Mobarry, B.K.; Wagner, M.; Urbain, V.; Rittmann, B.E. & Stahl, D.A., 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (6): 2156-2162.
- Monfort, P. & Baleux, B., 1994. Effects of environmental factors present in the St. Lawrence estuary (Quebec, Canada) on experimental survival of *Salmonella salamae* as determined by flow cytometry. *Can. J. Microbiol.*, 40: 712-719.
- Moran, M.A.; Rutherford, L.T. & Hodson, R.E., 1995. Evidence for indigenous Streptomyces populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (10): 3695-3700.
- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O., 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Editora UFLN, Lavras, MG, 625p.
- Murrell, M.C.; Hollibaugh, J.T.; Silver, M.W. & Wong, P.S., 1999. Bacterioplankton dynamics in northern San Francisco Bay: role of particle association and seasonal freshwater flow. *Limnol. Oceanogr.*, 44 (2): 295-308.
- Murrell, M.C., 2003. Bacterioplankton dynamics in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquat. Microb. Ecol.*, 32: 239-250.
- Muyzer, G.; De Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 (3): 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuw.*, 73: 127-141.
- Nishimura, Y.; Kim, C. & Nagata, T., 2005. Vertical and seasonal variations of bacterioplankton subgroups with different nucleic acid contents: possible regulation by phosphorous. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10), 5828-5836.
- Norton, J.M.; Alzerreca, J.J.; Suwa, Y. & Klotz, M.G., 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177: 139-149.
- Odum, E.P., 1995. *Ecologia*. Editora Guanabara Koogan, 446 pp.

- O'Mullan, G.D. & Ward, B.B., 2005. Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia-oxidizing bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2): 697-705.
- Otte, S.; Schalk, J.; Kuenen, J.G. & Jetten, M.S., 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 255-261.
- Paerl, H.W. & Merkel, S.M., 1982. Differential phosphorus assimilation in attached vs. unattached microorganisms. *Arch. Hydrobiol.*, 93: 125-134.
- Painchaud, J.; Therriault, J.C. & Legendre, L., 1995. Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the Saint Lawrence estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 205-208.
- Pakulski, J.D.; Benner, R.; Amon, R.; Eadie, B. & Whitley, T., 1995. Community metabolism and nutrient cycling in the Mississippi river plume: evidence for intense nitrification at intermediate salinities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 117: 207-218.
- Paranhos, R. & Mayr, L.M., 1993. Seasonal patterns of temperature and salinity in Guanabara Bay, Brazil. *Fresenius Environ. Bull.*, 2: 647-652.
- Paranhos, R.; Mayr, L.M.; Lavrado, H.P. & Castilho, P.C., 1993. Temperature and salinity trends in Guanabara Bay (Brazil) from 1980 to 1990. *Arq. Biol. Tecnol.*, 36 (4): 685-694.
- Paranhos, R.; Nascimento, S.M. & Mayr, L.M., 1995. On the faecal pollution in Guanabara Bay, Brazil. *Fresenius Environ. Bull.*, 4: 352-357.
- Paranhos, R., 1996. *Alguns métodos para análises de água*. UFRJ – Cadernos Didáticos 19, Rio de Janeiro, 281 pp.
- Paranhos, R.; Pereira, A.P. & Mayr, L.M., 1998. Diel variability of water quality in a tropical polluted bay. *Environ. Monit. Asses.*, 50: 131-141.
- Paranhos, R. & Ximenez, M.S., 2000. Verão negro no litoral carioca. *Ciência Hoje*, 27:48-49.
- Paranhos, R.; Andrade, L.; Mendonça-Hagler, L.C. & Pfeiffer, W.C., 2001. Coupling bacterial abundance with production in a polluted tropical coastal bay, pp: 117-132. In: Faria, B.M.; Farjalla, V.F. & Esteves, F.A. (eds.). *Aquatic Microbial Ecology in Brazil*. Series Oecologia Brasiliensis, vol. IX. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro, Brazil.
- Paranhos, 2002. *Densidade e atividade das bactérias heterotróficas na Baía de Guanabara*. Tese de Doutorado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, RJ, 116p.
- Parsons, T.R.; Maita, Y. & Lalli, C.M., 1984. *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Oxford, Pergamon Press, 173 pp.
- Paul, J.H., 1982. Use of Hoechst dyes 33258 and 33342 for enumeration of attached and planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 939-944.
- Pedrós-Alió, C., 1993. Diversity of bacterioplankton. *Trends Ecol. Evol.*, 8: 86-90.
- Pedrós-Alió, C., 2006. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol.*, 14 (6): 257-263.
- Perin, G.; Fabris, R.; Manente, S.; Wagener, A.L.R.; Hamacher, C. & Scotto, S., 1997. A five-year study on the heavy metal pollution of Guanabara bay sediments (Rio de Janeiro, Brazil) and evaluation of the metal bioavailability by means of geochemical speciation. *Wat. Res.*, 31: 3017 – 3028.
- Pernthaler, J.; Sattler, B.; Simek, K.; Schwarzenbacher, A. & Psenner, R., 1996. Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquat. Microb. Ecol.*, 10 (3): 255-263.
- Pernthaler, J., 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Rev. Microbiol.*, 3 (7): 537-546.
- PETROBRAS, 2001. *Monitoramento Ambiental da Atividade de Produção de Petróleo na Bacia de Campos – Etapa de Pré-Monitoramento – Relatório Final*. CENPES/PETROBRAS, Rio de Janeiro, 222 pp.

- Pfeiffer, W.C.; Fizman, M.; Lacerda, L.D.; Van Wereelt, M.M.D. & Carbonell, N., 1982. Chromium in water, suspended particles, sediments and biota in the Irajá river estuary. *Environ. Poll. (serie B)*, 3: 193-205.
- Pimentel-Elardo, S.; Wehrl, M.; Friedrich, A.B.; Jensen, P.R. & Hentschel, U., 2003. Isolation of planctomycetes from *Aplysia* sponges. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33: 239-245.
- Pinhassi, J.; Zweifel, U.L. & Hagstrom, A., 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3359–3366.
- Pinhassi, J. & Hagström, A., 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21: 245-256.
- Pomeroy, L.R., 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24 (9): 499-504.
- Pomeroy, L.R.; Sheldon, J.E.; Sheldon Jr., W.M. & Peters, F., 1995. Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 117: 259-268.
- Porter, K.G. & Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- Porter, J.; Diaper, J.; Edwards, C. & Pickup, R., 1995. Direct measurements of natural planktonic bacterial community viability by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7): 2783-2786.
- Porter, J.; Deere, D.; Pickup, R. & Edwards, C., 1996. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry*, 23: 91-96.
- Prosser, J.I. & Embley, T.M., 2002. Cultivation-based and molecular approaches to characterisation of terrestrial and aquatic nitrifiers. *Antonie van Leeuw.*, 81: 165-179.
- Purkhold, U.; Pommerening-Röser, A.; Juretschko, S.; Schmid, M.C.; Koops, H-P. & Wagner, M., 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequences analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12): 5368-5382.
- Rappé, M.S.; Kemp, P.F. Giovannoni, S.J., 1997. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 811-826.
- Rappé, M.S.; Connon, S.A.; Vergin, K.L. & Giovannoni, S.J., 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418: 630-633.
- Riemann, B. & Azam, F., 1992. Measurements of bacterial protein synthesis in eutrophic aquatic environments by means of leucine incorporation. *Mar. Microb. Food Webs*, 6 (2).
- Robarts, R. D., Zohary, T., Waiser, M. J. & Yacobi, Y. Z., 1996. Bacterial abundance, biomass and production in relation to phytoplankton biomass in the Levantine basin of the southeastern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 137: 273-281.
- Rocap, G.; Larimer, F.W.; Lamerdin, J.; Malfatti, S.; Chain, P.; Ahlgren, N.A.; Arellano, A.; Coleman, M.; Hauser, L.; Hess, W.R.; Johnson, Z.I.; Land, M.; Lindell, D.; Post, A.F.; Regala, W.; Shah, M.; Shaw, S.L.; Steglich, C.; Sullivan, M.B.; Ting, C.S.; Tolonen, A.; Webb, E.A.; Zinser, E.R. & Chisholm, S.W., 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424, 1042-1047.
- Rodrigues, F.; Fernandez, E.; Head, R.N.; Harbour, D.S.; Bratbak, G.; Heldal, M. & Harris, R.P., 2000. Temporal variability of viruses, bacteria, phytoplankton and zooplankton in the western English Channel off Plymouth. *J. Mar. Ass. UK*, 80: 575-586.
- Roland, F. & Cole, J.J., 1999. Regulation of bacterial growth efficiency in a large turbid estuary. *Aquat. Microb. Ecol.*, 20: 31-38.
- Roselló-Mora, R. & Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 39-67.

- Rotthauwe, J-H.; Witzel, K-P & Liesack, W., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (12): 4704-4712.
- Sakai, T.; Ishizuka, K.; Shimanaka, K.; Ikai, K. & Kato, I., 2003. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Mar. Biotechnol.*, 5 (6): 536-544.
- Saitou, N. & Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 3<sup>rd</sup> edition.
- Sanders, R.W., Caron, D.A. & Berninger, U.G., 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86: 1-14.
- Sañudo-Wilhelmy, S.A. & Taylor, G.T., 1999. Bacterioplankton dynamics and organic carbon partitioning in the lower Hudson river estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 182: 17-27.
- Saraswat, N., Alleman, J.E. & Smith, T.J., 1994. Enzyme immunoassay detection of *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 1969-1973.
- Sayavedra-Soto, L.A.; Hommes, N.G.; Alzerreca, J.J.; Arp, D.J.; Norton, J.M. & Klotz, M.G., 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA* and *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.*, 167: 81-88.
- Schloss, P.D. & Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 1501-1506.
- Schultz, G.E.; White, E.D. & Ducklow, H.W., 2003. Bacterioplankton dynamics in the York river estuary: primary influence of temperature and freshwater inputs. *Aquat. Microb. Ecol.*, 30: 135-148.
- SECT, 2000. *Consórcios de Universidades – REDUC/DTSE*. Secretaria Estadual de Ciência e Tecnologia, Relatório final, 610 pp.
- Sekar, R.; Fuchs, B.M.; Amann, R. & Pernthaler, J., 2004. Flow sorting of marine bacterioplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (10): 6210-6219.
- Selje, N.; Brinkhoff, T. & Simon, M., 2005. Detection of abundant bacteria in the Weser estuary using culture-dependent and culture-independent approaches. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39: 17-34.
- Servais, P., 1992. Bacterial production measured by <sup>3</sup>H-thymidine and <sup>3</sup>H-leucine incorporation in various aquatic ecosystems. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 37: 73-81.
- Servais, P.; Casamayor, E.O.; Courties, C.; Catala, P.; Partuisot, N. & Lebaron, P., 2003. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquat. Microb. Ecol.*, 33: 41-51.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical flow cytometry*. 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-Liss.
- Sherr, E.B. & Sherr, B.F., 1988. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnol. Oceanog.*, 33: 489-503.
- Shiah, F-K.; Gong, G-C.; Chen, T-Y. & Chen, C-C., 2000. Temperature dependence of bacterial specific growth rates on the continental shelf of the East China Sea and its potential application in estimating bacterial production. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22: 155-162.
- Sieracki, M. E.; Haugen, E. M. & Cucci, T. L., 1995. Overestimation of bacteria in the Sargasso Sea: direct evidence by flow and imaging cytometry. *Deep-Sea Res.*, 42: 1399-1409.

- Simek, K., Kojecká, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J. & Dolan, J. R., 1990. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fraction in a eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanog.*, 44 (7): 1634-1644.
- Simon, M. & Azam, F., 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 51: 201-213.
- Smith, D.C. & Azam, F., 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using <sup>3</sup>H-leucine. *Mar. Microb. Food Webs*, 6 (2): 107-114.
- Sogin, M.L.; Morrison, H.G.; Huber, J.A.; Welch, D.M.; Husen, S.M.; Neal, P.R.; Arrieta, J.M. & Herndl, G.J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 12115-12120.
- Solic, M. & Krstulovic, N., 1992. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar. Poll. Bull.*, 24 (8): 411-416.
- Somerville, C.C.; Knight, I.T.; Straube, W.L. & Colwell, R.R., 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (3): 548-554.
- Sorokin, Y.I. & Lyursarev, S.V., 1978. A comparative evaluation of two methods for determining the biomass of planktonic microflagellates. *Oceanol. Acad. Sci. U.S.S.R.* 18: 232-236.
- Sorokin, D.Y. & Kuenen, J.G., 2005. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52 (3): 287-295.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 846-849.
- Stackebrandt, E.; Frederiksen, W.; Garrity, G.M.; Grimont, P.A.; Kampfer, P.; Maiden, M.C.; Nesme, X.; Rossello-Mora, R.; Swings, J.; Truper, H.G.; Vauterin, L.; Ward, A.C. & Whitman, W.B., 2002. Report of the ad-hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 1043-1047.
- Stahl, D.A. & Amann, R.I., 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics, pp: 205-248. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (eds.), *Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Stephen, J.R.; McCaig, A.E.; Smith, Z.; Prosser, J.I. & Embley, T.M., 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\gamma$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (11): 4147-4154.
- Sullivan, M.B.; Waterbury, J.B. & Chisholm, S.W., 2003. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*, 424: 1047-1051.
- Suzuki, M.T.; Rappé, M.S.; Haimberger, Z.W.; Winfield, H.; Adair, N.; Ströbel, J. & Giovannoni, S.J., 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (3): 983-989.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Trousselier, M.; Courties, C.; Lebaron, P. & Servais, P., 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29: 319-330.
- Trousselier, M.; Schäfer, H.; Batailler, N.; Bernard, L.; Courties, C.; Lebaron, P.; Muyzer, G.; Servais, P. & Vives-Rego, J., 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 13-24.

- Trusova, M.Y. & Gladyshev, M.I., 2002. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Microb. Ecol.*, 44: 252-259.
- Turley, C.M. & Mackie, P.J., 1994. Biogeochemical significance of attached and free-living bacteria and the flux of particles in the NE Atlantic Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 115: 191-203.
- UNESCO, 1981. Tenth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. *Unesco Tech. Pap. Mar. Sci.* 36.
- Valentin, J.L., 1984. Analysis of hydrobiological parameters in the Cabo Frio (Brazil) upwelling. *Mar. Biol.*, 82: 259-276.
- Valentin, J.; Tenenbaum, D.; Bonecker, A.; Bonecker, S.; Nogueira, C.E.23d4.os, RM. &

ueira,R.PC.E

- Ward, B.B.; Voytek, M.A. & Witzel, K-P., 1997. Phylogenetic diversity of natural populations of ammonia oxidizers investigated by specific PCR amplification. *Microb. Ecol.*, 33: 87-96.
- Wayne, L.G.; Brenner, D.J.; Cowell, R.R.; Grimont, P.A.D.; Kandler, O.; Krichevsky, L., Moore, L.H.; Moore, C.; Murray, R.G.E.; Stackebrandt, E.; Starr, M.P. & Trupper, H.G., 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37: 463-464.
- Weinbauer, M.G. & Peduzzi, P., 1995. Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the northern Adriatic Sea. *J. Plank. Res.*, 17: 1851-1856.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. & Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703.
- Wieltchnig, C.; Fisher, U.R.; Kirschner, A.K. & Velimirov, B., 2003. Benthic bacterial production and protozoan predation in a silty freshwater environment. *Microb. Ecol.*, 46 (1): 62-72.
- Wikner, J., Cuadros, R. & Jansson, M., 1999. Differences in consumption of allochthonous DOC under limnic and estuarine conditions in a watershed. *Aquat. Microb. Ecol.*, 17: 289-299.
- Winter, C.; Herndl, G.J. & Weinbauer, M.G., 2004. Diel cycles in viral infection of bacterioplankton in the North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, 35: 2079-216.
- Wise, M.G.; Vaun McArthur, J. & Shimkets, L.J., 1997. Bacterial diversity of a Carolina Bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (4): 1505-1514.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.
- Wong, G.T.F., 1979. Alkalinity and pH in the Southern Chesapeake Bay and the James river estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 24 (5): 970-977.
- Ye, R.W. & Thomas, S.M., 2001. Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4: 307-312.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, 469pp.
- Zdanowski, M.K. & Figueiras, F.G., 1999. CFU bacterial fraction in the estuarine upwelling ecosystem of Ría de Vigo, Spain: variability in abundance and their ecophysiological description. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 182: 1-15.
- Zehr, J.P.; Jenkins, B.D.; Short, S.M. & Steward, G.F., 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.*, 5: 539-554.
- Zobell, C.E., 1946. *Marine Microbiology*. Chronica Botanica, Whaltham.
- Zubkov, M.V.; Sleight, M.A.; Tarran, G.A.; Burkill, P.H. & Leakey, R.J.G., 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic "transect" from 50° N to 50° S. *Deep-Sea Res.I*, 45: 1339-1355.
- Zubkov, M.V.; Fuchs, B.M.; Burkill, P.H. & Amann, R., 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (11), 5210-5218.
- Zubkov, M.V.; Fuchs, B.M.; Tarran, G.A.; Burkill, P.H. & Amann, R., 2003. High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1299-1304.
- Zubkov, M. V.; Tarran, G. A. & Burkill, P. H., 2006. Bacterioplankton of low and high DNA content in the suboxic waters of the Arabian Sea and the Gulf of Oman: abundance and amino acid uptake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 43: 23-32.

## Publicações relacionadas à Tese

Vieira, R. P.; Gonzalez, A.M.; Cardoso, A.M.; Oliveira, D.N.; Albano, R.M.; Clementino, M.M.; Martins, O.B. & Paranhos, R., 2007. Bacterioplankton assemblages across a trophic and pollution gradient in a tropical bay: Rio de Janeiro, Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* (submetido à publicação).

Vieira, R.P.; Clementino, M.M.; Cardoso, A.M.; Oliveira, D.N.; Albano, R.M.; Gonzalez, A.M.; Paranhos, R. & Martins, O.B., 2007. Archaeal communities in a tropical estuarine ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. *Microbial Ecology* (aceito para publicação).

Gonzalez, A.M.; Andrade, L.; Mendonça-Hagler, L. & Rodolfo Paranhos, 2007. Distribution of bacterial abundance and activity along a pollution gradient in Guanabara Bay, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* (submetido à publicação).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)