



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE-FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

Bacterioplâncton de quatro lagos rasos subtropicais com distintas características tróficas

Neusiane Chaves de Souza

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biologia de Ambientes Aquáticos
Continentais para obtenção do
Título de Mestre em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais

Rio Grande, maio de 2010.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS
LABORATÓRIO DE ECOLOGIA DO FITOPLÂNTON E DE MICROORGANISMOS
MARINHOS

Bacterioplâncton de quatro lagos rasos subtropicais com distintas características tróficas

Aluno: Neusiane Chaves de Souza

Orientador: Paulo Cesar Abreu

Rio Grande, maio de 2010.

**Este trabalho é dedicado aos meus
amados pais: Neusa e Adão.**

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Dr. Paulo Cesar Abreu pela segunda parceria e pelo apoio financeiro. Também agradeço pelos momentos de conversa, nos quais ele sempre me aconselhou a ser uma pessoa menos ansiosa.
- Aos membros da Banca Examinadora: Dr. Danilo Giroldo e Dr. Vinicius Farjalla pelas críticas e sugestões.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) pela concessão de bolsas.
- A minha família pelo suporte, pelo amor e, principalmente, pela paciência nos momentos finais do mestrado
- A uma pessoa especial que surgiu em minha vida durante o mestrado e que passou a iluminar os meus dias: Maiko. Obrigado por ser paciente comigo, por sempre me incentivar e por acreditar em mim.
- Também tenho que fazer um agradecimento em especial a Cáren e a Bia. Duas amigas que me acompanharam durante toda a faculdade e mestrado. Mais uma vez pudemos contar com o ombro amigo uma da outra e, com certeza, não vai haver distância que faça isso mudar.
- Aos meus amigos do Laboratório, com os quais eu convivo a mais de três anos e de uma maneira ou outra sempre acabam ajudando: Bia, Carol, Lucélia, Lise, Alessandra, Fernanda, Rafael, Érica, Savênia, Lumi, Cida, Caju, Márcio, Alessandro, Ricardo, Cláudio e aos Rubens.
- Ao super e incansável Haig They. Obrigada não só por ter me ajudado em inúmeros momentos práticos, mas também por ter me escutado e me aconselhado sempre que eu precisei.
- Ao meu amigão Valnei. Obrigada pela ajuda nas coletas, na bancada e pelos inúmeros conselhos. Você faz muita falta no Laboratório!
- A super Vanessa, outra pessoa que não pensa duas vezes antes de ajudar no que for possível. Obrigada também pelos inúmeros momentos de conversa e de força!
- Ao Fernadão pela ajuda nas saídas de campo e por torná-las muito mais divertidas.

- A Livia pela parceria nas coletas e no trabalho na bancada, além dos inúmeros momentos agradáveis. Sinto saudade!
- A todos os meus amigos da Bio que desde o início desta caminhada me fazem companhia: Helena, Diana, Wagner, Sônia, Dudu, Tati, Talibã, Franko, Thiago, Léo, Cláudio, Sú, Gi, Dédi e muitos outros.

**Você tem seus pincéis e suas tintas,
pinte o paraíso e depois entre!!
Leo Buscaglia**

RESUMO

O papel exercido pelas bactérias é reconhecido como fundamental no metabolismo de qualquer sistema aquático, não só pela mineralização da matéria orgânica, como também pela transferência de matéria e energia para níveis tróficos superiores (“microbial loop”). Para a realização deste estudo foram escolhidos quatro lagos com diferentes estados tróficos no Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande – FURG - RS. O Lago Biguás e o da Base possuem características de ambientes eutrófico - hipereutrófico, enquanto que, o Lago Polegar é caracterizado como um ambiente oligo-mesotrófico e o Lago Negro é considerado um ambiente distrófico. Em um estudo anterior em nove lagos rasos nesta mesma região, incluindo os quatro analisados no presente trabalho, Souza (2007) sugeriu que as bactérias livres atuariam como mineralizadoras e o seu crescimento seria limitado pela disponibilidade de fosfato (controle “bottom-up”), enquanto que as bactérias aderidas participariam da decomposição dos agregados orgânicos. Também foi sugerido que as bactérias aderidas seriam controladas principalmente pela predação por flagelados e ciliados (controle “top-down”), provavelmente devido ao seu maior biovolume. Porém, estas informações foram obtidas a partir de relações estatísticas de dados coletados em uma única amostragem. Assim, neste estudo a comunidade bacteriana (abundância e biomassa) e outros parâmetros físicos, químicos e biológicos dos quatro lagos rasos sub-tropicais foram estudados em amostragens quinzenais no decorrer de um ano entre junho de 2008 e maio de 2009. Nossos resultados indicam que a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido produzido pelo fitoplâncton parece ser um dos principais fatores controladores da dinâmica de bactérias nestes lagos. Entretanto, a predação no Lago Negro parece ter sido de maior magnitude no controle das bactérias neste ambiente, uma vez que não houve um incremento na abundância bacteriana deste lago proporcional ao incremento da clorofila *a*. A presença de um maior número de nano - e microflagelados neste lago dá suporte a esta hipótese. Para testar esta hipótese, foi realizado um experimento utilizando-se a Técnica da Diluição em conjunto com a técnica a de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente) para identificar as taxas de produção e consumo não só dos diferentes morfotipos, mas também dos diferentes grupos filogenéticos (Archaea, Eubacteria, Alfa- Beta- e Gama-Proteobacteria e Cytophaga-Flavobacter) de uma amostra de água do Lago Negro. Os resultados deste experimento indicaram que as bactérias estão, de fato, sendo consumidas por

protozoários na mesma proporção que estão sendo produzidas. Além disso, no Lago Negro a predação parece estar vinculada ao tamanho/biovolume celular, sendo os morfotipos de tamanho reduzido mais resistentes a predação e, por isso, mais abundantes.

PALAVRAS CHAVE: bacterioplâncton, taxa de produção, taxa de predação, FISH.

ABSTRACT

The role played by bacteria is recognized as fundamental in the metabolism of any aquatic system, not only for the mineralization of organic matter, but also in the transfer of matter and energy to higher trophic levels ("microbial loop"). Four lakes with different trophic states in the Campus Carreiros of Universidade Federal do Rio - FURG - RS were chosen for this study. Biguás and Base Lakes have characteristics of eutrophic - hypereutrophic environments, while the Polegar Lake is characterized as an oligo-mesotrophic, and the Negro Lake is considered a dystrophic environment. In a previous study in nine shallow lakes in this same region, including the four examined in this study, Souza (2007) suggested that the free bacteria would act as mineralizing and its growth would be limited by the availability of phosphate (bottom-up control), while the attached bacteria would participate in the decomposition of particulate organic matter. It was also suggested that attached bacteria would be controlled mainly by predation exerted by flagellates and ciliates (top-down control), probably because of their higher biovolume. However, this information was obtained from statistical relationships established for data collected in a single sample. In this study the bacterial community (abundance and biomass) and other physical, chemical and biological variables of the four sub-tropical shallow lakes were fortnightly sampled over a year from October 2008 to May 2009. Our results indicate that the availability of dissolved organic carbon produced by phytoplankton seems to be one of the main factors controlling the dynamics of bacteria in the lakes. However, predation in Negro Lake appears to have been of greater magnitude in the control of bacteria in this environment, since there was no significant increase in bacterial abundance in this lake according to the increment of chlorophyll *a*. The presence of a larger number of nano - and microflagelados this lake supports this hypothesis. To test this hypothesis an experiment was performed using the Dilution Technique in conjunction with the FISH technique (Fluorescent *in situ* Hybridization) to identify the rates of production and consumption not only of different morphotypes but also of different phylogenetic groups (Archaea, Eubacteria, Alfa, Beta, Gamma - Proteobacteria and Cytophaga-Flavobacter) of bacteria in water samples of Negro Lake. The results of this experiment indicate that bacteria are indeed being consumed by protozoa in the same proportion that are being produced. Moreover, in the Negro Lake predation seems to be linked to the size / biovolume, where smaller size of

different bacterial morphotypes seems to be more resistant to predation and therefore more abundant.

KEY WORDS: bacterioplankton, production rate, predation rate, FISH.

SUMÁRIO

Resumo.....	v
Palavras Chaves.....	vi
Abstract.....	vii
Key words.....	viii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
1. Introdução.....	01
2. Material e Métodos.....	04
2.1. Área de Estudo	04
2.2. Coletas.....	06
2.3. Parâmetros Físicos e químicos da água.....	06
2.4. Parâmetros Biológicos.....	07
2.5. Experimento de predação e produção - Técnica de Diluição.....	08
2.6. Identificação dos grupos bacterianos - Hibridização in situ Fluorescente (FISH).....	09
2.7. Análise Estatística.....	11
3. Resultados.....	12
3.1. Estudo sazonal – Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro.....	12
3.1.1. Variáveis físicas e químicas.....	12
3.1.2. Variáveis biológicas.....	16
3.1.3. Análise estatística.....	25
3.2. Experimento de predação e produção- Lago Negro.....	31
3.2.1. Caracterização da água do lago.....	31
3.2.2. Técnica da diluição e Hibridização in situ Fluorescente – FISH.....	33
4. Discussão.....	38
4.1. Estudo sazonal – Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro.....	38

4.2. Experimento de produção e predação – Lago Negro.....	42
5. Perspectivas Futuras.....	45
6. Literatura Citada.....	46
7. Anexos.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos quatro lagos do Campus Carreiros da FURG, enumerados em ordem decrescente de suas áreas.....	05
Figura 2: a)Variação da temperatura (°C); b) pH; c) Condutividade (μohms) e d) seston (mg.L^{-1}) nos lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.....	13
Figura 3: a) Variação do íon amônio, b) nitrito e c) fosfato (μM) nos quatros lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.....	14
Figura 4: Precipitação acumulada (mm^3) no período de junho de 2008 a maio de 2009.....	15
Figura 5: Variação da concentração de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).....	17
Figura 6: Abundância das bactérias (org mL^{-1}) totais (losango), aderidas (quadrado) e livres (triângulo) nos quatro lagos estudados (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.....	18
Figura 7: Variação da biomassa de bactérias ($\mu\text{g C L}^{-1}$) totais (losango), aderidas (quadrado) e livres (triângulo) nos quatro lagos estudados (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.....	19
Figura 8: Variação da densidade de nanoflagelados (org mL^{-1}) < 10 μm (quadrados) e de 10 a 20 μm (losangos) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).....	21
Figura 9: Variação da abundância de microflagelados (org mL^{-1}) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).....	22
Figura 10: Variação da abundância de ciliados (org mL^{-1}) nos quatros lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período do estudo (junho de 2008 a maio de 2009).....	23
Figura 11: Resultados da ACP com as amostras de água coletadas nos Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro no período de junho de 2008 a maio de 2009 com os parâmetros biológicos e físico-químicos. ABT abundância bactérias totais, ABA	

abundância bactérias aderidas, ABL abundância bactérias livres, BBT biomassa bactérias totais, BBA biomassa bactérias aderidas, BBL biomassa bactérias livres.....27

Figura 12: Resultados da ACP com as médias das variáveis ambientais por estações dos Lagos Biguás (A), Polegar (B), Base (C) e Negro (D) no período de junho de 2008 a maio de 2009. ABT abundância bactérias totais, ABA abundância bactérias aderidas, ABL abundância bactérias livres, BBT biomassa bactérias totais, BBA biomassa bactérias aderidas, BBL biomassa bactérias livres.....28

Figura 13: Variação da proporção dos diferentes morfotipos em cada grupo bacteriano.....32

Figura 14: Abundância de células bacterianas nas diferentes diluições no tempo inicial do experimento.....33

Figura 15: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) de bactérias totais no Lago Negro.....34

Figura 16: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) no experimento para os diferentes morfotipos bacterianos (Cocos, Bacilos, Vibrios e Filamentosas) no Lago Negro.....35

Figura 17: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) no experimento para os grupos bacterianos: Eubactéria, Alfa-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria e Gama-Proteobacteria no Lago Negro.....36

Figura 18: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) no experimento para os grupos bacterianos: Archaea e Cytophaga-Flavobacter no Lago Negro.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores e respectivas seqüências de oligonucleotídeos utilizados no projeto.....	10
Tabela 2: Valores médios das variáveis físicas e químicas (pH, condutividade, seston, amônio, nitrito e nitrato) e biológicas (clorofila a, microflagelados, nanoflagelados (20-10 e <10 µm), ciliados, abundância bacteriana, biomassa bacteriana e biovolume bacteriano). Dados apresentados com o desvio padrão.....	25
Tabela 3: Valores de “carga” das variáveis utilizadas na ACP para os eixos 1 e 2. A porcentagem de variação explicada pelos dois eixos é mostrada em <i>itálico</i> . F11, F12 são referentes às Figuras 11 e 12 (a, b, c e d). Os valores mais significativos estão apresentados em negrito	29
Tabela 4: Regressão linear múltipla considerando as interações entre a abundância e biomassa bacteriana com as demais variáveis biológicas e físico-químicas dos quatro lagos estudados (Biguás, Polegar, Base e Negro).....	30
Tabela 5: Biovolume médio dos diferentes morfotipos e grupos bacterianos no tempo inicial e final do experimento (após 24 h).....	31
Tabela 6: Taxas de crescimento (μ) e de predação (m) das bactérias totais, dos diferentes morfotipos e dos diferentes grupos filogenéticos do Lago Negro.....	37

1. INTRODUÇÃO

Desde o trabalho de Azam *et al.* (1983) tem aumentado o interesse de pesquisadores pelos componentes da cadeia alimentar microbiana. Isso porque as bactérias passaram a ser reconhecidas como importantes nos ambientes aquáticos não apenas por sua capacidade de decomposição e remineralização, mas também por serem capazes de transformar matéria orgânica dissolvida em particulada, que é consumida por protozoários, transferindo matéria e energia para níveis tróficos superiores, num fenômeno conhecido como “alça microbiana”. Dessa forma, a comunidade microbiana é responsável pela regulação de grande parte dos nutrientes e da energia do planeta, porém ainda nos falta conhecimento sobre as forças que modelam a estrutura e função desta comunidade (Kent *et al.* 2007). Isso porque a distribuição e a abundância das bactérias em ambientes aquáticos é fruto de um complexo conjunto de fatores ambientais e de interações tróficas entre grupos de microorganismos (Hadas & Berman 1998).

Dentre os trabalhos realizados sobre as bactérias planctônicas, muitos têm analisado os padrões da variação da abundância desta comunidade em regiões com distintas características, como em diferentes condições hidrográficas (Vaqué *et al.* 2002, Berninger *et al.* 1991), temperatura (Garnier & Benest 1990) e estado trófico (Grover & Chrzanowski 2000, Conty *et al.* 2007), e em diferentes escalas temporais (Villena *et al.* 2003). Portanto, já é sabido que a abundância destes microorganismos varia pouco em sistemas pelágicos em detrimento do seu grande potencial reprodutivo (Stockner & Porter 1988, Jugnia *et al.* 2006). Desta forma, diversas hipóteses têm sido sugeridas para o controle da abundância bacteriana nos ecossistemas aquáticos. Dentre os principais controles bióticos destacam-se a predação, principalmente por flagelados heterotróficos (e.g. Berninger *et al.* 1991, Auer *et al.* 2004, Conty *et al.* 2007) e ciliados (Kisand & Zingel 2000, Auer *et al.* 2004, Zingel *et al.* 2007), e a infecção viral (Jugnia *et al.* 2006, Tijdens *et al.* 2008). Este tipo de controle da abundância bacteriana denomina-se “top-down”.

Diversos autores têm destacado que a predação por bacterívoros, como flagelados e ciliados, pode influenciar não apenas a abundância como também a estrutura morfológica e a composição taxonômica da comunidade bacteriana (Hahn & Höfle 1999, Corno & Jürgens 2005, Jezbera *et al.* 2006). Zhang *et al.* (2007) ao estudarem a composição do bacterioplâncton de águas costeiras e a interação com

seus possíveis predadores, sugerem que tanto a predação por flagelados como a lise viral agem diretamente na redução da produção bacteriana e no sustento da diversidade.

Alguns estudos também destacam a temperatura como fator de forte influência sobre a comunidade bacteriana (Kuuppo-Leinikki 1990, Felip *et al.* 1996, Gurung *et al.* 2002). No entanto, em muitos ambientes, a disponibilidade de nutrientes necessários ao crescimento bacteriano pode ter uma importância maior do que a predação (Pace & Funke 1991), afetando significativamente a abundância e a biomassa desta comunidade caracterizando-se como um controle do tipo “bottom-up”. Dentre os elementos limitantes destacam-se o fósforo (e.g. Carlsson & Caron 2001, Farjalla *et al.* 2001, Posch *et al.* 2007), o nitrogênio (Farjalla *et al.* 2006), ou até mesmo uma combinação destes (Castillo *et al.* 2003).

Outro nutriente considerado limitante para o bacterioplâncton é o carbono orgânico dissolvido (COD) (Currie 1990). A excreção de COD pelo fitoplâncton é uma das diversas fontes deste nutriente nos ambientes aquáticos (Vidal *et al.* 2005), a qual também têm sido bastante relacionada com a variação da abundância (Garnier & Benest 1990, Stenuite *et al.* 2009) e biomassa (Malone & Ducklow 1990) de bactérias. Acredita-se que as bactérias assimilam o COD excretado pelo fitoplâncton, por esse ser constituído principalmente por moléculas menores, as quais compõem uma fração lábil deste nutriente (Jensen 1983). Porém, trabalhos mais recentes, demonstram que as bactérias também são capazes de consumir moléculas maiores, como polissacarídeos (Giroldo *et al.* 2007). Em alguns casos pode até mesmo haver uma relação tipo comensalismo entre eles, onde as bactérias podem beneficiar as algas ao disponibilizar fósforo através da remineralização, enquanto as algas fornecem o COD para as bactérias (Currie 1990).

Dentro deste contexto, Sanders *et al.* (1992) destacam que em ecossistemas oligotróficos, o controle do bacterioplâncton pelos recursos é notavelmente mais importante (controle “bottom-up”), enquanto que em sistemas eutróficos estes organismos parecem estar mais susceptíveis ao controle pela predação (controle “top-down”). Entretanto, a densidade bacteriana (Conty *et al.* 2007) e a biomassa (Billen *et al.* 1990) tendem a aumentar de acordo com o aumento do grau de trofia do ambiente aquático.

Bactérias aderidas a partículas também são importantes em ambientes aquáticos. Contudo, muitos estudos relacionados ao bacterioplâncton têm como foco

principal apenas as bactérias de hábito livre, enquanto que as bactérias aderidas acabam sendo subestimadas por causa da sua baixa abundância. Mas elas podem ter uma boa contribuição para o sistema aquático, pois podem incorporar mais carbono orgânico por célula do que as bactérias livres (Simon *et al.* 2002, , Anésio *et al.* 2003). Além disso, o biovolume das bactérias aderidas tende a ser maior que o das bactérias livres, o que pode torná-las mais vulneráveis à predação (Kirchman 1983, Abreu *et al.* 1992). A formação de agregados com bactérias aderidas também é um fator importante, pois pode colaborar com o “microbial loop” ao transferir células do picoplâncton diretamente para consumidores maiores e que pode melhorar a qualidade nutricional dos detritos com proteínas, aminoácidos essenciais e ácidos graxos (Abreu *et al.* 1992, Anésio *et al.* 2003).

Os esforços de pesquisa também têm aumentado em relação à biodiversidade bacteriana, assim como os avanços tecnológicos, várias ferramentas de biologia molecular têm sido muito utilizadas, ampliando o conhecimento sobre esta comunidade (Del’Duca & Cesar 2007). Dentre as diferentes técnicas utilizadas em amostras ambientais, a Hibridização *in situ* Fluorescente (“Fluorescent *in situ* hybridization” - FISH) tem se desenvolvido e ganhado destaque nas pesquisas realizadas em ecologia microbiana devido a facilidade de manuseio e resultados obtidos (Amann 1995, Bouvier & Giorgio 2003). Entretanto, esta técnica é mais restrita do que análises de metagenômica que conseguem avaliar o genoma de todas as bactérias presentes (cultiváveis e não cultiváveis), mas que ainda é bastante cara e trabalhosa.

Estudos em lagos subtropicais sobre este tema ainda são a minoria quando comparados com os ambientes temperados. Havens *et al.* (2007) ao estudarem ao longo de seis anos um lago eutrófico subtropical, relatam que entre os possíveis predadores da cadeia alimentar microbiana, os protozoários apresentaram a maior parte da biomassa (80%). Sendo que entre eles, os ciliados foram relativamente mais importantes como consumidores do que tem sido descrito para ambientes temperados, embora, em ambos os casos os flagelados sejam os mais abundantes. Semelhantemente ao que já foi descrito para lagos eutróficos temperados, eles descrevem uma dominância de carbono orgânico fitoplanctônico e uma variação sazonal na biomassa dos componentes microbianos. Assim, estudos sazonais da variação da abundância bacteriana e de seus possíveis predadores em diferentes lagos subtropicais e com diferentes níveis tróficos podem nos ajudar a entendermos melhor o fluxo de energia e matéria nos ecossistemas aquáticos via cadeia alimentar microbiana.

Em um estudo realizado por Souza (2007) foram analisadas distintas características de alguns lagos rasos localizados no Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande – FURG numa região subtropical no Sul do Brasil. Dentre elas, foram descritas tanto diferenças nos parâmetros físico-químicos, como também diferenças entre as abundâncias dos componentes microbianos. O estudo sugeriu uma diferença no papel desempenhado pelas bactérias livres e bactérias aderidas a partículas na ecologia destes ecossistemas. As bactérias livres atuariam como mineralizadoras e o seu crescimento seria limitado pela disponibilidade de fosfato (controle “bottom-up”), enquanto que as bactérias aderidas participariam da decomposição de agregados orgânicos. Verificou-se também que as bactérias aderidas são predadas preferencialmente por flagelados e ciliados, provavelmente devido ao seu maior biovolume, o que se caracteriza como um controle “top-down” sobre estes microorganismos.

Uma vez que estas informações foram obtidas a partir de relações estatísticas de dados coletados em uma única amostragem, faz-se necessário um acompanhamento sazonal em que se possa avaliar a dinâmica do bacterioplâncton nestes lagos e, com isso, comprovar, ou não, se os controles sugeridos por Souza (2007) sobre os diferentes grupos de bactérias de fato ocorrem como descritos.

Além disso, empregou-se simultaneamente as técnicas de Diluição (para estimar a produção e predação) e de FISH (para identificar diferentes grupos taxonômicos), para se determinar não apenas os grupos filogenéticos de bactérias mais predados como também estimar quanto cada um deles está produzindo. Com estas informações espera-se colaborar para o melhor entendimento sobre a dinâmica do bacterioplâncton nestes lagos rasos sub-tropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de Estudo

O Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), com a uma área de 240 hectares, localiza-se na região sul da planície do Rio Grande do Sul no município do Rio Grande (32° 01' 44" S e 52° 40' 05" W). A região possui um clima subtropical úmido do tipo cfa de acordo com a classificação de Köppen (Maluf, 2000). A média anual de temperatura é de 17 °C, sendo as médias mais baixa 13°C no inverno

e as mais alta 24°C no verão. No inverno e na primavera são observadas as maiores médias mensais de precipitação, podendo ocorrer déficit de água no verão (Seeliger & Odebrecht 1998).

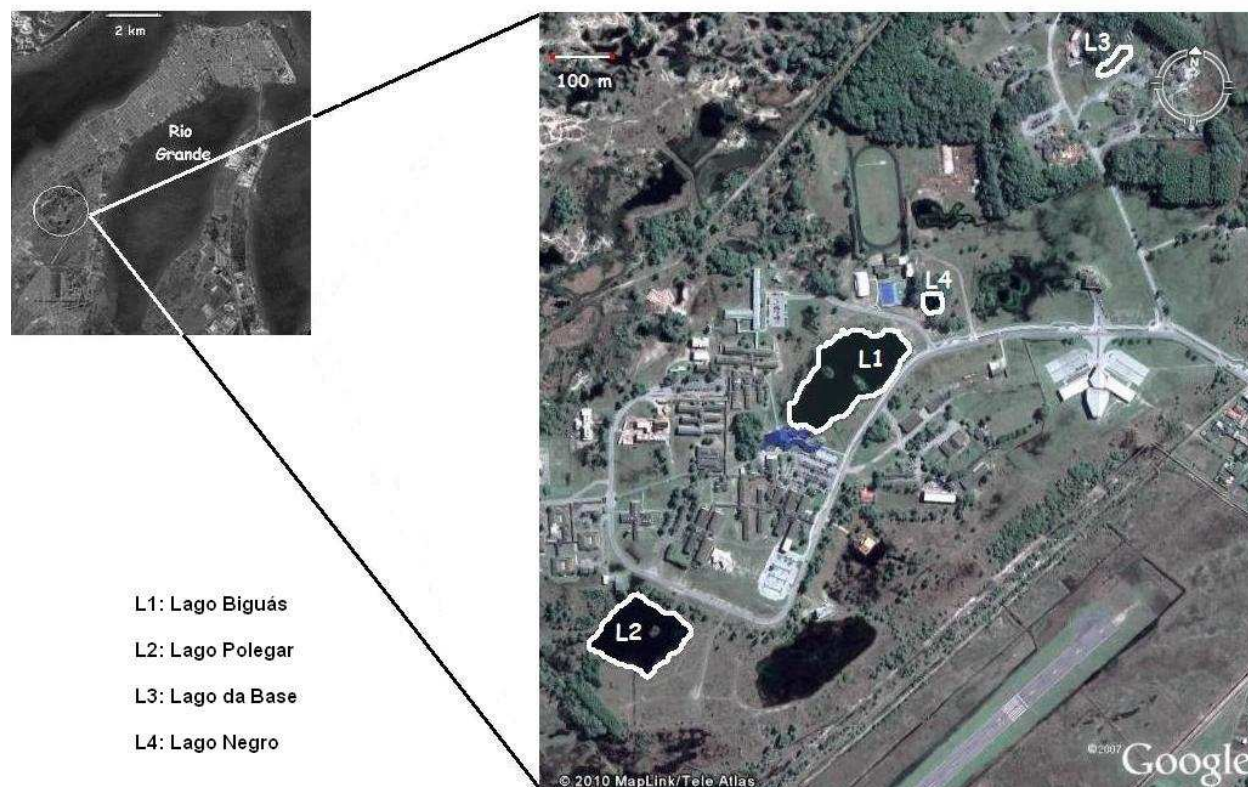


Figura 1: Localização dos quatro lagos do Campus Carreiros da FURG, enumerados em ordem decrescente de suas áreas.

Para a realização deste projeto foram escolhidos quatro lagos rasos denominados L1, L2, L3 e L4, com profundidade máxima de 2 metros, localizados no Campus Carreiros da Universidade Federal do Rio Grande. Dentre os quatro ambientes escolhidos para este estudo, o Lago Polegar (L2) possui característica oligotrófica (Albertoni *et al.* 2007) e o L1 (Lago dos Biguás) características de ambiente eutrófico (Albertoni *et al.* 2007, Trindade *et al.* 2009), enquanto que o L3 (Lago da Base) parece ser um ambiente com características intermediárias (mesotrófico). Por outro lado, o Lago Negro (L4) recebe este nome por possuir águas de cor negra e ser considerado um ambiente distrófico (Albertoni *et al.* 2005). Além das diferenças no tamanho, morfologia, vegetação e estado trófico, estes quatro ambientes também demonstraram importantes diferenças nas suas comunidades microbianas. Estudo anterior de Souza

(2007) mostrou que o lago Biguás apresentou a maior abundância de bactérias livres e o Lago da Base apresentou a maior abundância de bactérias aderidas. Também houve diferença na abundância dos protozoários, com uma considerável amplitude de variação dos flagelados, que foram mais abundantes no Lago Negro. Já os ciliados não foram encontrados em todos os lagos, mas foram mais abundantes no Lago da Base (Souza 2007).

2.2. Coletas

Durante um ano (de junho/2008 a maio/2009), amostras de água foram coletadas quinzenalmente em sub-superfície da coluna d'água na região litorânea dos quatro lagos, tendo-se o cuidado de não se re-suspender o sedimento do fundo. As amostras foram coletadas em galões limpos e identificados e levadas para o Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do Instituto de Oceanografia da FURG. Para a análise dos microorganismos, amostras de água foram armazenadas em duas garrafas de vidro de cor âmbar (100 ml), uma contendo lugol neutro (2%) e outra com formol neutro (4%). Uma sub-amostra da água foi filtrada e dividida em três garrafas de polietileno (250 ml), as quais foram congeladas para posterior análise dos nutrientes inorgânicos dissolvidos (fosfato e nitrito). O restante da água foi utilizado imediatamente após a coleta para a análise da clorofila *a*, seston e nitrogênio amoniacal.

No dia 06 de outubro de 2009 foi realizada uma coleta extra de água da sub-superfície da região litorânea do Lago Negro (L4) para a realização do experimento de predação e produção. A amostra de água foi coletada com galão de polietileno. Após chegar ao laboratório a água recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente, antes de começarmos o experimento. Toda a água coletada passou por uma pré-filtração com malha de 200 μ m para a exclusão do macrozooplâncton.

2.3. Parâmetros físicos e químicos da água

Durante as amostragens em campo foram realizadas medidas de temperatura com termômetro de mercúrio ($\pm 0,5$ °C) (Incoterm). Logo após, no laboratório, foram feitas as medições de pH ($\pm 0,001$) (Digimed DMpH 3) e condutividade ($\pm 2\%$) (YSI model-33). Os dados de pluviosidade foram cedidos pela Estação Meteorológica do Departamento de Geociências da FURG.

A medição do seston foi realizada em triplicatas conforme o método descrito por Strickland & Parsons (1972), com a utilização de filtros de fibra de vidro Whatman GF/F previamente secos e pesados.

Medidas de nutrientes dissolvidos (nitrogênio amoniacal, nitrito e fosfato) foram realizadas utilizando alíquotas da água filtrada em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F (+/- 0,5mm) em triplicatas. O fosfato e o nitrito foram determinados conforme metodologias descritas em Strickland & Parsons (1972). As análises de nitrogênio amoniacal foram realizadas imediatamente após a coleta de acordo com a metodologia descrita em UNESCO (1983).

2.4. Parâmetros biológicos

O teor de clorofila *a* foi determinado fluorimetricamente em triplicata (fluorímetro Turner 111 calibrado) após filtração da água em filtro de fibra de vidro Whatman GF/F e extração do pigmento com acetona 90% no escuro e a -12°C, por 24 horas. A concentração do pigmento foi determinada segundo Welschmeyer (1994).

Para a contagem de bactérias, alíquotas de água (0,1 - 2ml) fixadas com formol (4%) foram filtradas em filtro de polycarbonato escurecidos Nuclepore (0,2 µm) e coradas com o fluorocromo Laranja de Acridina (Hobbie *et al.* 1987). Posteriormente as bactérias foram quantificadas utilizando microscopia de epifluorescência (microscópio Zeiss Axioplan com filtro azul 487709 – BP 450 – 490; FT 510; LT 520) em aumento de 1000X. Para isto, imagens foram capturadas com câmera CCD Watec (sensibilidade de 0.0003 lx) e analisadas com o software IC Capture 2.0 (para Windows). As bactérias livres e aderidas as partículas foram contadas separadamente em pelo menos 30 campos, escolhidos aleatoriamente. A densidade de bactérias aderidas foi multiplicada por 2, admitindo-se que ocorre uma distribuição regular nas partículas (Kirchman & Mitchell 1982).

A abundância de flagelados e ciliados em amostras fixadas com lugol (2%) foi medida segundo metodologia descrita em Utermöhl (1958). Alíquotas foram concentradas em câmaras de sedimentação (2,1 – 10ml) e analisadas em microscópio invertido (Axiovert 135), nas ampliações 100X, 200X e 400X, de acordo com a faixa de tamanho dos microrganismos. Os flagelados foram divididos em microflagelados (> 20 µm) e nanoflagelados (< 20 µm). Esses ainda foram divididos em mais duas classes de tamanho: < 10µm, 10 - 20 µm.

Para a medição do biovolume das bactérias foram capturadas imagens e o cálculo foi feito a partir de medidas de comprimento e de largura obtidos manualmente com auxílio do software *Image Tool* da UTHSCSA (Universidade do Centro da Ciência da Saúde de Texas, San Antonio, TX, EUA; disponível para download em <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>). Para o cálculo do biovolume foi utilizada a equação 1 proposta por Massana *et al.* (1997):

$$V = \pi/4 L^2 [(C-L)/3] \text{ onde: } V = \text{volume, } L = \text{Largura, } C = \text{Comprimento}$$

A biomassa dos microorganismos foi determinada pelo cálculo de biovolume, a partir de medidas representativas de bactérias. Foi empregado o fator alométrico curvilíneo de Norland (1993) utilizando a seguinte fórmula:

$$B = 120 V^{0,72} \text{ onde: } B = \text{biomassa em conteúdo de carbono, } V = \text{Volume } (\mu\text{m}^3), \\ 120 = \text{fator de conversão em fg C } \mu\text{m}^{-3}.$$

O biovolume, tanto dos flagelados como dos ciliados, foi calculado de acordo com os algoritmos descritos por Hillebrand *et al.* (1999) que consideram cada célula semelhante a uma forma geométrica.

2.5. Experimento de predação e produção - Técnica de Diluição

Para a determinação simultânea das taxas de produção e bacterivoria, foi utilizada a Técnica da Diluição (Landry & Hassett 1982) adaptada por Caron (2001). Esta técnica é realizada a partir da incubação de amostras de água diluída em diferentes proporções. As diluições são feitas com água do lago filtrada (filtro Whatman GF/F 47mm). Todos os tratamentos devem ser incubados e as taxas de produção e bacterivoria são calculadas a partir de mudanças na densidade celular nos diferentes tratamentos após 24 horas.

Para a realização deste teste assume-se que: (1) a taxa de crescimento bacteriano (μ) nos diferentes tratamentos é independente do efeito da diluição na densidade populacional, sendo também independente da presença ou ausência de predadores; (2) a estimativa da mortalidade (bacterivoria) (m) pelo microzooplâncton deve ser proporcional ao efeito da diluição, assumindo-se que os predadores não estejam saciados com a densidade de presas e que a ingestão aumente conforme o aumento da disponibilidade de alimento. Além disso, a mudança na densidade bacteriana em um intervalo de tempo segue o modelo de crescimento, onde o crescimento líquido (K_i) é igual a diferença entre a taxa de crescimento bacteriano (μ =

intercepção no eixo y) e a mortalidade por bacterivoria (m = declividade da reta), a qual é proporcional ao efeito da diluição (D_i) da água dos lagos. Assim:

$$K_i = \mu - (m \times D_i).$$

Para esta análise, a série de diluições teve cinco tratamentos em triplicatas (100%, 80%, 60%, 40% e 20% de água não filtrada). Amostras de água diluídas e não diluída foram acondicionadas em frascos Erlenmeyers (500 ml), homogeneizadas manualmente e armazenadas na estufa por 24 horas numa temperatura igual a medida durante a coleta. Foram retiradas alíquotas de água das triplicatas de cada diluição logo após a mistura de água do lago com água filtrada (t_0) e após 24 horas.

A contagem de bactérias do experimento de produção e predação foi feita em alíquotas de água de 2 a 10 ml (de acordo com a diluição) e as bactérias foram contadas no mínimo em 10 campos aleatórios para cada marcador. Também foram enumeradas as células bacterianas pelo morfotipo (cocos, bacilos, vibrios e filamentosas), a partir das fotos capturadas com o fluorocorno DAPI (Porter & Feig 1980). A contagem e medição das bactérias foram feitas em imagens capturadas por câmara, como descrito anteriormente.

2.6. Identificação dos grupos bacterianos - Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

No experimento com a Técnica de Diluição, as bactérias foram marcadas de acordo com o método “Fluorescent *in situ* Hybridization” – FISH. Isto foi feito para determinarmos as taxas de produção e consumo dos diferentes grupos filogenéticos de bactérias. O método aqui descrito segue o protocolo desenvolvido pelo Dr. Matthew Cottrell da University of Delaware, USA, com algumas modificações descritas em Cesar (2002).

Durante a realização da Técnica da Diluição, alíquotas das diferentes diluições foram filtradas em filtros Nucleopore (0,2 μ m). Estes foram armazenados em vidros falcons e banhados com 2ml de paraformaldeído (2 %) por 4 horas para a fixação da amostra. Após este período foi retirado o excesso de paraformaldeído e os filtros foram mantidos congelados até a realização do processo de hibridização.

Cada filtro (amostra) foi cortado ao meio, sendo que uma das metades foi utilizada enquanto que a outra foi guardada para caso fosse necessário repetir o processo de hibridização. A metade utilizada foi dividida em sete partes, uma para cada sonda (“probe”). As seqüências de oligonucleotídeos (sondas) utilizadas são marcadas

com Cy3 (indocarbocianina fluorescente). A relação de marcadores, sua especificidade e sequência estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Marcadores e respectivas seqüências de oligonucleotídeos utilizados no projeto.

Marcador	Especificidade	Seqüência
Controle Negativo	Não específico	5' - 3CC TAG TGA CGC CGT CGA C - 3'
Eub 338R I	Bacteria	5' - 3GC TGC CTC CCG TAG GAG T -3'
Eub 338R II	Bacteria	5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT -3'
Eub 338R III	Bacteria	5' – GCT GCC ACC CGT AGG TGT -3'
Alf 968	Alfa-Proteobacteria	5' - 3GG TAA GGT TCT GCG CGT T - 3'
Bet 42a	Beta-Proteobacteria	5' - 3GC CTT CCC ACT TCG TTT - 3'
Gam 42a	Gama-Proteobacteria	5' - 3GC CTT CCC ACA TCG TTT - 3'
CF 319a	Cytophaga- Flavobacter	5' - 3TG GTC CGT GTC TCA GTA C - 3'
Archaea 915	Archaea	5' - GTGCTCCCCCGCCAATTCCT- 3'

Durante o processo de hibridização as sondas atravessam a membrana celular bacteriana e ligam-se à seqüência complementar do RNA ribossomal das espécies de bactérias pertencentes ao grupo específico. Como os marcadores Bet42a e Gam42a são semelhantes, tanto em relação à estrutura quanto ao tamanho, é necessário utilizá-los com sondas competidoras, ou seja, para a sonda Bet42a marcada com Cy3 foi usado o competidor Gam42a não marcado e vice-versa (Glöckner *et al.*, 1999).

Durante a hibridização também foi empregado uma sonda negativa, a qual possui uma seqüência não compatível com qualquer grupo bacteriano. Esta é utilizada para avaliar a eficiência da hibridização, já que o ideal é que < 1% do total de bactérias sejam marcadas com o mesmo. Contudo, se o marcador negativo marcar um valor superior a 10% do total de bactérias a amostra deve ser descartada.

Os pedaços de filtro foram colocados separadamente sobre uma lâmina coberta com parafilme, onde foram cobertos por 40 µL de solução de hibridização. Esta contém 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 % SDS, formamida e uma concentração final de 2,5 ng/µL de marcador. A solução de formamida deve ser preparada de acordo com o marcador utilizado e com o grupo bacteriano a ser identificado. Por exemplo, é recomendado utilizar formamida com concentração final de 30 % para as sondas Eub338R, Alf986, Bet42a, Gam42a e Arch915 enquanto que, para a sonda CF319a é

utilizado 35 %. Logo após, as lâminas contendo os filtros foram deixadas na incubadora a 42°C por uma noite em tubos fechados, assim evita-se que ocorra alterações na concentração final.

Após a hibridização é necessário que os filtros passem pela solução de lavagem por 15 minutos à 48°C, assim é retirado o excesso de sondas. Esta solução contém 20 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM EDTA, 0,01 % SDS e NaCl na concentração de 102 mM para as sondas Eub338R, Alf986, Bet42a, Gam42a, Arch915 e, 80 mM para a sonda CF319a.

Acabado o processo de hibridização e de lavagem, os filtros foram cobertos com o fluorocromo DAPI (Porter & Feig, 1980) na concentração 2 µg/ mL por 3 minutos. Em seguida, os foram lavados por três vezes em etanol 80 % e secos em papel Whatman 3M.

Após esta preparação os pedaços de filtro foram montados entre lâmina e lamínula e as lâminas foram analisadas no microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan. Este possui tanto o filtro para DAPI (BP 365/11 FT 395 LP 397) quanto o filtro para Cy3 (Chroma 41007a, BP 545/30 FT 610/75 LP 570), no primeiro é possível visualizar todas as bactérias marcadas com o fluorocromo e, no segundo, apenas as que foram hibridizadas e marcadas com Cy3.

2.7. Análise Estatística

Para o estudo sazonal as diferenças estatísticas entre as médias de abundância, biomassa e biovolume celular entre os lagos foram identificadas utilizando os testes paramétricos de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey a posteriori. Para avaliar a diferença entre o biovolume das bactérias livres e aderidas de cada lago foi realizado o “teste t” com 0,05% de significância.

Além disso, foram aplicadas técnicas de análise estatística multivariada como Análise de Componentes Principais (ACP) (Gauch 1994) e Regressão Múltipla (Mingoti 2005) no estudo sazonal. A ACP foi realizada com as médias dos dados para mostrar a relação espacial e temporal entre a abundância e biomassa bacteriana e todas as outras variáveis (biológicas e físico-químicas), além de testar a diferença dos resultados dos quatro lagos. Dois componentes (PC1 × PC2) foram utilizados para explicar a variação dos dados. As Análises de Regressão Múltipla foram aplicadas para

testar a influência das diferentes variáveis medidas sobre a variação da abundância e biomassa das bactérias livres e aderidas.

No experimento de produção e predação foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para testar a diferença do biovolume entre os morfotipos e entre os grupos bacterianos. Para avaliar a diferença do biovolume inicial e final das células bacterianas foi realizado o “teste t” com 0,05 de significância.

Para todos estes testes foram considerados os seus pré-requisitos. Sendo assim, para testar a normalidade das variáveis foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov e para a homocedasticidade o teste Cochran. Quando necessário as variáveis foram normalizadas pela transformação $\log_{10}(x+1)$, exceto a abundância e biomassa de bactérias aderidas, as quais foram transformadas a partir da $(\sqrt{x}+1)$ (Zar, 1999).

3. RESULTADOS

3.1. Estudo sazonal – Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro

3.1.1. Variáveis físicas e químicas

Nos Lagos Biguás (L1) e Polegar (L2) a temperatura mínima da água durante o estudo foi de 13°C no dia 10 de junho e a máxima foi de 29°C no dia 19 de fevereiro. Nos Lagos Base (L3) e Negro (L4), as temperaturas foram um pouco mais baixas, sendo a temperatura mínima de 11°C no dia 10 de junho e a máxima de 25°C nos dias 26 de março e 19 de fevereiro, respectivamente (Figura 2a). Não foi possível coletar do início de novembro até o início de março no Lago da Base, pois este secou durante este período. Assim, não houve coletas durante o verão neste lago.

Os maiores valores de pH foram encontrados no Lago Biguás e o maior valor (9,9) foi medido nas amostras de 10 e 30 de outubro e 12 de novembro. No Lago Polegar o menor valor foi de 6,2 (7 e 21 de janeiro) e o maior foi de 7,8 (5 de março), enquanto que no Lago da Base o menor valor foi de 5,2 (9 de setembro) e o maior valor foi de 6,4 (26 de março). O lago com os menores valores de pH foi o Lago Negro com um valor mínimo de 4,8 (26 de junho, 29 de julho e 24 de setembro) (Figura 2b).

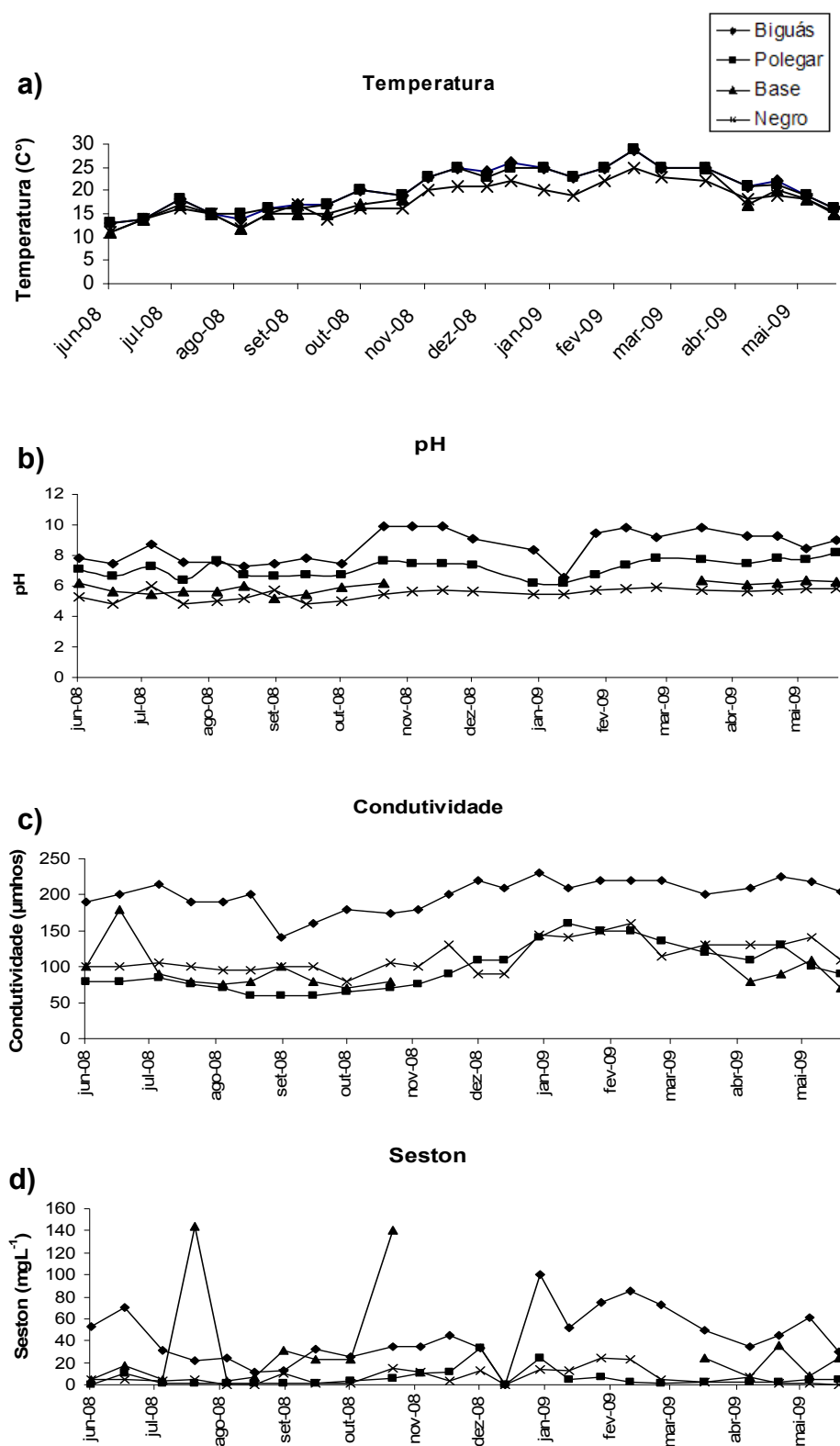


Figura 2: a) Variação da temperatura (°C); b) pH; c) Condutividade (µmhos) e d) seston (mg L⁻¹) nos lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.

O Lago Biguás apresentou a maior condutividade em todas as amostras chegando ao máximo de 230 μmhos (7 de janeiro). No Lago da Base ocorreu um pico (180 μmhos) na amostra de 26 de junho e no Lago Polegar o maior valor foi de 160 μmhos (7 de janeiro). O Lago Negro teve um valor mínimo de 90 em 10 de outubro e máximo de 160 μmhos em 19 de fevereiro (Figura 2c).

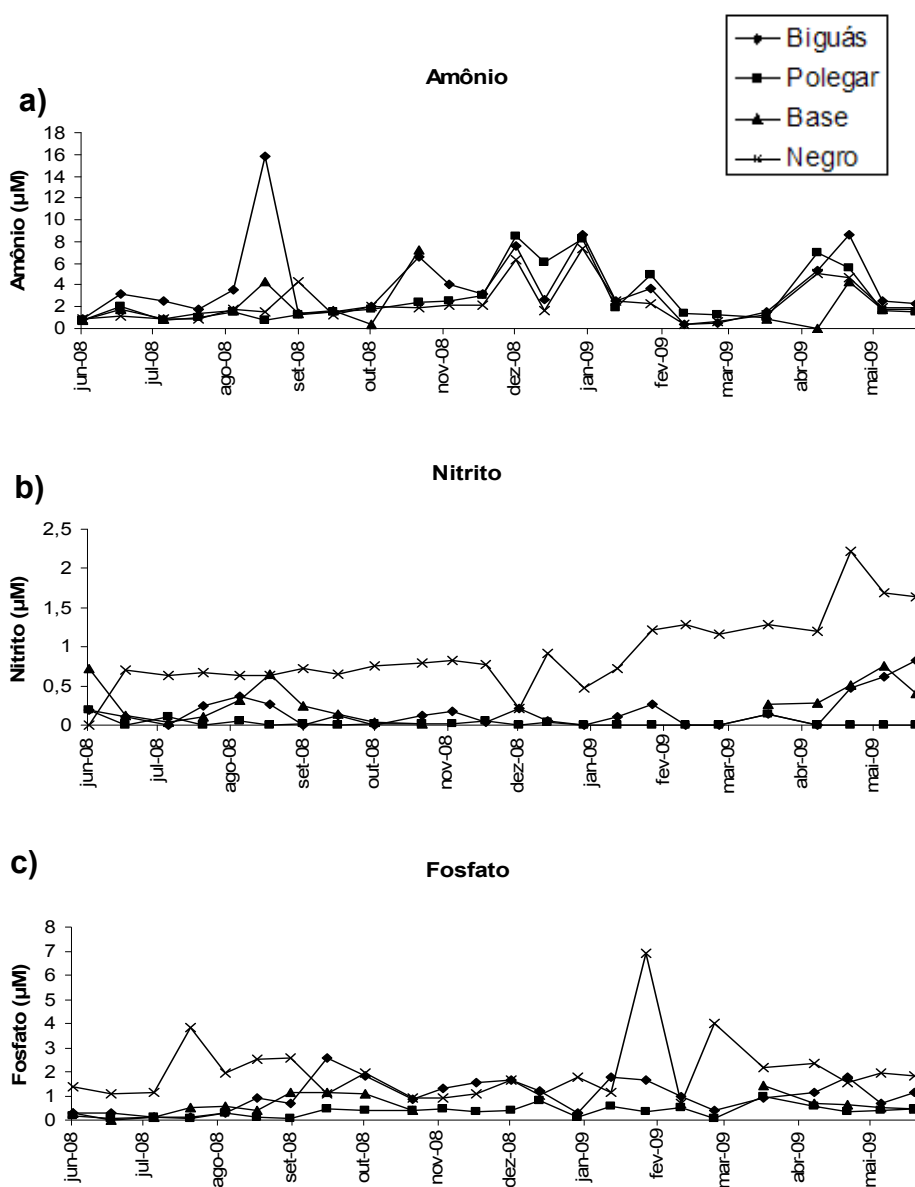


Figura 3: a) Variação do íon amônio, b) nitrito e c) fosfato (μM) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.

O maior valor para a variável seston, que ocorreu no Lago da Base, foi de 144,1 e 140,0 mg L⁻¹ nas amostras de 29 de julho e 30 de outubro, respectivamente, e no Lago Biguás foi de 100 mg L⁻¹ na amostra de 7 de janeiro (Figura 2d). Por outro lado, os menores valores foram encontrados no Lago Negro (0,2 mg L⁻¹ nas amostragens de agosto) e no Lago Polegar (0,5 mg L⁻¹, 10 de junho).

A variação na concentração do íon amônio está apresentada na Figura 3a. Nela podemos observar que o padrão de variação deste nutriente é semelhante para todos os ambientes, porém houve um pico (16 µM) na concentração deste íon na amostra 26 de agosto apenas no Lago Biguás.

A concentração do íon nitrito foi maior no Lago Negro, o qual teve um valor máximo de 2,2 µM na amostra 30 de abril, porém este nutriente não foi detectado na amostra de 10 de junho neste lago. Os menores valores foram encontrados no Lago Polegar, no qual em 11 amostras não foi detectado este nutriente. A variação na concentração deste nutriente foi semelhante nos Lagos Biguás e Base (Figura 3b).

No Lago Polegar a menor concentração de fosfato foi de 0,005 µM na amostra de 26 de junho e na mesma amostra, porém, no Lago da Base não foi detectado fosfato dissolvido (Figura 3c). No Lago Negro foi encontrada a maior concentração (7,0 µM na amostra 5 de fevereiro) para o íon fosfato e Lago Biguás a maior concentração foi de 2,5 µM (24 de setembro).

O maior acúmulo de precipitação ocorreu no mês de agosto entre os dias 13 e 26 (187,9 mm³). A pluviosidade acumulada teve uma tendência de ser maior no final do inverno e no final do verão. Não houve precipitação entre as coletas 30 de outubro e 12 de novembro e nem entre 10 e 22 de dezembro (Figura 4).

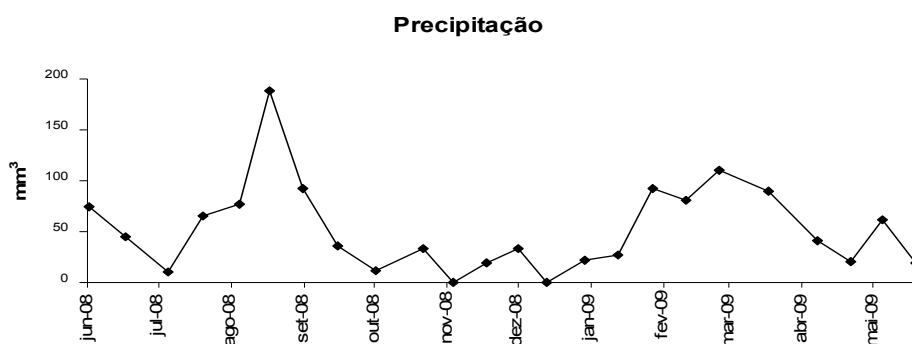


Figura 4: Precipitação acumulada (mm³) no período de junho de 2008 a maio de 2009.

3.1.2. Variáveis biológicas

A variação na concentração de clorofila *a* para os quatro lagos está apresentada na Figura 5, onde podemos ver que os maiores valores e a maior variabilidade foi encontrada no Lago Biguás (máximo de 311 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 7 de janeiro e mínimo de 34,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 16 de abril) (Figura 5a). Os menores valores para a variável clorofila *a* foram encontrados no Lago Polegar (Figura 5b), onde o mínimo foi de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (5 de março) e o máximo de 15,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (10 de dezembro). No Lago da Base (Figura 5c) os valores máximos da concentração de clorofila *a* ocorreram em 30 de outubro (47 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 26 de março (40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$). O Lago Negro (Figura 5d) apresentou valores mais baixos quando comparado ao Lago Biguás, porém teve dois picos de teor de clorofila *a* (171 e 95,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 22 de dezembro e 21 de janeiro, respectivamente).

O Lago Biguás apresentou as maiores abundâncias bacterianas entre os quatro lagos estudados e os maiores valores ocorreram durante as coletas de verão. Considerando separadamente as bactérias livres e aderidas, as maiores abundância foram de $1,76 \times 10^7 \text{ org ml}^{-1}$ (19 de fevereiro) e de $1,43 \times 10^7 \text{ org ml}^{-1}$ (5 de março), respectivamente, no Lago Biguás (Figura 6a).

A abundância das bactérias livres foi maior que a das bactérias aderidas em todas as amostras no Lago Polegar. O maior valor de densidade ocorreu na amostra de 10 de dezembro, tanto para as bactérias livres ($7,06 \times 10^6 \text{ org ml}^{-1}$) como para as aderidas ($6,19 \times 10^5 \text{ org ml}^{-1}$), entretanto, em várias amostragens estas não foram visualizadas (Figura 6b).

Na coleta do dia 30 de outubro ocorreu o maior valor de células bacterianas aderidas ($1,84 \times 10^7 \text{ org mL}^{-1}$) no Lago da Base, ultrapassando o número de bactérias de vida livre ($3,7 \times 10^6 \text{ org mL}^{-1}$). Nas demais coletas a abundância de bactérias livres foi sempre maior que a abundância de bactérias aderidas (Figura 6c).

O Lago Negro apresentou a maior abundância de bactérias ($7,7 \times 10^6 \text{ org mL}^{-1}$) na amostra de 10 de dezembro, contudo, nesta amostra, não foram visualizadas bactérias aderidas a partículas. Bactérias aderidas não foram encontradas em 10 das 24 coletas e a maior abundância foi na amostra de 21 de janeiro ($1,8 \times 10^6 \text{ org mL}^{-1}$) (Figura 6d).

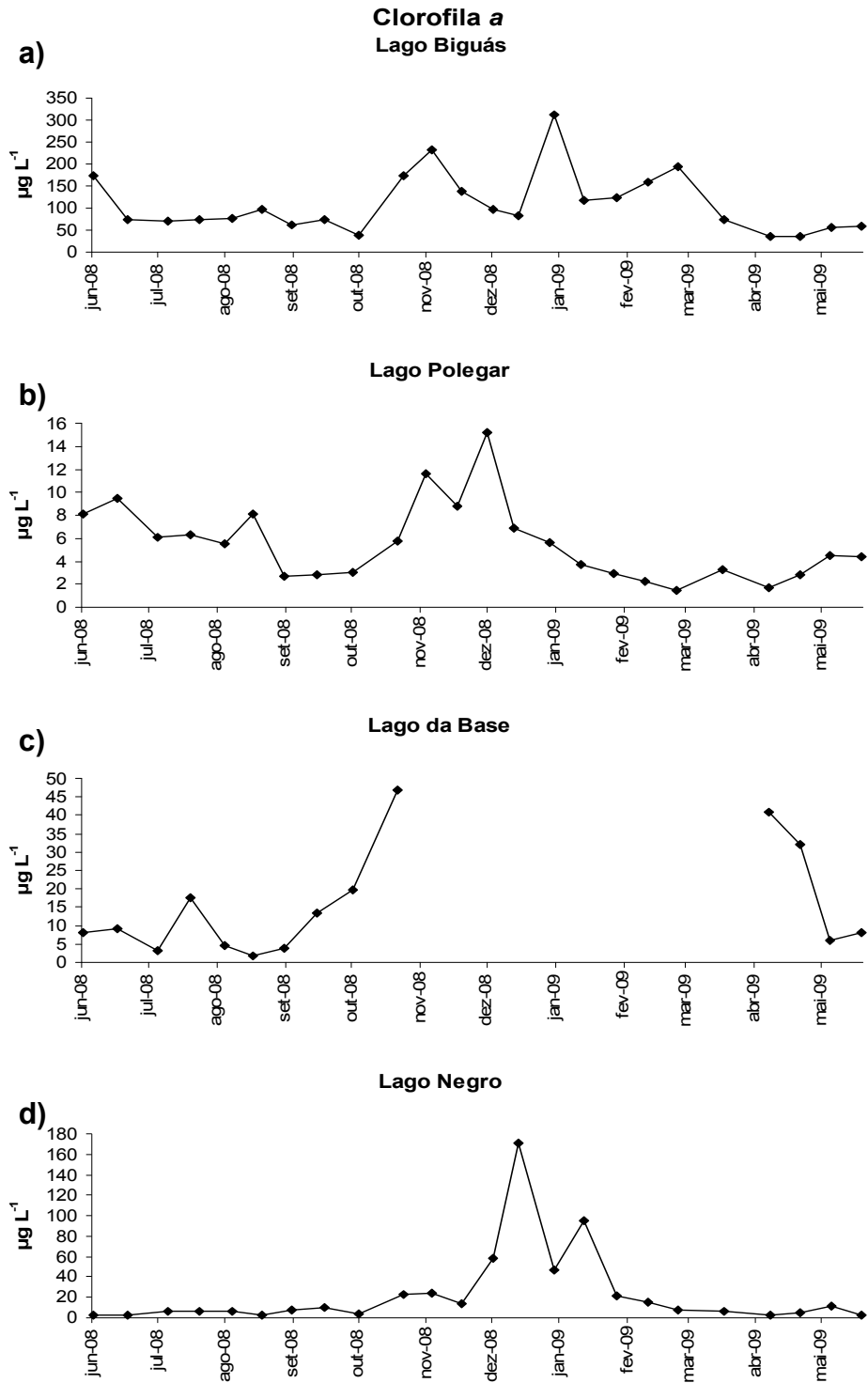


Figura 5: Variação da concentração de clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).

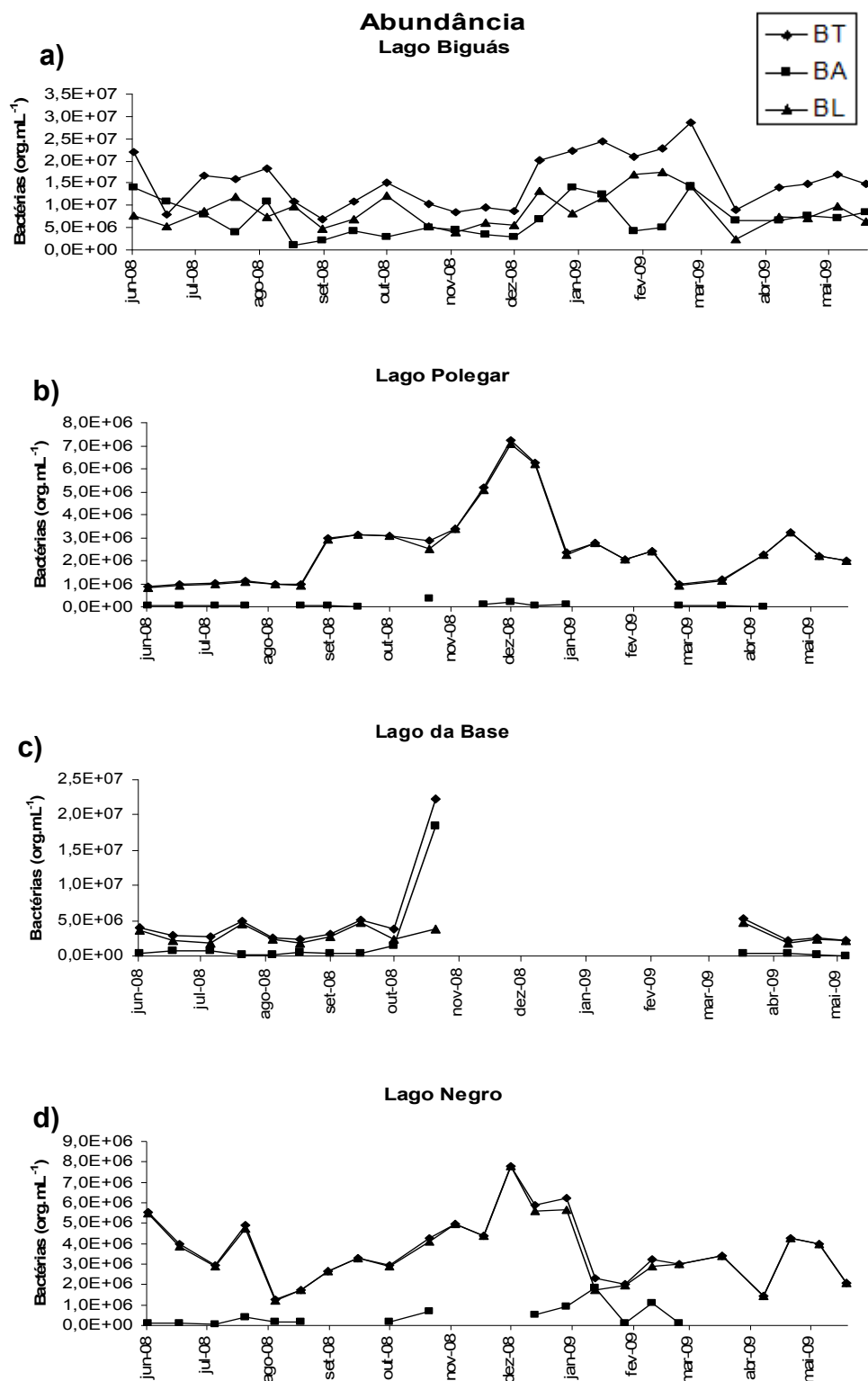


Figura 6: Abundância das bactérias (org mL^{-1}) totais (losango), aderidas (quadrado) e livres (triângulo) nos quatro lagos estudados (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.

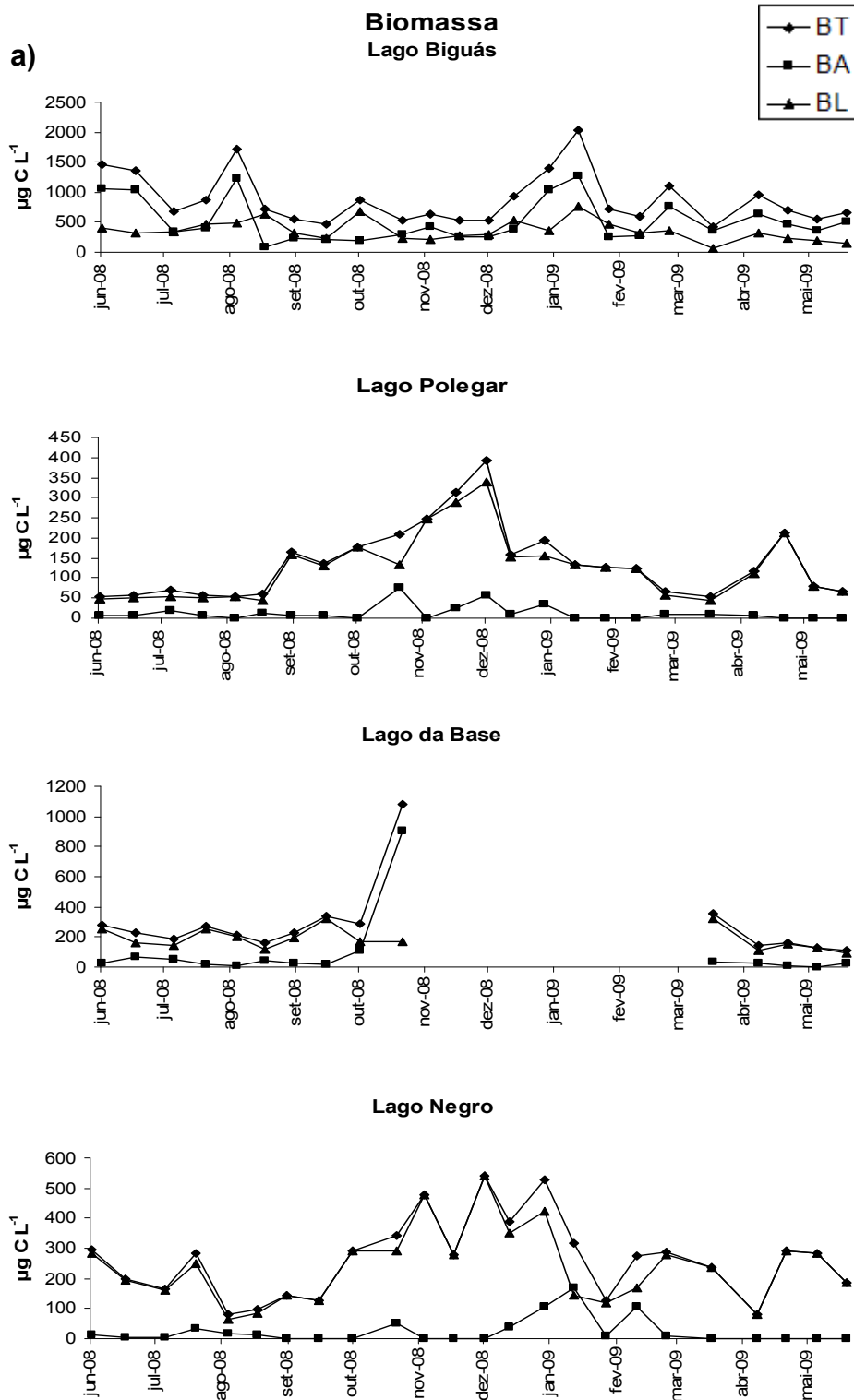


Figura 7: Variação da biomassa de bactérias ($\mu\text{g C L}^{-1}$) totais (losango), aderidas (quadrado) e livres (triângulo) nos quatro lagos estudados (Biguás, Polegar, Base e Negro) de junho de 2008 a maio de 2009.

O Lago Biguás teve a maior média anual de abundâncias de bactérias livres ($8,8 \times 10^6 \pm 3,9 \times 10^6 \text{ org ml}^{-1}$) e aderidas ($7,0 \times 10^6 \pm 3,9 \times 10^6 \text{ org ml}^{-1}$), separadamente. Além disso, este foi o único lago que apresentou diferença significativa das médias de abundância bacteriana em relação aos demais lagos. Os dados médios da abundância bacteriana dos quatro lagos estão apresentados na Tabela 2.

O único lago que não apresentou diferença significativa entre a média do biovolume das bactérias livres e aderidas foi o Lago da Base (Tabela 2). Neste lago, os menores valores para o biovolume de bactérias livres ($0,25 \mu\text{m}^3$) e aderidas ($0,29 \mu\text{m}^3$) ocorreram na mesma amostra (30 de outubro). A média para o biovolume das bactérias livres ($0,45 \mu\text{m}^3$) foi o mesmo para o Lago da Base e Negro. Entretanto, para as bactérias aderidas, a média do biovolume do Lago Negro ($0,61 \mu\text{m}^3$) foi maior do que a do Lago da Base ($0,52 \mu\text{m}^3$) e Polegar ($0,31 \mu\text{m}^3$). O Lago Biguás teve a menor média de biovolume de bactérias livres ($0,24 \mu\text{m}^3$). Para as bactérias aderidas o biovolume médio foi de $0,51 \mu\text{m}^3$, mais do que o dobro do medido para as bactérias livres.

Analisando a diferença do biovolume médio entre os ambientes, não houve diferença significativa entre os Lagos Biguás e Polegar e entre os Lagos Base e Negro em relação às bactérias livres. Enquanto que, para as bactérias aderidas, não foi encontrada diferença significativa entre a média de nenhum ambiente.

As bactérias aderidas apresentaram o maior valor de biomassa bacteriana ($1278 \mu\text{g C L}^{-1}$) no Lago Biguás na coleta do dia 21 de janeiro (Figura 7a). A menor variação de biomassa de bactérias aderidas foi encontrada no Lago Polegar, com um valor mínimo de $5 \mu\text{g C L}^{-1}$ e máximo de $77 \mu\text{g C L}^{-1}$, nas coletas onde haviam bactérias deste hábito (Figura 7b). No Lago da Base o maior valor de biomassa também foi referente às células aderidas ($908 \mu\text{g C L}^{-1}$) na coleta do dia 30 de outubro (Figura 7c). O maior valor de biomassa de células livres no Lago Negro foi de $543 \mu\text{g C L}^{-1}$ em 10 de dezembro (Figura 7d).

Os valores médios de biomassa bacteriana estão apresentados na Tabela 2. Mais uma vez o Lago Biguás apresentou os maiores valores, os quais foram significativamente diferentes de todos os demais lagos.

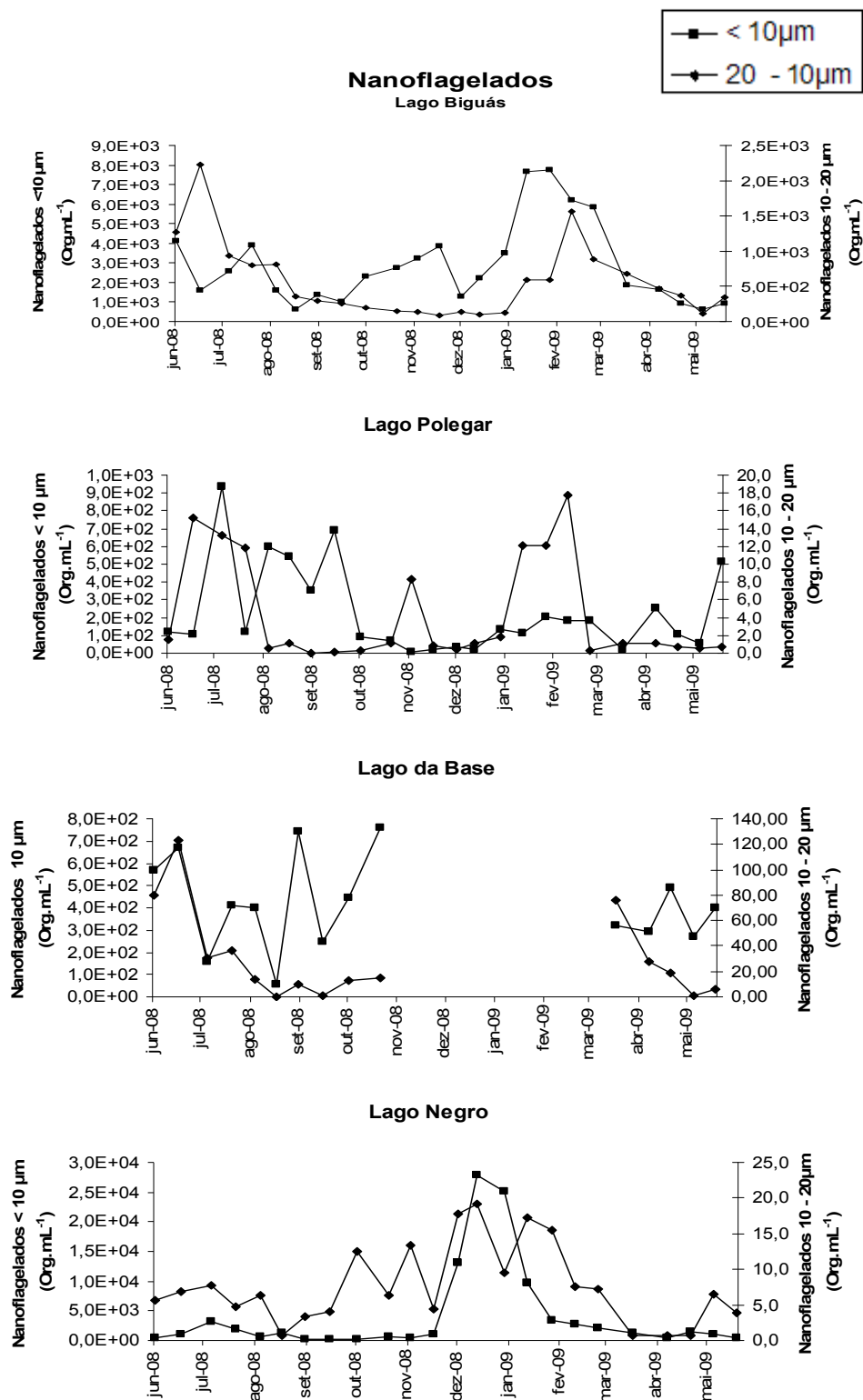


Figura 8: Variação da densidade de nanoflagelados (org mL^{-1}) $< 10 \mu\text{m}$ (quadrados) e de 10 a $20 \mu\text{m}$ (losangos) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).

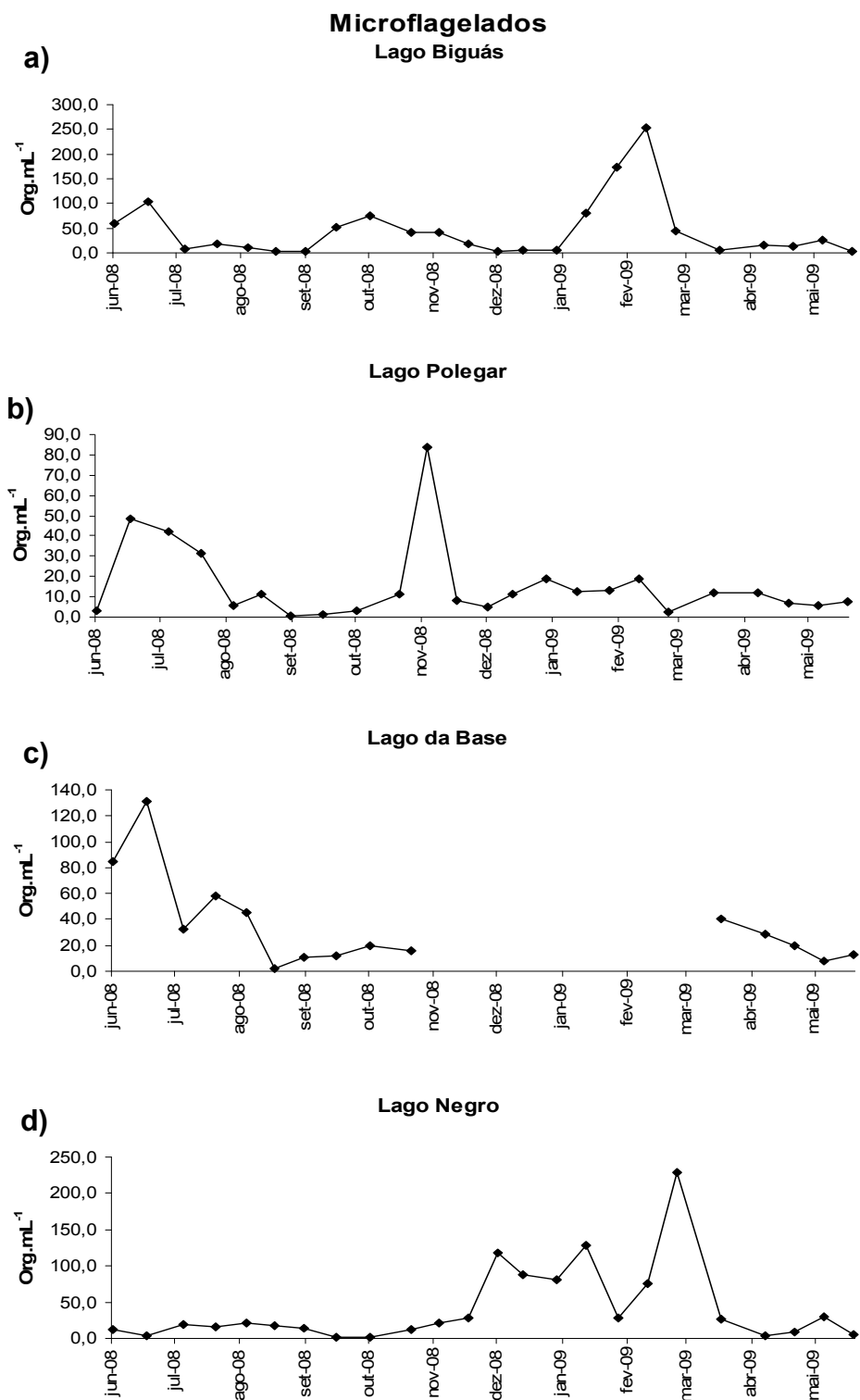


Figura 9: Variação da abundância de microflagelados (org mL⁻¹) nos quatro lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período de estudo (junho de 2008 a maio de 2009).

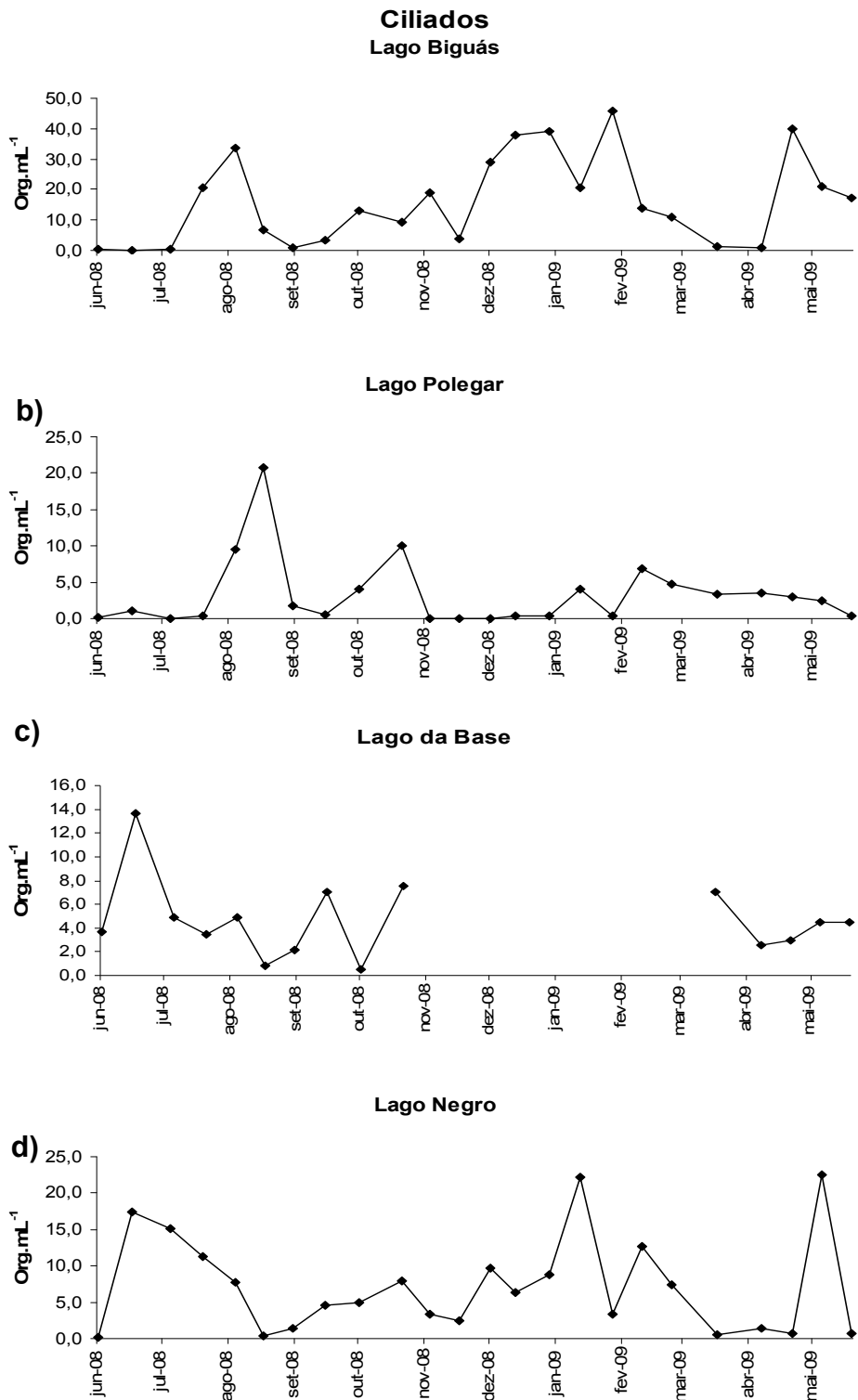


Figura 10: Variação da abundância de ciliados (org mL⁻¹) nos quatros lagos (Biguás, Polegar, Base e Negro) no período do estudo (junho de 2008 a maio de 2009).

O Lago Negro apresentou a maior oscilação na densidade de nanoflagelados < 10 µm (mínimo de $1,25 \times 10^2$ org mL⁻¹ e máximo de $2,8 \times 10^4$ org mL⁻¹, em 24 de setembro e 22 de dezembro, respectivamente). A maior densidade dos nanoflagelados < 10 µm no Lago Polegar foi de $9,3 \times 10^2$ org mL⁻¹ (14 de julho) e no Lago Base foi de $7,6 \times 10^2$ org mL⁻¹ (30 de outubro). No Lago Biguás os maiores valores foram entre 21 de janeiro ($7,6 \times 10^3$ org mL⁻¹) e 26 de março ($5,8 \times 10^3$ org mL⁻¹) (Figura 8).

Os nanoflagelados da classe de tamanho de 10 a 20 µm tiveram abundância menor que os nanoflagelados < 10 µm na maioria das amostras. No Lago Biguás, o maior valor de abundância destes nanoflagelados foi na amostra 26 de junho ($2,2 \times 10^3$ org mL⁻¹), do mesmo modo que no Lago da Base ($1,2 \times 10^2$ org mL⁻¹). No Lago Polegar e Negro o número máximo de nanoflagelados (10-20 µm) não chegou a 20 org mL⁻¹ (Figura 8).

A maior abundância de microflagelados foi encontrada no Lago Biguás na amostra de 19 de fevereiro ($252,4$ org mL⁻¹), seguida pela amostra 5 de março ($229,6$ org mL⁻¹) no Lago Negro (Figura 9). A menor oscilação na variação da densidade destes microorganismos ocorreu no Lago Polegar com um valor mínimo de $0,7$ org mL⁻¹ (9 de setembro) e um valor máximo de $83,8$ org mL⁻¹ (12 de novembro). No Lago da Base o maior número de microflagelados foi de $131,6$ org mL⁻¹ na coleta de 26 de junho.

Os ciliados foram os microorganismos menos abundantes em todos os ambientes estudados, sendo que em uma amostra do Lago Biguás (26 de junho) e em algumas amostras do Lago Polegar (14 de julho, 12 e 26 novembro e de dezembro) eles não foram encontrados. A maior abundância para estes microorganismos foi de $45,9$ org mL⁻¹ na amostra 5 de fevereiro do Lago Biguás assim, este foi o ambiente com a maior variação na abundância de ciliados. A maior densidade de ciliados no Lago Negro foi de $22,6$ org mL⁻¹ (14 de maio), no Lago Polegar foi de $20,8$ org mL⁻¹ (26 de agosto) e no Lago da Base foi de $13,7$ org mL⁻¹ (26 de junho) (Figura 10).

Tabela 2 : Valores médios das variáveis físicas e químicas (pH, condutividade, seston, amônio, nitrito e nitrato) e biológicas (clorofila a, microflagelados, nanoflagelados (20-10 e <10 µm), ciliados, abundância bacteriana, biomassa bacteriana e biovolume bacteriano). Dados apresentados com o desvio padrão.

	Lago Biguás	Lago Polegar	Lago Base	Lago Negro
pH	8,6 ± 1,0	7,2 ± 0,5	5,9 ± 0,4	5,5 ± 0,3
Condutividade (µmhos)	200,3 ± 21,8	99,0 ± 31,8	94,3 ± 28,7	114,2 ± 22,0
Seston (mg L ⁻¹)	44,9 ± 23,2	5,8 ± 8,0	33,1 ± 45,4	7,0 ± 6,9
Amônio (µM)	3,9 ± 3,4	2,8 ± 2,4	2,2 ± 1,8	2,4 ± 1,8
Nitrito (µM)	0,2 ± 0,2	0,03 ± 0,05	0,3 ± 0,2	0,9 ± 0,4
Fosfato (µM)	1,0 ± 0,6	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4	2,0 ± 1,3
Clorofila a (µg L ⁻¹)	109,3 ± 68,3	5,5 ± 3,3	15,4 ± 14,6	23,1 ± 38,3
Microflagelados (org ml ⁻¹)	44,1 ± 60,2	15,7 ± 18,9	34,9 ± 34,6	41,3 ± 54,2
Nanoflag. 20-10 µm (org ml ⁻¹)	5,6+02 ± 5,3+02	4,3 ± 5,8	30,0 ± 35,5	7,6 ± 5,6
Nanoflag. < 10 µm (org ml ⁻¹)	2,8+03 ± 2,1+03	227,5 ± 248,1	415,0 ± 205,9	4,1+03 ± 7,5+03
Ciliados (org ml ⁻¹)	16,2 ± 14,6	3,2 ± 4,7	4,7 ± 3,2	7,2 ± 6,7
Bactérias livres				
Abundância (org ml ⁻¹)	8,8+06 ± 3,9+06	2,5+06 ± 1,6+06	2,8+06 ± 1,1+06	3,6+06 ± 1,6+06
Biomassa (µg C L ⁻¹)	359,5 ± 171,7	126,6 ± 81,1	186,3 ± 71,7	239,7 ± 123,5
Biovolume (µm ³)	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,09	0,5 ± 0,08	0,4 ± 0,1
Bactérias aderidas				
Abundância (org ml ⁻¹)	7,0+06 ± 3,9+06	1,6+05 ± 2,6+05	1,6+06 ± 4,5+06	2,7+05 ± 4,5+05
Biomassa (µg C L ⁻¹)	513,8 ± 355,8	12,1 ± 19,1	92,4 ± 227,2	23,8 ± 43,3
Biovolume (µm ³)	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,14	0,6 ± 0,1

3.1.3. Análise estatística

A Análise de Componentes Principais (ACP) mostrou uma separação entre as amostras dos Lagos Biguás, daquelas dos Lagos Polegar, Base e Negro de acordo com o eixo 1 e uma separação dos Lagos Polegar e Negro, considerando-se o Eixo 2, confirmando a diferença entre os ambientes estudados (Figura 11). O componente 1 explicou 40% da variância dos dados, sendo que o Lago Biguás esteve relacionado principalmente as variáveis biológicas (abundância bacteriana, biomassa bacteriana, clorofila a, abundância de nanoflagelados e ciliados), enquanto que os demais lagos estiveram relacionados com as variáveis pH, condutividade e seston, (Tabela 3). No componente 2 o Lago Polegar relacionou-se com pH, enquanto que o Lago Negro teve maior influência do nitrito, fosfato e nanoflagelados.

Também foram feitas análises de ACP para cada lago com a média das variáveis por estações (Figura 12). Para o Lago Biguás os dois componentes explicaram em conjunto 83% da variação dos dados (Figura 12a). Todas as variáveis, exceto pH e fosfato, foram fortemente relacionadas ao componente 1 (Tabela 3), o qual correspondeu a 62% da variação dos dados. A abundância e biomassa bacteriana, os

flagelados, os ciliados, a clorofila *a* e a temperatura estiveram relacionadas positivamente e o amônio e o nitrito relacionados negativamente em relação ao Eixo 1. Notamos que a abundância e biomassa bacteriana apresentaram uma tendência a serem influenciadas por um conjunto de variáveis: predadores, temperatura, condutividade, seston e clorofila *a*. Na análise de regressão linear multivariada (Tabela 3) podemos ver que essa hipótese se confirma. Nenhuma variável influenciou significativamente a biomassa de bactérias aderidas, porém nos outros três casos (ABA, ABL, BBL) houve influência dos predadores, sendo que os ciliados estiveram relacionados apenas com a abundância de bactérias livres.

No Lago Polegar, 82% da variação total dos dados foi explicada pelos 2 componentes principais (Figura 12b), sendo o componente principal 1 o responsável por 49%. A abundância e biomassa bacteriana, a temperatura, o seston, o amônio e o fosfato foram fortemente e positivamente relacionados ao eixo 1, o qual separou as amostras do verão e primavera do outono e inverno. O componente 2 correspondeu a 33% da variação dos dados. Esta Figura nos sugere que tanto a abundância como a biomassa bacteriana foram relacionadas principalmente com a variação do seston e da clorofila *a*. Quando aplicamos a análise de regressão linear múltipla confirmamos tal suposição (Tabela 3). O seston foi a variável mais influente neste lago, porém outras variáveis também foram importantes na variação da abundância e biomassa do bacterioplâncton deste lago, como amônio, fosfato, predação e condutividade.

Os dois componentes principais da análise de ACP do Lago da Base explicaram 100% da variação dos dados (Figura 12c). O eixo 1 explicou 66% da variação dos dados e separa a primavera do outono e inverno. Tanto os valores de abundância como de biomassa bacteriana foram positivamente relacionados com a concentração do amônio, fosfato, seston e ciliados. Porém quando aplicamos a análise de regressão linear multivariada os resultados indicam que a abundância e biomassa de bactérias aderidas foram influenciadas principalmente pelo amônio, enquanto que a abundância de bactérias livres pelo seston (Figura 12). Neste lago, de acordo com os resultados da regressão linear múltipla, a relação entre bactérias e possíveis predadores não foi significativa.

No Lago Negro a análise de ACP também mostrou claramente uma separação temporal das amostras (Figura 12d) e a maior distância entre as bactérias livres e aderidas. O eixo 1 em conjunto com o eixo 2 representam 83% da variação dos dados. Os resultados de abundância e biomassa de bactérias aderidas, bem como a

abundância de nanoflagelados e ciliados, a clorofila *a* e o seston foram positivamente relacionadas ao eixo 1 (Tabela 3). O eixo 2 representou 26% da variação dos dados e separou as amostras do verão das demais estações do ano. A abundância e biomassa de bactérias (livres) e o amônio foram relacionadas positivamente a estação primavera, enquanto que a abundância e biomassa das aderidas foi maior no verão. Os resultados da análise de regressão linear multivariada nos mostram que a abundância e biomassa de BA foram influenciadas por um conjunto de variáveis, mas as variáveis que foram mais influentes foram a clorofila *a* e o amônio. Para as BL não foram encontradas variáveis significativamente importantes.

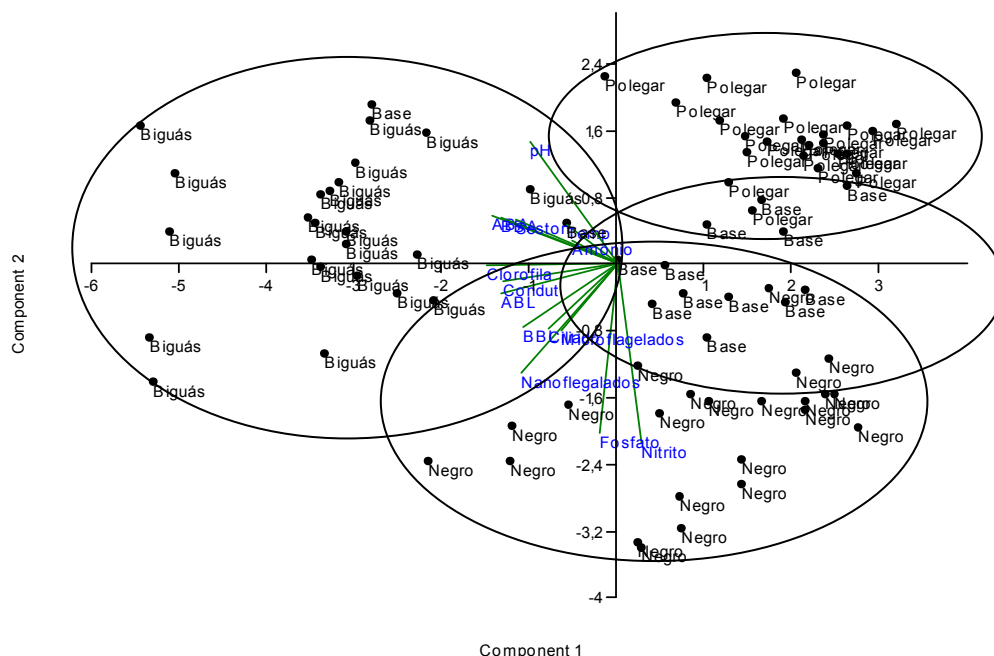


Figura 11: Resultados da ACP com as amostras de água coletadas nos Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro no período de junho de 2008 a maio de 2009 com os parâmetros biológicos e físico-químicos. ABT abundância bactérias totais, ABA abundância bactérias aderidas, ABL abundância bactérias livres, BBT biomassa bactérias totais, BBA biomassa bactérias aderidas, BBL biomassa bactérias livres.

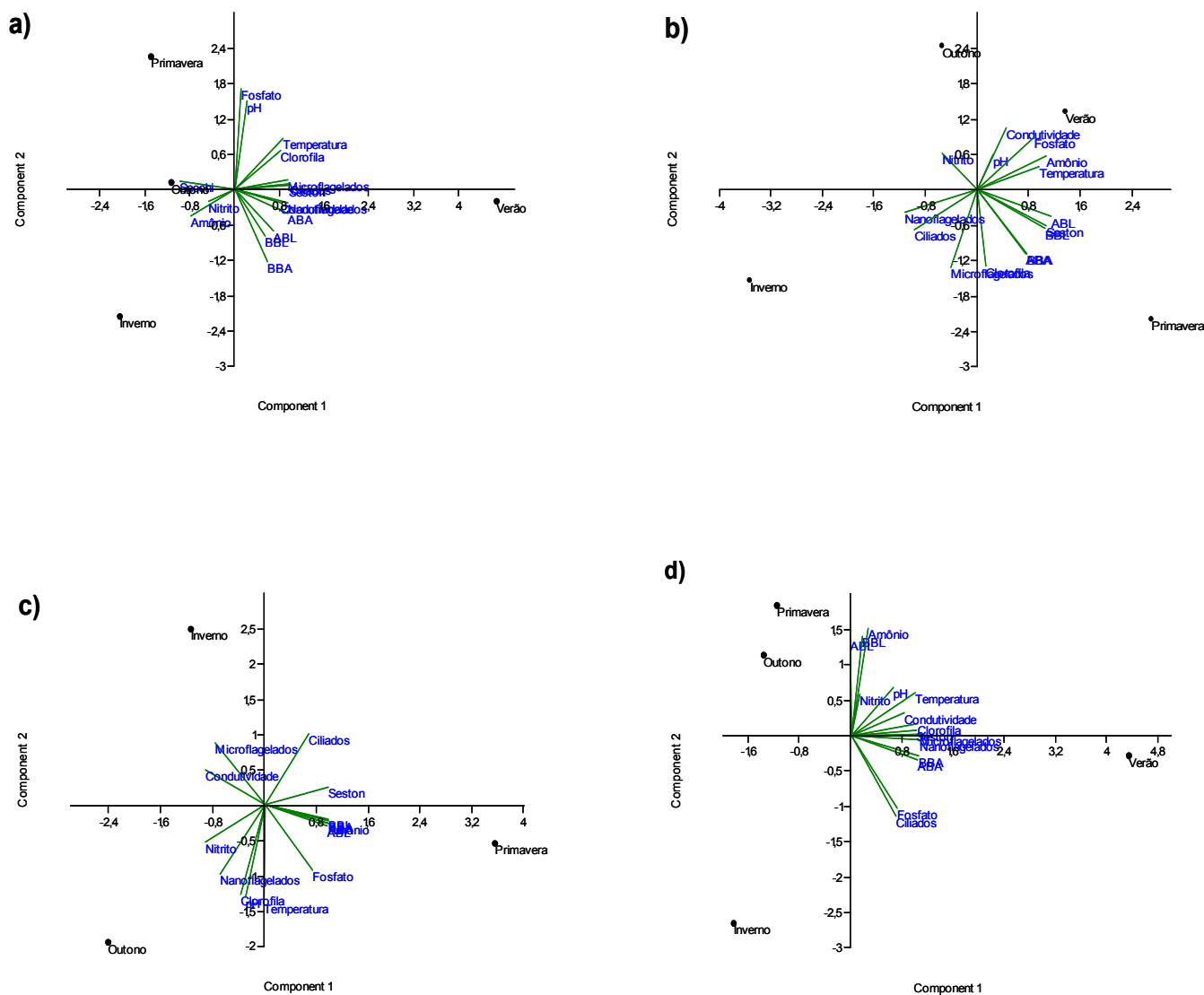


Figura 12: Resultados da ACP com as médias das variáveis ambientais por estações dos Lagos Biguás (A), Polegar (B), Base (C) e Negro (D) no período de junho de 2008 a maio de 2009. ABT abundância bactérias totais, ABA abundância bactérias aderidas, ABL abundância bactérias livres, BBT biomassa bactérias totais, BBA biomassa bactérias aderidas, BBL biomassa bactérias livres.

Tabela 3: Valores de “carga” das variáveis utilizadas na ACP para os eixos 1 e 2. A porcentagem de variação explicada pelos dois eixos é mostrada em itálico. F11, F12 são referentes às Figuras 11 e 12 (a, b, c e d). Os valores mais significativos estão apresentados em negrito.

	Geral		Geral		Biguás		Biguás		Polegar		Base		Base		Negro	
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 1	Eixo 2
	40%	15%	62%	21%	49%	33%	66%	34%	57%	26%						
	F11	F11	F12a	F12a	F12b	F12b	F12c	F12c	F12d	F12d						
ABA	-0,87	0,2161	0,9573	-0,2374	0,6244	-0,758	0,9832	-0,1826	0,9654	-0,2208						
ABL	-0,8072	-0,1404	0,6935	-0,418	0,9473	-0,3162	0,9766	-0,215	-0,01121	0,8533						
BBA	-0,8146	0,2059	0,5862	-0,715	0,6444	-0,7497	0,9866	-0,163	0,9789	-0,1864						
BBL	-0,6527	-0,2861	0,5538	-0,4675	0,8801	-0,4475	0,9895	-0,1449	0,1671	0,8771						
Clorofila a	-0,3554	0,1725	0,8312	0,3921	0,1085	-0,8925	-0,3787	-0,9255	0,9672	0,09917						
Nanoflagelados	-0,6036	0,5464	0,9674	-0,1379	-0,9456	-0,2655	-0,7054	-0,7088	0,9886	-0,04117						
Microflagelados	-0,7997	-0,07991	0,9598	0,09905	-0,3452	-0,9085	-0,7731	0,6343	0,9913	0,004209						
Ciliados	-0,7144	0,2017	0,9983	0,05628	-0,817	-0,4766	0,6795	0,7336	0,6464	-0,7183						
Temperatura	-0,3193	0,1052	0,8644	0,5028	0,7937	0,2617	-0,01519	-0,9999	0,9263	0,376						
Ph	0,1685	-0,8144	0,2123	0,8812	0,2015	0,4097	-0,3036	-0,9528	0,6064	0,4298						
Condutividade	-0,1274	-0,7629	0,823	-0,1356	0,3792	0,7143	-0,9333	0,3591	0,7727	0,2019						
Seston	-0,9135	-0,01045	0,9743	0,0368	0,8837	-0,4247	0,9818	0,1899	0,9489	0,04098						
Amônio	-0,393	-0,3029	-0,8087	-0,2682	0,8945	0,3911	0,9828	-0,1847	0,2585	0,9545						
Nitrato	-0,6689	-0,4942	-0,4701	-0,1176	-0,4484	0,4161	-0,9216	-0,3883	0,1318	0,3602						
Fosfato	-0,4747	-0,2979	0,1085	0,993	0,7353	0,6032	0,7449	-0,6672	0,6682	-0,6501						

3.2. Experimento de predação e produção- Lago Negro

3.2.1. Caracterização da água do lago

A temperatura da água do lago durante a coleta para este experimento foi de 17°C e o valor do pH foi de 5,76. Dentre os nutrientes nitrogenados, a amônia teve o valor de $1,23 \pm 0,05 \mu\text{M}$ e o nitrito de $0,76 \pm 0,02 \mu\text{M}$. A concentração do fosfato foi de $1,78 \pm 0,08 \mu\text{M}$.

A abundância bacteriana do lago foi, em média, $5,32 \times 10^6 \pm 6,9 \times 10^5 \text{ org mL}^{-1}$. O morfotipo mais abundante foi cocos com $3,92 \times 10^6 \text{ org mL}^{-1} \pm 3,2 \times 10^5$ e com uma porcentagem de 73,8% do total de bactérias. Os bacilos apresentaram uma abundância de $1,11 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5 \text{ org mL}^{-1}$ (20,8%), os vibrios de $2,77 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^4 \text{ org mL}^{-1}$ (5,2%) e as filamentosas de $1,17 \times 10^4 \pm 6,9 \times 10^3 \text{ org mL}^{-1}$ (0,2%).

Tabela 5: Biovolume médio dos diferentes morfotipos e grupos bacterianos no tempo inicial e final do experimento (após 24 h).

	Biovolume (μm^3)	
	Inicial	Final
Cocos	$0,15^a \pm 0,14$	$0,13^a \pm 0,14$
Bacilos	$0,36^a \pm 0,27$	$0,18^b \pm 0,11$
Vibrios	$0,33^a \pm 0,16$	$0,29^a \pm 0,23$
Filamentosas	$1,2^a \pm 0,83$	$0,91^b \pm 0,95$
Bacteria	$0,43^a \pm 0,46$	$0,32^a \pm 0,31$
Archaea	$0,44^a \pm 0,45$	$0,47^a \pm 0,49$
Alfa-Proteobacteria	$0,44^a \pm 0,42$	$0,55^a \pm 0,50$
Beta-Proteobacteria	$0,57^a \pm 0,79$	$0,61^a \pm 0,71$
Gama-Proteobacteria	$0,51^a \pm 0,40$	$0,66^a \pm 0,87$
Cytophaga-Flavobacter	$0,46^a \pm 0,50$	$0,54^a \pm 0,60$

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados do biovolume médio das células bacterianas no tempo inicial e final do experimento. Todos os morfotipos tiveram o biovolume celular menor no tempo final do experimento, contudo só houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os bacilos ($0,36 \pm 0,27$ e $0,18 \pm 0,11 \mu\text{m}^3$, biovolume inicial e final, respectivamente) e filamentosas ($1,2 \pm 0,83$ e $0,91 \pm 0,95 \mu\text{m}^3$, biovolume inicial e final, respectivamente). Quando analisamos a diferença do biovolume entre os morfotipos percebemos que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) apenas entre o

bacilo e o vibrio no tempo inicial e, adicionalmente, não houve diferença entre o biovolume de bacilos e cocos no final do experimento.

A assembléia de bactérias do lago apresentou 67% de Bacteria e 8,7% de Archaea. As bactérias do tipo Beta-Proteobacteria representaram 29,6% do total de bactérias já os grupos Cytophaga-Flavobacter, Alfa e Gama-Proteobacteria representaram, respectivamente, 4,15, 8,1 e 11,8 % do total de bactérias coradas com DAPI.

O menor biovolume celular médio foi medido nas células do grupo Gama-Proteobacteria ($0,66 \pm 0,87 \mu\text{m}^3$) no final do experimento. Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas para o biovolume das células dos diferentes grupos bacterianos, nem quando comparamos o tempo inicial e final de cada grupo (Tabela 5).

Na Figura 13 está apresentada a proporção dos diferentes morfotipos para cada grupo filogenético bacteriano. Podemos ver que a forma cocos é a mais representativa variando de 68% (Bacteria e Gama-Proteobacteria) a 75% (Alfa-Proteobacteria) das bactérias marcadas, seguida pela forma bacilos, a qual variou de 17% (Beta-Proteobacteria) a 25% (Bacteria). O morfotipo bacteriano vibrio foi o mais abundante entre as células do tipo Gama-Proteobacteria (11%) e Beta-Proteobacteria (10%). As bactérias filamentosas estiveram presentes apenas nos grupos Bacterias (0,5%), Alfa-Proteobacterias (1%) e Cytophaga-Flavobacter (1,5%).

Entre os possíveis bacterívoros, os mais abundantes foram os nanoflagelados com tamanho menor que $10 \mu\text{m}$, com uma abundância de $1,92 \times 10^3 \text{ org mL}^{-1}$, seguidos pelos nanoflagelados com tamanho entre $10 - 20 \mu\text{m}$ ($5,35 \times 10^2 \text{ org mL}^{-1}$). Os microflagelados apresentaram abundância de $4,6 \text{ org mL}^{-1}$ e os ciliados de $12,1 \text{ org mL}^{-1}$.

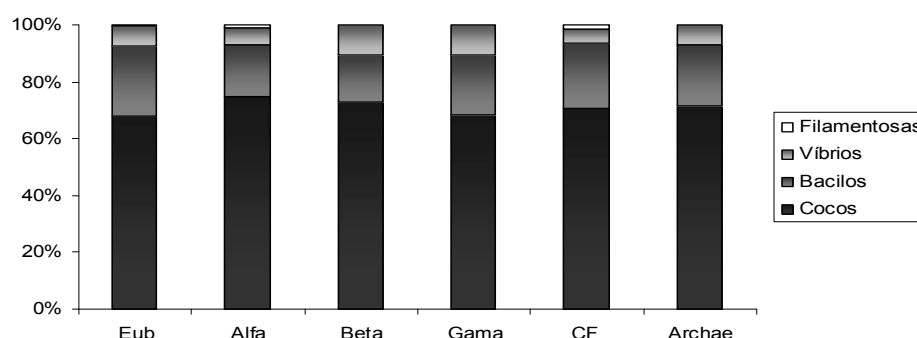


Figura 13: Variação da proporção dos diferentes morfotipos em cada grupo bacteriano.

3.2.2. Técnica da diluição e Hibridização *in situ* Fluorescente – FISH

A contagem de bactérias feitas nos tratamentos com diferentes níveis de diluição mostrou existir uma boa correlação entre o número de bactérias e a taxa de diluição, indicando que a filtração da água do lago com filtro Whatman GF/C (poro de 0,7 μm) foi eficiente na retenção de bactérias ($r^2 = 0,96$) (Figura 14).

A análise de regressão entre as bactérias totais (na maioria bactérias livres) e os diferentes níveis de diluição foi significativa ($r^2=0,86$) (Figura 15), apresentando uma taxa de crescimento (μ) de $1,78 \text{ dia}^{-1}$, sendo que o crescimento líquido (K_i) variou de 0,13 a $1,6 \text{ dia}^{-1}$, na diluição de 100x e 20x, respectivamente. Também foi observada bacterivoria (m) de $1,85 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 6).

Entre os morfotipos existentes as bactérias do tipo vibrio e filamentosa foram as mais predadas (Figura 16). Já as bactérias cocóides apresentaram os menores valores tanto para μ ($1,77 \text{ dia}^{-1}$) como para a bacterivoria (m) ($1,71 \text{ dia}^{-1}$). As bactérias da forma vibrio também apresentaram os maiores valores de μ ($3,1 \text{ dia}^{-1}$) e maior valor de K_i ($2,9 \text{ dia}^{-1}$) na diluição de 20% .

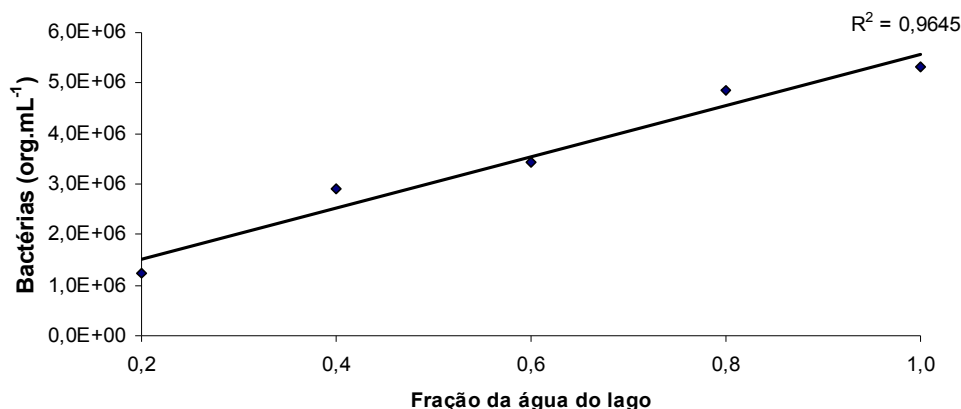


Figura 14: Abundância de células bacterianas nas diferentes diluições no tempo inicial do experimento.

A forma filamentosa apresentou m de $2,5 \text{ dia}^{-1}$ e μ $2,8 \text{ dia}^{-1}$, com um K_i máximo de $2,5 \text{ dia}^{-1}$. Já a forma bacilos teve m de $2,06 \text{ dia}^{-1}$ e μ de $2,3 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 6). Estes dois morfotipos apresentaram os menores r^2 (0,69 e 0,71 respectivamente) entre as análises de regressão dos morfotipos. Nenhuma das quatro formas bacterianas, nas diferentes diluições, apresentou valores de K_i negativo (Figura 16).

O FISH utilizado em conjunto com técnica da diluição também nos proporcionou diferentes resultados para os distintos grupos filogenéticos bacterianos (Figura 17). O grande grupo de Bacteria (Eub) teve uma taxa de crescimento de $1,78 \text{ dia}^{-1}$ e uma taxa de predação de $1,85 \text{ dia}^{-1}$, sendo o único tipo que não apresentou K_i negativo em nenhuma das diluições.

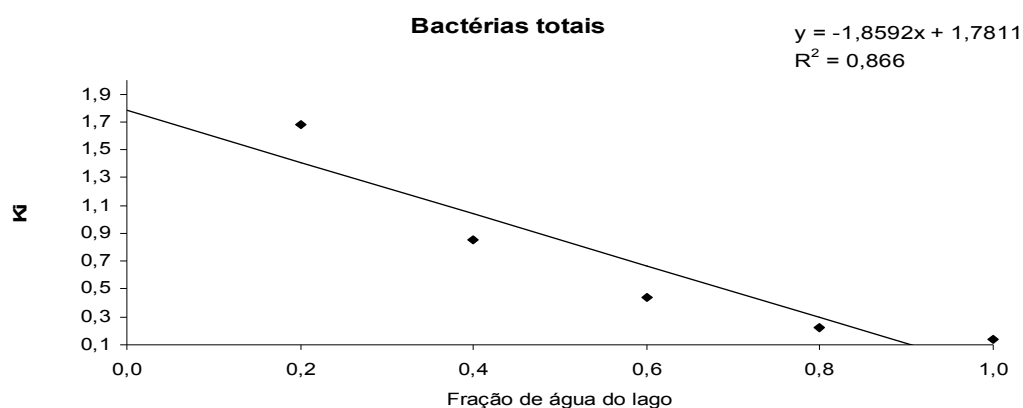


Figura 15: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) de bactérias totais no Lago Negro.

As células bacterianas do grupo Beta-Proteobacterias apresentaram o maior r^2 (0,98) entre todas as análises de regressão do experimento. Este grupo teve os maiores valores, tanto para μ ($1,8 \text{ dia}^{-1}$) como para m ($2,9 \text{ dia}^{-1}$) e K_i negativo nas diluições de 100 e 80%. Por outro lado, todas as taxas de K_i foram negativas para as bactérias do tipo Gama-Proteobacterias, as quais também tiveram o menor valor de μ ($0,07 \text{ dia}^{-1}$) com r^2 de 0,64. O grupo Alfa-Proteobacteria apresentou μ de $0,61 \text{ dia}^{-1}$ e m de $1,38 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 6). estas bactérias também não apresentaram um valor alto para r^2 (0,62) (Figura 17).

Foi possível notar, pelos baixos valores de r^2 , que a Técnica da Diluição não foi adequada para a estimativa das taxas de produção e predação de Archaea ($r^2 = 0,04$) e Cytophaga-Flavobacter ($r^2 = 0,14$) (Figura 18).

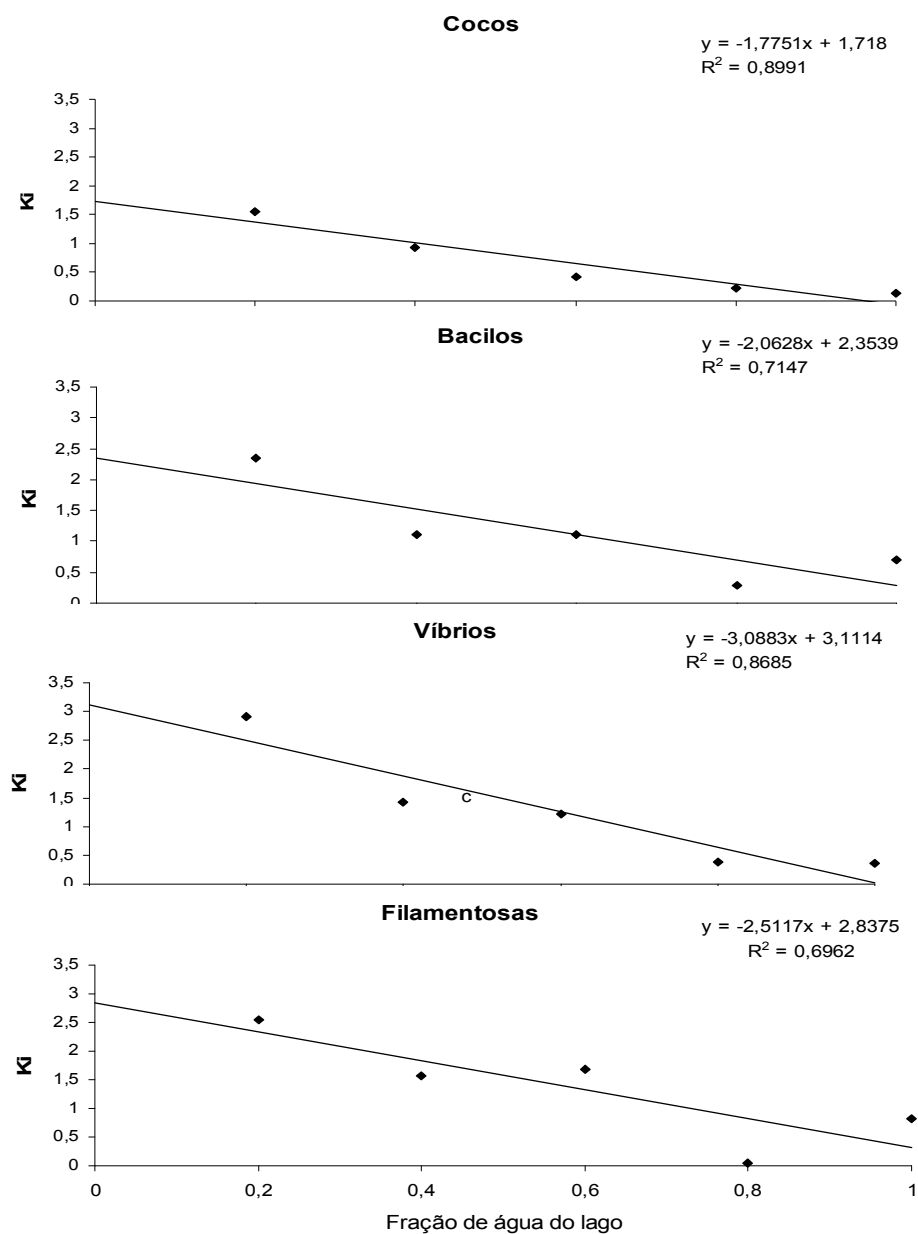


Figura 16: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (Ki) no experimento para os diferentes morfotipos bacterianos (Cocos, Bacilos, Vibrios e Filamentosas) no Lago Negro.

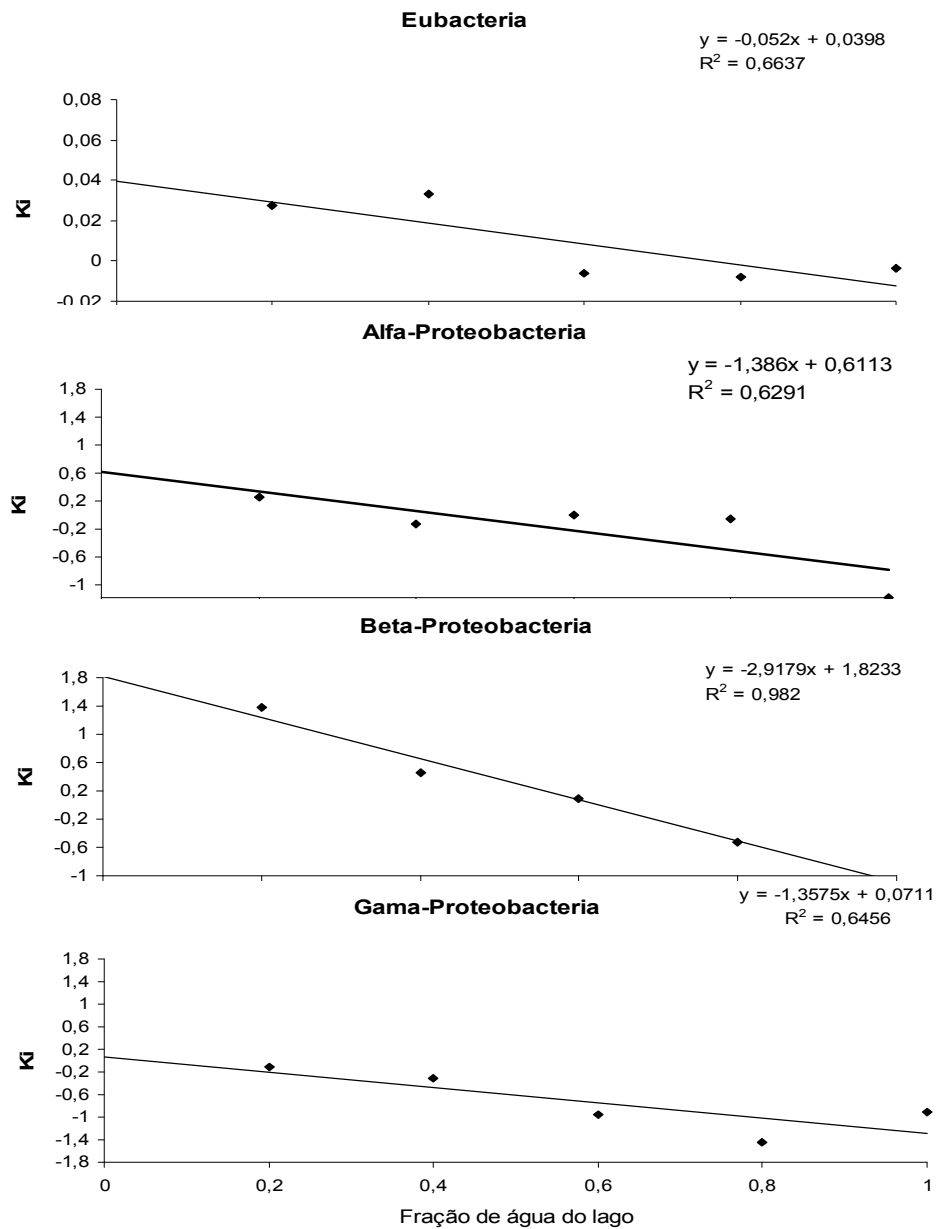


Figura 17: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) no experimento para os grupos bacterianos: Eubactéria, Alfa-Proteobacteria, Beta-Proteobacteria e Gama-Proteobacteria no Lago Negro.

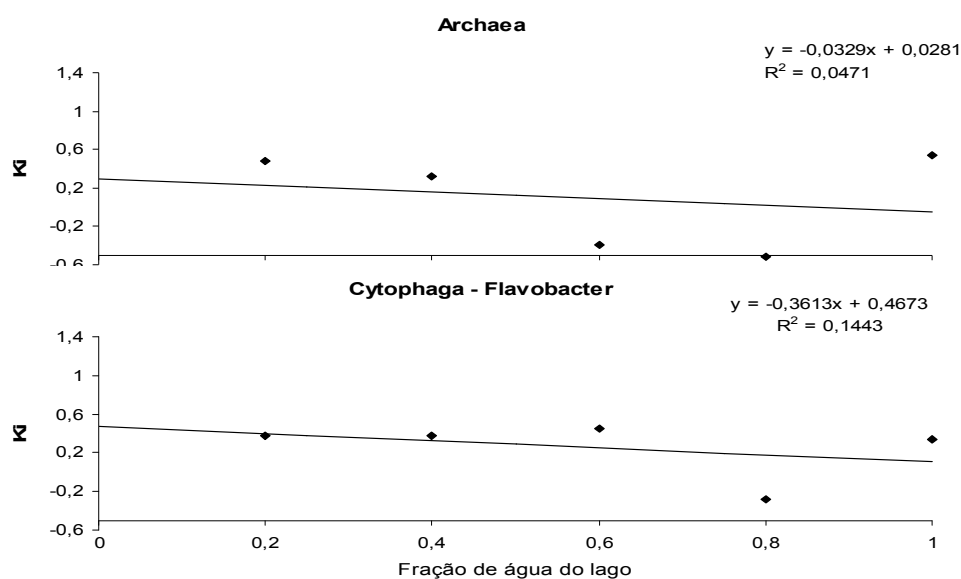


Figura 18: Análise de regressão entre a fração de água do lago e a taxa de crescimento líquido (K_i) no experimento para os grupos bacterianos: Archaea e Cytophaga-Flavobacter no Lago Negro.

Tabela 6: Taxas de crescimento (μ) e de predação (m) das bactérias totais, dos diferentes morfotipos e dos diferentes grupos filogenéticos do Lago Negro.

	μ (dia ⁻¹)	m (dia ⁻¹)
Bactérias totais (DAPI)	1,78	1,85
Cocos	1,77	1,71
Bacilos	2,35	2,06
Víbrios	3,11	3,08
Filamentosas	2,83	2,51
Eubacterias	0,95	1,24
Alfa – Proteobacterias	0,61	1,38
Beta – Proteobacterias	1,82	2,91
Gama – Proteobacterias	0,07	1,35

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudo sazonal – Lagos Biguás, Polegar, Base e Negro

Em um estudo anterior em nove lagos rasos no Campus Carreiros da FURG , incluindo os quatro analisados no presente trabalho, Souza (2007) achou uma diferença significativa na abundância da comunidade microbiana entre os ambientes estudados, além de uma diferença dos papéis desempenhados pelas bactérias livres (BL) e aderidas a partículas (BA) nestes ambientes. Esta autora sugeriu que estas últimas atuariam principalmente na decomposição de matéria orgânica particulada e na transferência da energia contida nos detritos para níveis tróficos superiores através de interações tróficas com protozoários. Assim, as bactérias aderidas teriam a sua abundância controlada principalmente pela predação, o que caracteriza um tipo de controle “top-down”. Por outro lado, as BL seriam mais importantes na mineralização e na circulação dos nutrientes e teriam o seu crescimento limitado pela disponibilidade de fosfato, caracterizando um controle “bottom-up”. Como estas informações foram obtidas a partir de relações estatísticas de dados coletados em uma única amostragem, foi desenvolvido este estudo sazonal com o objetivo de apresentar resultados mais precisos sobre as variações espacial e temporal do bacterioplâncton e de seus parâmetros controladores em alguns dos lagos rasos no Campus Carreiros.

Neste estudo, apesar de o fosfato ter sido relacionado à variação da abundância de bactérias livres (ABL), ou seja, de ter feito parte do grupo das variáveis que influenciaram a variação de tais bactérias, tanto do Lago Polegar como do Lago da Base, ele não foi o principal fator controlador da dinâmica destes microorganismos, como descrito por Souza (2007). O amônio também parece ter contribuído com a variação da abundância e biomassa de bactérias, conforme indicam os resultados da regressão linear multivariada. Este nutriente foi o único que apresentou uma variação anual similar nos quatro lagos (Figura 3), porém, apenas nos Lagos Negro, Polegar e da Base ele esteve relacionado às BA (tanto a abundância como biomassa). Para o Lago Biguás não foi observada nenhuma relação entre nutrientes e bactérias a partir das análises realizadas. Desta forma, ao contrário do que foi concluído por Souza (2007), pode-se dizer que nutrientes, como fosfato e nitrogênio, não são os principais controladores da dinâmica do bacterioplâncton, apesar dos mesmos serem considerados limitantes em ambientes aquáticos (Esteves 1998).

Apesar dos quatro lagos estudados serem ambientes pequenos, rasos e muito próximos, os resultados mostram que eles são bastante diferentes quanto a abundância e biomassa bacteriana. Entretanto, de maneira geral, parece haver uma forte relação entre a quantidade de clorofila *a* e a abundância bacteriana nos quatro lagos, indicando um claro controle “bottom-up”, isto é, um controle da abundância pela disponibilidade de nutrientes mas, neste caso, por carbono orgânico dissolvido (COD) (Currie 1990). Pace & Funke (1991), ao estudarem os lagos Peter e Paul em Michigan (USA) também observaram que a abundância bacteriana está muito relacionada ao aumento da clorofila *a* ao longo de um gradiente trófico.

A forte relação entre clorofila *a* e bactérias observada neste estudo está em desacordo com o que foi proposto por Souza (2007), que sugeriu que o principal aporte de COD par as bactérias nos lagos do Campus Carreiros provinha da decomposição de macrófitas aquáticas e de outros vegetais do entorno dos lagos, uma vez que estes autores não encontraram qualquer correlação forte entre a clorofila *a* e a abundância bacteriana quando realizada análise simultânea dos nove lagos. Isto indica que, apesar dos lagos do Campus Carreiros serem ambientes onde há uma grande entrada de carbono alóctone, o fitoplâncton parece ser a principal fonte de COD para o bacterioplâncton, como também observado em outros ambientes (Garnier & Benest 1990, Stenuite *et al.* 2009). Em alguns casos pode até mesmo haver uma relação tipo comensalismo entre eles, onde as bactérias podem beneficiar as algas ao disponibilizar fósforo através da remineralização, enquanto as algas fornecem o COD para as bactérias (Currie 1990).

Outra explicação para a relação entre BA e clorofila *a* seria a disponibilização de substrato. As microalgas mostraram-se importantes na formação dos agregados destes lagos e, conseqüentemente, no aumento da ABA ao fornecer substrato para o crescimento das mesmas (Rooney-Varga *et al.* 2005). Ao considerar as interações entre bactérias e microalgas, podemos considerar que a região circundante de uma célula algal torna-se uma região mais propícia para o crescimento de células bacterianas por causa da excreção de componentes orgânicos pela microalga, região conhecida como “focosfera” (*phycosphere*) (Cole 1982). Giroldo *et al.* (2003) ao estudarem a degradação dos polissacarídeos extracelulares de uma microalga por bactérias heterotróficas, relatam que as bactérias podem apresentar um degradação seletiva, o que aumenta a viscosidade dos polissacarídeos e, conseqüentemente, colaborar com a formação de agregados. A formação de agregados a partir de

microalgas e bactérias foi visível durante as contagens das células bacterianas nos lagos, onde as bactérias aderidas apareceram em maior proporção, especialmente no Lago Biguás, que dispunha de maior concentração de clorofila *a* e de partículas em suspensão. Lá, além das microalgas, as colônias de *Microcystis* sp. também podem fornecer microambientes para serem colonizados pelas bactérias (Brunberg 1999).

Entretanto, não se verificou uma relação linear entre a abundância bacteriana e as diferentes concentrações deste pigmento nos lagos estudados. Por exemplo, os Lagos Polegar e Negro apresentaram diferenças significativas entre as médias anuais de clorofila *a*. Entretanto, a variação anual e os valores máximos da abundância e biomassa bacteriana nos dois lagos foram muito semelhantes. Os valores de clorofila *a* medidos no Lago Negro foram muito maiores do que os medidos no Lago Polegar especialmente no mês de dezembro, onde houve um pico de clorofila *a* nestes dois lagos (Figura 5), sendo que no Lago Negro a concentração máxima foi de $180 \mu\text{gL}^{-1}$, enquanto que no Lago Polegar o valor máximo foi de $15,2 \mu\text{gL}^{-1}$. Neste mesmo período houve um aumento da abundância e biomassa bacteriana nesses dois lagos (Figura 6 e 7), porém o valor médio da abundância de bactérias foi similar nos dois ambientes.

O fato de não ter havido um incremento na abundância bacteriana no Lago Negro proporcional ao incremento da clorofila *a*, pode estar relacionado a um possível controle destas bactérias por predação (“top-down”). Analisando os resultados de abundância de flagelados, percebemos que o Lago Negro possui valores maiores que os encontrados no Lago Polegar, tanto para nanoflagelados ($< 10 \mu\text{m}$ e $10 - 20 \mu\text{m}$) como para microflagelados. Além disso, percebemos também que no mesmo período em que houve o pico de clorofila *a* no Lago Negro, ocorreu um aumento significativo na abundância de nanoflagelados, principalmente dos $< 10 \mu\text{m}$ (Figura 8). A possível relação entre as bactérias e os flagelados foi também indicada pelos resultados da ACP, que mostram que a abundância e biomassa bacteriana estão relacionadas aos nano - e microflagelados no Lago Negro. Esta mesma relação não foi observada no Lago Polegar. Outro fato importante a se ressaltar é que no Lago Polegar as bactérias livres e aderidas apresentaram biovolume médio menor que as do Lago Negro. Tal resultado pode ser efeito do menor aporte de nutrientes (Jürgens 1994, Cotner & Biddanda 2002), o que pode estabelecer uma comunidade com menor biovolume médio de bactérias livres e aderidas.

Em lagos rasos férteis, como a disponibilidade de nutrientes acaba não sendo um fator limitante, podendo suportar uma alta densidade bacteriana, a predação pode

ser a principal controladora da comunidade bacteriana (Jürgens *et al.* 1999). A partir dos resultados das análises do Lago Biguás, tanto da ACP como da regressão multivariada, verifica-se que os protozoários fizeram parte do grupo das variáveis que influenciaram a variação das bactérias. Desta forma, concluímos que a predação também foi importante neste lago. Souza (2007) indicou que o controle “top-down” estaria agindo principalmente sobre as bactérias aderidas a partículas presentes neste lago, já que o biovolume dessas tende a ser maior que o das bactérias livres, o que pode torná-las mais vulneráveis à predação (Kirchman 1983, Abreu *et al.* 1992). No presente estudo nós verificamos que tal diferença no biovolume existe. Contudo, apesar das BL do Lago Biguás terem o biovolume médio menor que as BA, os resultados, principalmente da regressão multivariada, indicam que elas também sofreram predação. Diferentemente do Lago Polegar onde o menor biovolume das bactérias parece estar relacionado ao menor aporte de nutriente, o menor tamanho das bactérias livres no Lago dos Biguás pode ser uma consequência da predação, ou seja, a redução no tamanho celular pode estar sendo uma estratégia de fuga da predação (Pernthaler 2005). Adicionalmente, a ABL foi menor que a ABA em algumas coletas, o que também reforça a hipótese de predação sobre as mesmas.

O bacterioplâncton também pode sofrer influência de fatores extrínsecos ao ambiente (Kent *et al.* 2007). Os padrões de variação anuais da densidade de bactérias nos Lagos Polegar e Negro parecem se relacionar inversamente com o padrão de variação anual da pluviosidade na região. Este fato nos leva a concluir que no período de menor pluviosidade (primavera e início do verão) o aumento da abundância bacteriana deveu-se a redução do volume de água nos lagos, num processo de concentração, como já observado em lagos da região Norte que sofrem grande influência da chuva (Anésio *et al.* 1997). Em épocas de menor pluviosidade, lagos rasos também podem acabar secando, como ocorreu com o Lago da Base. Neste caso, na coleta que precedeu a seca do mesmo houve um aumento na quantidade de seston, o qual foi colonizado por células bacterianas aumentando, assim, a densidade de bactérias aderidas a partículas (BA). Tal fato parece ser o resultado da maior re-suspensão do sedimento na água por ação do vento, como observado em muito lagos rasos (Lampert & Sommer 2007). Porém, mesmo ventos fortes, comuns na região estudada, não foram capazes de atuar no sedimento do Lago Negro, que é protegido não apenas por macrófitas, mas também por uma plantação de *Eucaliptos sp.*, no seu entorno.

Em resumo, os nossos resultados indicam que a disponibilidade de COD proveniente do fitoplâncton parece ser um dos principais fatores controladores da dinâmica de bactérias nestes lagos. Entretanto, a predação no Lago Negro parece ter sido um fator controlador das bactérias neste ambiente de maior magnitude do que a clorofila *a*. Em função disso, foi realizado um estudo mais detalhado sobre a predação sobre as bactérias no Lago Negro, onde foi utilizada a técnica da diluição juntamente com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (“Fluorescent in situ Hybridization” – FISH), para evidenciar uma possível predação diferenciada sobre diferentes morfotipos, ou diferentes grupos de bactérias.

4.2. Experimento de produção e predação – Lago Negro

Ao avaliarmos os resultados das bactérias totais do experimento realizado no Lago Negro, podemos verificar que as taxas de predação e de produção se equivaleram (Figura 15). Sendo assim, estes resultados confirmam a hipótese de que as bactérias produzidas estão sendo consumidas por protozoários numa taxa similar em que estão sendo produzidas e, por isto, não há um aumento significativo da abundância bacteriana neste lago, a despeito dos maiores valores de clorofila *a*. Desta forma, pode-se dizer que efeito “top-down” é predominante neste período do ano.

Valores de produção e consumo similares foram encontrados para todos os morfotipos bacterianos (Figura 16). Entretanto, quando avaliamos os resultados dos grupos bacterianos hibridizados pelo FISH, verifica-se que as taxas de predação foram maiores do que as de produção (Figura 17), o que conseqüentemente deve estar causando uma maior redução na abundância destes grupos específicos de bactérias o que, com o tempo, pode levar a uma mudança na estrutura da comunidade bacteriana.

De maneira geral, já era esperado que o grupo das Beta-Proteobacteria apresentasse a maior proporção de células hibridizadas por ser reconhecido como um dos grupos mais abundantes em ambientes aquáticos dulcícolas (Brachvogel *et al.* 2001; Tang *et al.* 2009, Zeng *et al.* 2009). Os demais grupos estudados como Gama-Proteobacteria, Alfa-Proteobacteria e Cytophaga-Flavobacter ocorreram em menores proporções (11,8%, 8,1% e 4,1%, respectivamente). Nossos resultados confirmam que o grupo Cytophaga-Flavobacter, apesar de ser um dos grupos dominantes em ambientes aquáticos marinhos (Glöckner *et al.* 1999, Cottrell & Kirchman 2000), não é abundante em água doce (Kirchman 2002). As Alfa-Proteobacterias parecem ser mais comuns em ambientes de água doce do que as Gama-Proteobacterias (Pernthaler *et al.*

1998, Zwister *et al.*, 2003), entretanto, de acordo com nossos resultados, não foi possível estabelecer o mesmo padrão para o lago do Campus Carreiros.

Estudos mais recentes com base nos genes 16S rRNA e FISH, têm demonstrado que o domínio *Archaea* tem uma distribuição generalizada, contudo, elas costumam representar uma baixa fração das células detectadas com a hibridização *in situ* em águas superficiais (< 2%) (Bouvier & del Giorgio 2003). No Lago Negro nós visualizamos uma fração de 8,7% de *Archaea*, o que se aproxima do resultado obtido por Jürgens *et al.* (2000) que acharam uma média de 7 +/- 2% em ambientes lênticos.

O tamanho e a morfologia das bactérias estão entre os fatores determinantes da predação destes microorganismos por protistas (Hahn & Höfle 2001), uma vez que a bacterivoria exercida pelos protozoários é reconhecida como seletiva (Sherr *et al.* 1992). Bactérias pequenas podem ser menos predadas, sendo esta característica uma estratégia de fuga da predação (Kuppo-Leinikki 1990; Abreu *et al.*, 1992; Pernthaler 2005). Nossos resultados mostram que as bactérias cocóides, que apresentaram menor biovolume médio, foram as que tiveram as menores taxas de predação (Tabela 6). Já a segunda menor taxa de predação foi medida para os bacilos, os quais após as 24 horas de experimento tiveram o seu tamanho reduzido e passaram ter seu biovolume semelhante ao dos cocos (Tabela 5).

Como os flagelados bacterívoros acabam predando mais as células de tamanho médio (Jürgens *et al.* 1994), outra forma de reduzir a pressão de predação é o aumento da célula bacteriana, ou seja, bactérias maiores como as filamentosas também são consideradas mais resistentes a predação, especialmente em ambientes eutróficos (Kuppo-Leinikki 1990, Jürgens *et al.* 1999). Todavia, em nosso estudo as bactérias filamentosas apresentaram a segunda maior taxa de predação entre os quatro morfotipos estudados. Apesar dos nanoflagelados serem considerados os principais protozoários responsáveis pela bacterivoria (Sanders 1992) e serem os mais abundantes neste lago, eles parecem ser mais aptos a consumir bactérias com comprimento menor que 2,4 µm (Jürgens *et al.* 1999). Como as células filamentosas apresentaram um comprimento médio de 5,5 µm os microflagelados ou os ciliados devem ter sido os principais responsáveis pela predação desse morfotipo. Desta forma, parece que no Lago Negro a predação pode estar vinculada ao tamanho celular, sendo os morfotipos de tamanho reduzido mais resistentes a predação e, por isso, mais abundantes.

As Eubacterias, Alfa e Gama-Proteobacterias apresentaram taxas de predação muito semelhantes (Figura 17), enquanto que o grupo das Beta-Proteobacteria apresentou a maior taxa de predação do experimento, sendo essa maior que o dobro das taxas medidas para os demais grupos. Tal diferença não pode ser explicada pela proporção de morfotipos em cada grupo bacteriano, uma vez que as células cocóides foram as mais abundantes em todos os grupos bacterianos e as que apresentaram a menor taxa de predação entre os morfotipos (Figura 13).

Assim, neste caso, a predação deve estar sendo influenciada por outros fatores que não foram medidos neste experimento. Estudos têm demonstrado que a predação seletiva por protozoários pode ser influenciada não apenas pelo tamanho e morfologia da presa, mas também pelas características de sua superfície, motilidade, capacidade de agregação, estado de divisão e composição bioquímica (Jürgens & Matz, 2002) e estes fatores podem ser característicos de diferentes grupos filogenéticos de bactérias. Além disso, diferentes espécies possuem diferentes características nutricionais, podendo ser outro fator influente na predação seletiva por protozoários (Pernthaler 1995). Esse mesmo autor também sugere que a predação também depende do estado nutricional do predador, pois se o mesmo estiver saciado ele pode ser menos seletivo.

Yokokawa & Nagata (2005) também realizaram um experimento utilizando a técnica da diluição em conjunto com o FISH e também acharam diferentes taxas de produção e predação para os distintos grupos filogenéticos. Eles concluíram que grandes grupos filogenéticos não diferem apenas em relação às taxas de crescimentos, mas também na forma como as taxas de crescimento respondem às diferentes variáveis ambientais. Eles ainda lembram que cada grupo filogenético bacteriano estudado é formado por uma grande variação de subgrupos, ou seja, que as taxas de produção e de predação obtidas são fruto do coletivo, podendo ser mais influenciadas pelos resultados de subgrupos dominantes.

Enfim, como para a maioria dos casos estudados as taxas de produção e predação foram muito semelhantes, isso sugere que a abundância bacteriana deste lago está em equilíbrio. Se compararmos dados de produção e de predação bacteriana em diferentes ambientes, normalmente, há uma forte correspondência entre estes dois fatores (1:1), neste caso acredita-se que a bacterivoria é a principal causa da mortalidade bacteriana (Sanders 1992). Portanto, nossos resultados estão indicando que as bactérias produzidas estão sendo consumidas por protozoários, ou seja, a

predação pode estar sendo mesmo a responsável por a abundância de bactérias não ter acompanhado o aumento da clorofila *a* no Lago Negro durante o estudo sazonal.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

As observações feitas acima reafirmam a importância da comunidade bacteriana em estudos limnológicos e nos lagos estudados. Porém, como esta é uma comunidade influenciada por inúmeros fatores e que pode apresentar variações tanto espaciais como temporais, é aconselhado que outros trabalhos sejam realizados para entendermos melhor o papel e a importância do bacterioplâncton desses lagos rasos.

Sugestões para trabalhos futuros:

1. Continuar a análise sazonal das variáveis limnológicas e dos microrganismos, com o intuito de confirmar os padrões apresentados para os presentes lagos.
2. Realizar experimentos de produção e predação nos demais lagos para confirmar se há diferença entre eles e, caso haja, se variam de acordo com o estado trófico do ambiente.
3. Realizar experimentos de produção e de predação em diferentes estações do ano.
4. Realizar experimentos medindo também as taxas de respiração das bactérias (livres e aderidas) para ser calculado a eficiência de crescimento nos diferentes lagos e, assim, estimar de maneira mais precisa a produção.
5. Identificar os grupos filogenéticos e suas proporções nos quatro lagos durante um estudo sazonal.
6. Caracterizar separadamente as bactérias livres e aderidas do sistema através de técnicas moleculares.
7. Estudar o virioplâncton e seu impacto na redução das populações bacterianas. A Técnica da Diluição também pode ser usada para estimar a taxa de lise viral.
8. Identificar os principais protozoários, ou seja, os possíveis bacterívoros.
9. Realizar experimento de predação “in situ” para caracterizar de forma mais precisa o impacto da predação sobre as células bacterianas.

10. Realizar estudo simultâneo de vários componentes da cadeia alimentar destes lagos, incluindo o macrozooplâncton.
11. Analisar a relação das bactérias livres e aderidas com a qualidade da matéria orgânica dissolvida.

6. LITERATURA CITADA

- ABREU, PC, BA BIDDANDA & C ODEBRECHT. 1992. Bacterial dynamics of the Patos lagoon estuary, southwestern Brazil: relationship with phytoplankton and suspended material. *Estuar. Coastal and Shelf Sci.*, 35: 621 – 635.
- ALBERTONI, EF, LJ PRELLVITZ & C PALMA-SILVA. 2007. Macroinvertebrate fauna associated with *Pistia stratiotes* and *Nymphoides indica* in subtropical lakes south Brazil). *Braz. J. Biol.*, 67 (3): 499 – 50.
- ALBERTONI, EF, C PALMA-SILVA & CC VEIGA. 2005. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados associada as macrófitas aquáticas *Nymphoides indica* e *Azolla folliculoides* em dois lagos subtropicais (Rio Grande, RS, Brasil). 27 (3): 137 – 145.
- AMANN, RI. 1995. Fluorescently labelled, rRNA – targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.*, 4: 543 – 554.
- ANÉSIO, AM, PC ABREU & FA ESTEVES. 1997. Influence of the Hydrological Cycle on the Bacterioplankton of an Impacted Clear Water Amazonian Lake. *Microb. Ecol.* 34: 66 – 73.
- ANÉSIO, AM, PC ABREU & BA BIDDANDA. 2003. The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. *Estuar. Coastal and Shelf Sci.*, 56: 197 – 201.
- AUER , B, U ELZER & H ARNDT. 2004. Comparison of pelagic food webs in lakes along a trophic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. *J. Plankton Res.*, 26 (6): 607 – 709.
- AZAM, F, T FENCHEL, JG FIELD, JS GRAY, LA MEYER-REIL & F THINGSTAD. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 257 – 263.
- BERNINGER, UG, BJ FINLAY & PK LEINIKKYI. 1991. Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnol. Oceanogr.*, 36 (1): 139 – 147.

- BILLE, G, P SERVAIS & S BECQUEVORT. 1990. Dynamics of bacterioplâncton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiol.*, 207: 37 – 42.
- BOUVIER, T & PA GIORGIO. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *Microb. Ecol.*, 44: 3 – 15.
- BRACHVOGEL T, B SCHWEITZER & M SIMON. 2001. Dynamics and bacterial colonization of microaggregates in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 23 – 35.
- BRUNBERG A. 1999. Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake. *Microb. Ecol.*, 29: 13 – 22.
- CARLSSON P & DA CARON. 2001, Seasonal variation of phosphorus limitation of bacterial growth in a small lake. *Limnol. Oceanogr.*, 46: 108 – 120.
- CARON, AD. 2001. Protistan herbivory and bacterivory. In: Paul JH (ed) *Methods in Microbiology*. Editory Academic Press. 666p.
- CASTILLO, MM, GW KLING & JD ALLAN. 2003. Bottom-up controls on bacterial production in tropical lowland rivers. *Limnol. Oceanogr.*, 48 (4): 1466 – 1475.
- CESAR, DE. 2002. Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação no estuário da Lagoa dos Patos / RS. Rio Grande – RS. FURG 151p (Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica).
- COLE, JJ. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13: 291 – 314.
- CONTY, A, F GARCIA & E BÉCARES. 2007. Changes in bacterial and ciliate densities with trophic status in Mediterranean shallow lakes. *Hydrobiol.*, 584: 327 – 335.
- CORNO, G & K JÜRGENS. 2005. Direct and Indirect Effects of Protist Predation on Population Size Structure of a Bacterial Strain with High Phenotypic Plasticity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 78 – 86.
- COTNER, JC & BA BIDDANDA. 2002. *Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems*. *Ecosystems*, 5: 105 – 121.
- COTTRELL, MT & DI Kirchman. 2000. *Natural assemblages of marine Proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-*

- molecular-weight dissolved organic matter. Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (4): 1692 – 1697.
- CURRIE, DC. 1990. Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 35 (7): 1437 – 1455.
- DEL'DUCA, A & D Cesar. 2007. Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) como Opção de Ferramenta em Ecologia Microbiana Aquática. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*, 36 (1): 6 – 9.
- ESTEVES, FA. 1998. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro. Interciência. 602p.
- FARJALLA, VF, A ENRICH-PRAST, FA ESTEVES & ACP CIMBLERIS. 2006. Bacterial growth and DOC consumption in a tropical coastal lagoon. *Braz. J. Biol.*, 66 (2): 383 – 392.
- FARJALLA, VF, BM FARIA, FA ESTEVES & RL BOZELLI. 2001. Bacterial density and biomass, and relations with abiotic factors, in 14 coastal lagoons of Rio de Janeiro State. *Oecologia Brasiliensis*, 9: 65 – 76.
- FELIP, M, ML PACE & JJ COLE. 1996. Regulation of planktonic bacterial growth rates: The effects of temperature and resources. *Microb. Ecol.*, 31: 15 – 28.
- GARNIER J & D BENEST. 1990. Seasonal coupling between phyto - and bacterioplankton in a sand pit lake (Creil lake, France). *Hydrobiol.*, 207: 71 – 77.
- GAUCH JR, HG. 1982. Multivariate analysis in community ecology. Cambridge University Press, Cambridge. 298p.
- GIROLDO, D, AAH VIEIRA & BS PAULSEN. 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 39: 1109 – 1115.
- GIROLDO, D, PIC ORTOLAND & AAH VIEIRA. 2007. Bacteria – algae association in bath cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater Biol.*, 52: 1281 – 1289.
- GLÖCKNER, FO, RJ AMANN, A ALFREIDER, J PERTHALER, R PSENNER, K TREBESIUS & KL SCHLEIFER. 1999. An In Situ Hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *System. Appl. Microbiol.*, 19: 403 – 406.
- GROVER, JP & TH CHRZANOWSKI. 2000. Seasonal patterns of substrate utilization

- by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes. *Aquat. Microb. Ecol.*, 23: 41 – 54.
- GURUNG, TB, J URABE, K NOZAKI, C YOSHIMIZU & M NAKANISH. 2002. Bacterioplankton production in a water column of Lake Biwa. *Lakes Reservoirs: Res. Manage.*, 7: 317 – 323.
- HAHN, MW & MG HÖFLE. 1999. Flagellate Predation on a Bacterial Model Community: Interplay of Size-Selective Grazing, Specific Bacterial Cell Size, and Bacterial Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4863 – 4872.
- HILLEBRAND, H, CD DURSELEN, D KIRSCHTEL, U POLLINGHER & T ZOHARY. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35 (2): 403 – 424.
- HOBBIE, JE, RJ DALEY & S JASPERS. 1987. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 225 – 228.
- JENSEN, LM. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 11: 39 – 48.
- JEZBERA, J, K HORNAK & K SIMEK. 2006. Prey selectivity of bacteriovorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environ. Microbiol.*, 8 (8): 1330 – 1339.
- JUGNIA, AB, TS NGANDO & D GILBERT. 2006. Dynamics and estimates of growth and loss rates of bacterioplankton in a temperate freshwater system. *Microbial. Ecol.*, 58: 23 – 32.
- JÜRGENS G, F GLOCKNER, R AMANN, A SAANO, L MONTONEN, M LIKOLAMMI & U MUNSTER. 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *Microb. Ecol* , 34: 45 – 56.
- JÜRGENS K. 1994. Impact of *Daphnia* on plankton microbial food webs - a review. *Mar. Microb. Food Webs*, 8 (1): 295 – 324.
- JÜRGENS K & H GÜDE. 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 112: 169 – 188.
- JÜRGENS K, J PERNTHALER, S SCHALLA & R AMANN. 1999. Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (3): 1241 – 1250.

- KENT AD, AC YANNARELL, JA RUSAK, E W TRIPLETT & KD MCMAAHON. 2007. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME Journal*. 1: 38 – 47.
- KIRCHMAN D. & MITCHELL R. 1982. Contribution of Particle-Bound Bacteria to Total Microheterotrophic Activity in Five Ponds and Two Marshes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 (1): 2000 – 2009.
- KIRCHMAN DL. 1983. The production of bacteria attached to particles suspended in a freshwater pond. *Limnol. Oceanogr.*, 28 (5): 858 – 872.
- KIRCHMAN DL. 2002. The ecology of Cytophaga - Flavobacteria in aquatic environments. *Microb. Ecol.*, 39: 91 – 100.
- KISAND, V & P ZINGEL. 2000. Dominance of ciliate grazing on bacteria during spring in a shallow eutrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 22: 135 – 142.
- KUUPPO-LEINIKKI, P. 1990. Protozoan grazing on planktonic bacteria and its impact on bacterial population. *Mar. Ecol. Progr., Ser.*, 63: 227 – 238.
- LAMPERT W & U SOMMER. 2007. Limnoecology. New York. Oxford University Press Inc. 324p.
- LANDRY, MR & RP HASSETT. 1982. Estimating the grazing impact of marine microzooplankton. *Mar. Biol.*, 67: 283 – 288.
- MALONE, TC & HW DUCKLOW. 1990. Microbial biomass in the coastal plume of Chesapeake Bay: Phytoplankton - bacterioplankton relationships. *Limnol. Oceanogr.*, 3 (2): 296 – 312.
- MALUF, JRT. 2000. Nova classificação climática do estado do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 8 (1): 141 – 150.
- MASSANA, R, JM GASOL, PK BJORNSEN, N BLACKBURN, A HAGSTROM, S HIETNEN, BH HYGUM, J KUPARINEN & C PEDRÓS-ALIÓ. 1997. Measurement of bacterial size via image analyses of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci. Mar.*, 61 (3): 397 – 407.
- MINGOTI, AS. 2005. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada. Editora UFMG – Belo Horizonte (MG). 230p.
- NORLAND, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. In: KEMP, PF, BF SHERR, EB SHERR & JJ COLE (Eds). Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers: 303 – 307.

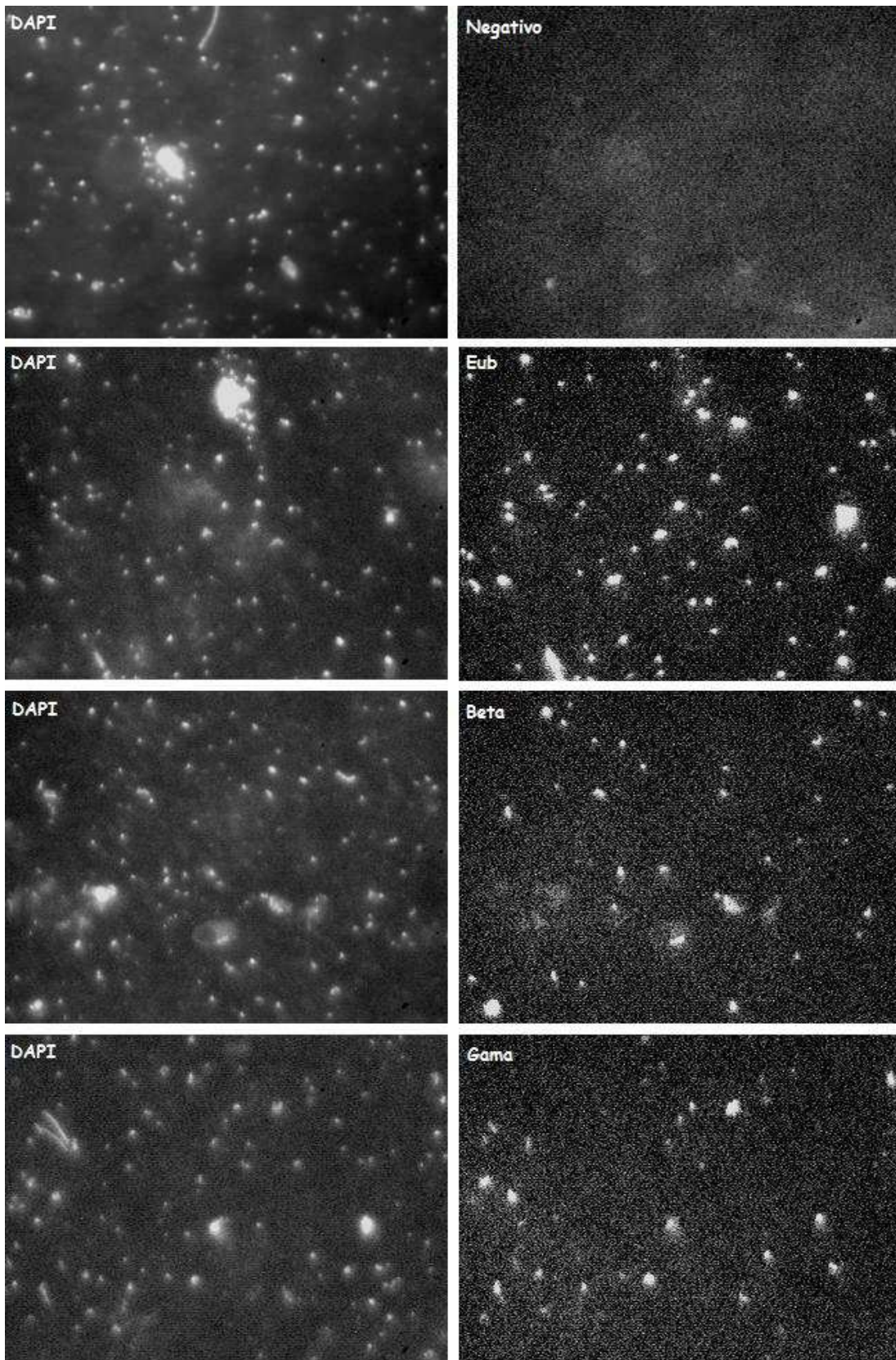
- PACE, ML & E FUNKE. 1991. Regulation of Planktonic Microbial Communities by Nutrients and Herbivores. *Ecol.*, 72 (3): 904 – 914.
- PERNTHALER, J, F GLÖCKNER, S UNTERHOLZNER, A ALFREIDER, R PSENNER & R AMAMM. 1998. Seasonal Community and Population Dynamics of Pelagic Bacteria and Archaea in a High Mountain Lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (11): 4299 – 4306.
- PORTER, KG and YS FEIG. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943 – 948.
- POSCH, T, B MINDL, K HORNÁK, J JEZBERA, MM SALCHER, B SATTLER, B SONNTAG, J VRBA, K SIMEK. 2007. Biomass reallocation within freshwater bacterioplankton induced by manipulating phosphorus availability and grazing. *Aquat. Microb. Ecol.*, 49: 223 – 232.
- ROONEY-VARGA, JN, MW GIEWAT, MC SAVIN, S SOOD, M LeGRESLEY & JL MARTIN. 2005. Links between Phytoplankton and Bacterial Community Dynamics in a Coastal Marine Environment. *Microb. Ecol.*, 49 (1): 163 – 175.
- SANDERS, RW, DA CARON & U-G BERNINGER. 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 86: 1 – 14.
- SEELINGER, U & C ODEBRECHT. 1998. Introdução e Aspectos Gerais. In: SEELINGER, U, C ODEBRECHT & JP CASTELLO (eds). Os Ecossistemas Costeiros e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Editora Ecoscientia, Brasil. 326p.
- SHERR BF, EB SHERR & J McDANIEL. 1992. Effect of Protistan Grazing on the Frequency of Dividing Cells in Bacterioplankton Assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (8): 2381 – 2385.
- SIMON, M, H-P GROSSART, B SCHWEITZER, H PLOUG. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 175 – 211.
- SOUZA, NC. 2007. Abundância do bacterioplâncton e suas relações com fatores físico - químicos e biológicos em nove lagos rasos do Campus Carreiros - FURG, Rio Grande – RS. FURG 35p. (Monografia de graduação em Ciências Biológicas).
- STENUITE, S, S PIRLOT, A TARBE, H SARMENTO, M LECOMTE, S THILL, B LEPORCQ, D SINYINZA, J DESCY & P SERVAIS. 2009. Abundance and

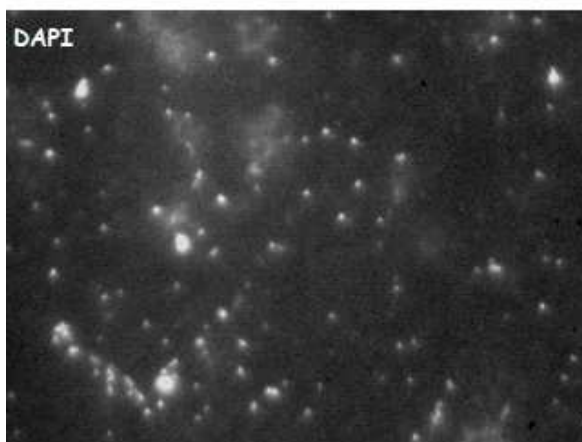
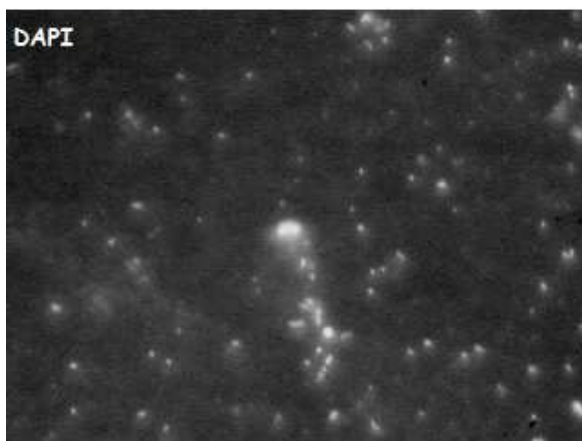
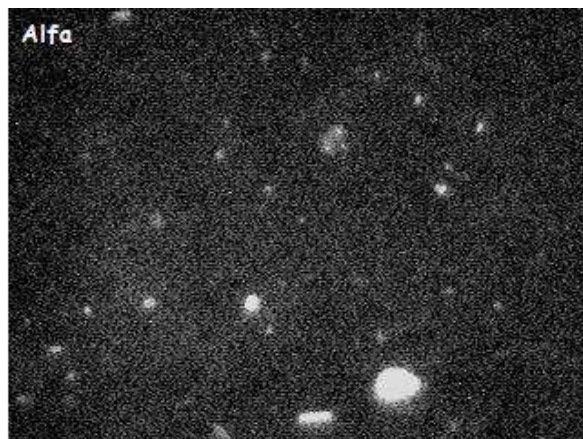
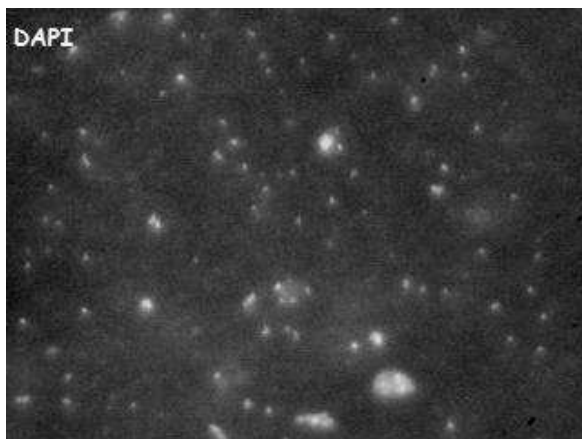
- production of bacteria, and relationship to phytoplankton production, in a large tropical lake (Lake Tanganyika). *Freshwater Biol.*, 54: 1300 – 1311.
- STOCKNER, JG & KG PORTER. 1988. Microbial Food Web in Freshwater Planktonic Ecosystems. In: CARPENTER, SR (ed). Complex interactions in Lake Communities. New York. Springer-Verlag. 283p.
- STRICKLAND, JDH & TR PARSONS. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Ottawa, Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167, 310 p.
- TANG X, G GAO, B QIN, L ZHU, J CHAO, J WANG & G YANG. 2009. Characterization of Bacterial Communities Associated with Organic Aggregates in a Large, Shallow, Eutrophic Freshwater Lake (Lake Taihu, China). *Microb Ecol.*, 58: 307 – 322.
- TIJDENS, M, DBV WAAL, H SLOVACKOVA, HL HOOGVELD & HJ GONS. 2008. Estimates of bacterial and phytoplankton mortality caused by viral lysis and microzooplankton grazing in a shallow eutrophic lake. *Freshwater Biol.*, 53: 1126 - 1141.
- TRINDADE, CRT, FURLANETTO, LM & PALMA-SILVA. 2009. Nycthemeral cycles and seasonal variation of limnological factors of a subtropical shallow lake (Rio Grande, RS, Brazil). *Acta Limnol. Bras.*, 21 (1): 35 – 44.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides, 12, 337 p.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen phytoplankton – Methodik. Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, 9: 1 – 38.
- VAQUÉ, D, JI CALDERÓN-PAZ, N GUIXA-BOIXEREU, C PEDRÓS-ALIO. 2002. Spatial distribution of microbial biomass and activity (bacterivory and bacterial production) in the northern Weddell Sea during the austral summer (January 1994). *Aquat. Microb. Ecol.*, 29: 107 – 121.
- VIDAL, L, RF MEDONÇA, MM MARINHO, C DIONÉIA & F ROLAND. 2005. Caminhos do carbono em ecossistemas aquáticos continentais. In: ROLAND, F, D CESAR & M MARINHO (Eds). Lições de limnologia. Editora Rima, Brasil. 517.
- VILLENA, EP, EO RETUERTA, RM BAQUERO & I RECHE. 2003. El papel de la escala en los padrones de variación del bacterioplancton en lagunas de alta montaña. *Limnetica*. 22 (1-2): 183 – 193.

- WELSCHMEYER, N.A. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and phaeopigments. *Limnol. Oceanogr.*, 39 (8): 1985 – 1992.
- YOKOKAWA, T & T NAGATA. 2005. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (11): 6799 – 6807.
- ZAR JH. 1999. Biostatistical Analysis 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 664 p.
- ZENG, JL, YANG, H DU, L XIAO, L JIANG, J WU & X WANG. 2009. Bacterioplankton community structure in a eutrophic lake in relation to water chemistry. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 763 – 772.
- ZHANG, R, MG WEINBAUER & P QIAN. 2007. Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters. *Environ. Microbiol.*, 9(12): 3008 – 3018.
- ZINGEL, P, H AGASILD, T NÕGES & V KISAND. 2007. Ciliates are the dominant grazers on pico – and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. *Microb. Ecol.*, 53: 134 – 142.
- ZWISTER W, N SELJE & M SIMON. 2003. Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 31: 211 – 225.

ANEXO 1

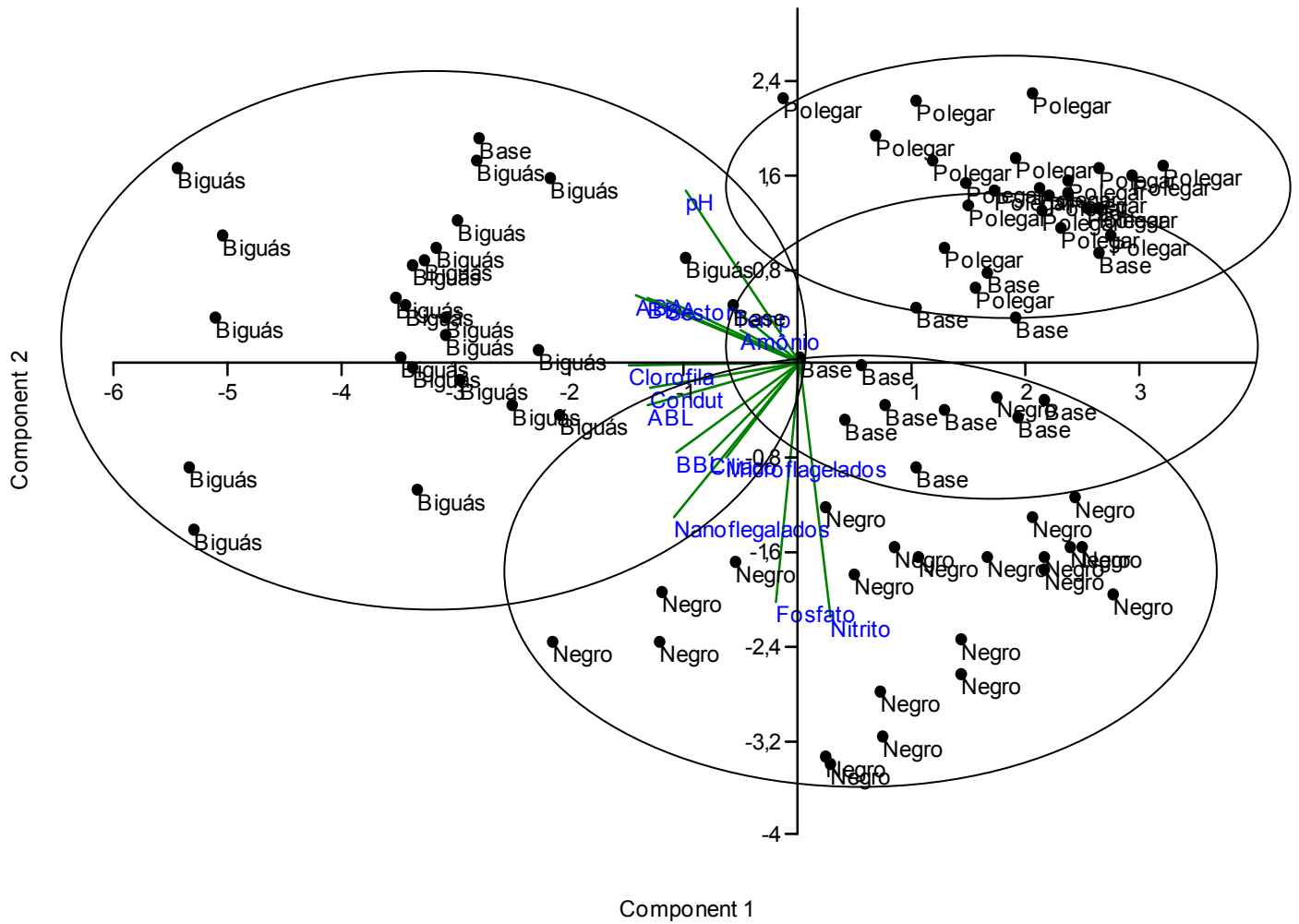
Fotos das análises de FISH. Na esquerda fotos das bactérias totais (DAPI) e na direita fotos referentes aos diferentes grupos filogenéticos (“probe” específico).





ANEXO 2

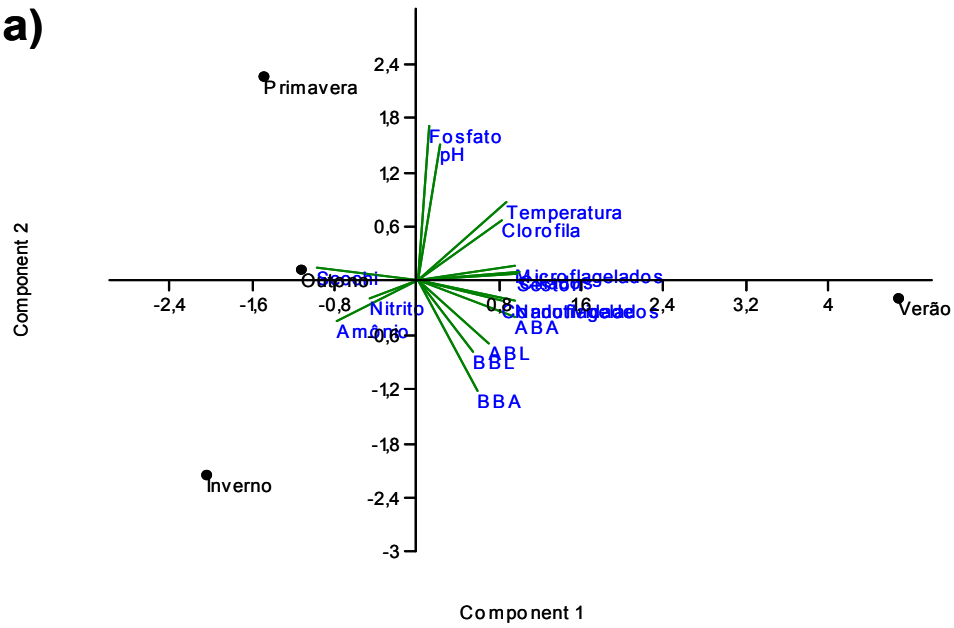
Ampliação da Figura 11.



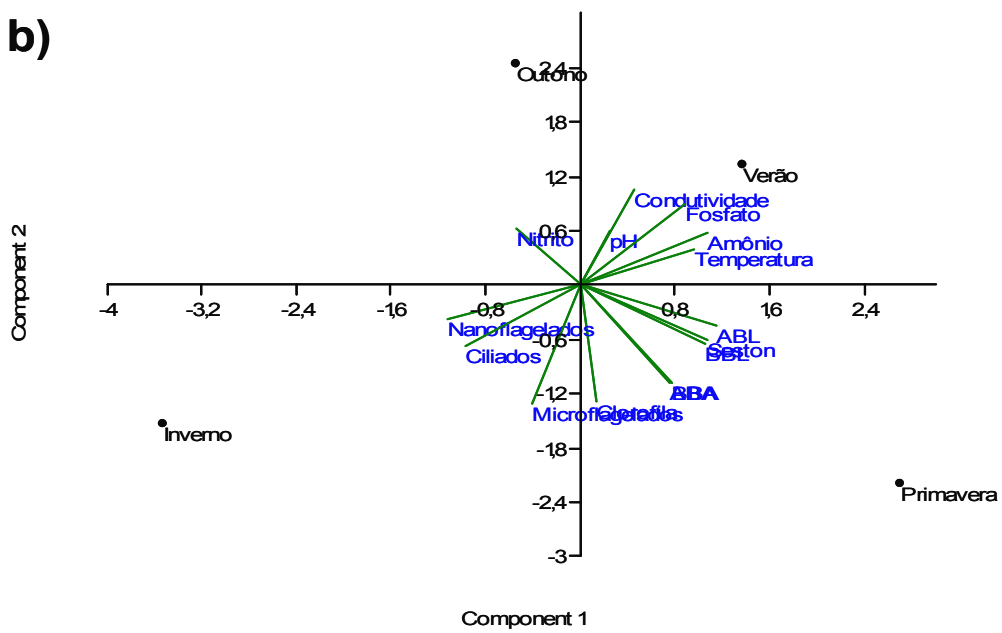
ANEXO 3

Ampliação da Figura 12.

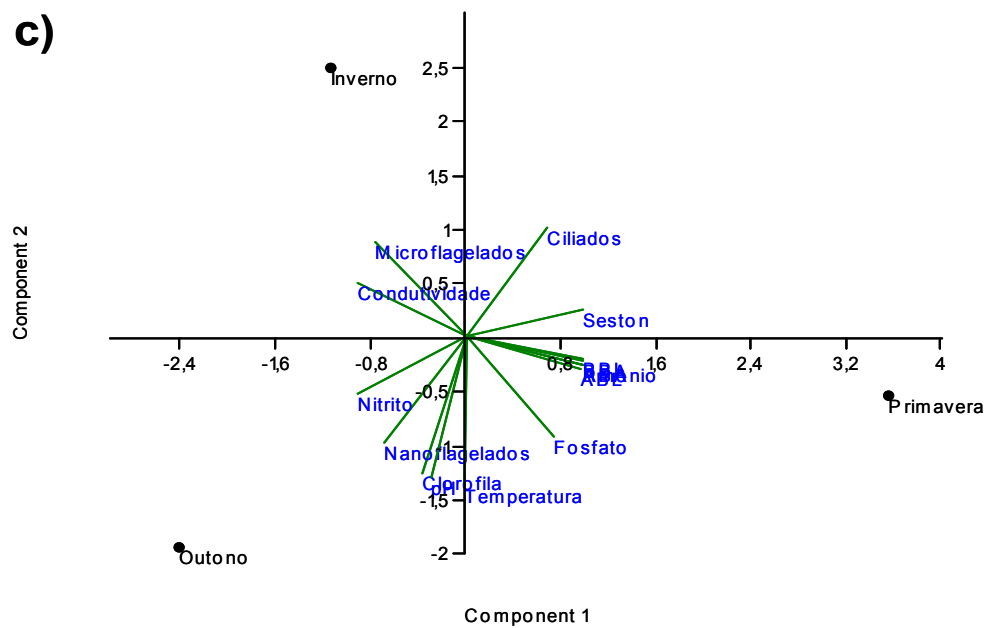
a)



b)



c)



d)

