

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**Diversidade e metabolismo do  
bacterioplâncton em lagos rasos  
subtropicais**

Ng Haig They

PORTO ALEGRE

JUNHO, 2008

# **Diversidade e metabolismo do bacterioplâncton em lagos rasos subtropicais**

Ng Haig They

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. David da Motta  
Marques

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Dionéia E. Cesar

Profa. Dra. Gertrudes Corção

Prof. Dr. Albano Schwarzbald

PORTO ALEGRE

JUNHO, 2008

# DIVERSIDADE E METABOLISMO DO BACTERIOPLÂNCTON EM LAGOS RASOS SUBTROPICAIS

Dissertação apresentada em 25 de junho de 2008

---

Orientador: Prof. Dr. David da Motta Marques  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

---

Titular: Profa. Dra. Dionéia Evangelista Cesar  
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

---

Titular: Profa. Dra. Gertrudes Corção  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

---

Titular: Prof. Dr. Albano Schwarzbald  
(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

*Dedico aos procariotos que, tão ínfimos, mantém o equilíbrio da Terra.*

## Agradecimentos

Este é o momento de agradecer a todas as pessoas que me ensinaram que na verdade somos como uma colcha de retalhos, formados de inúmeras idéias e sentimentos, próprios e compartilhados, o que nos torna mais do que simplesmente um grão de poeira perdido no cosmos.

Agradeço à força superiora que orquestra o Universo.

Agradeço imensamente a meus pais por todo o carinho, suporte e por não terem me deixado sentir sozinho por um segundo sequer mesmo estando a mais de 3000km de casa! Obrigado por toda a compreensão e por apoiarem todas as minhas loucuras! Por terem esperado pacientemente eu entender que são meus melhores amigos!

À minha querida avó Hedvirges Schneider, que mesmo não estando mais em nosso plano, sempre se faz sentir tão presente.

À minha super tia Iara Schneider por quem sinto minha dívida de gratidão eterna! Por todo o amor e carinho e principalmente todos os pequenos gestos, que mesmo tão singelos não passaram despercebidos. Pelas inúmeras risadas com as histórias do HC e do dia a dia, e principalmente por me agüentar estes dois anos sapateando no andar de cima! Por ser um dos meus exemplos de vida!

À minha prima querida Jéssica Schneider, com quem dividi os melhores momentos da minha infância e que é minha mana! Obrigado por me acordar todos os domingos de madrugada com sua nona sinfonia ao piano (ainda não acredito que agradei por isto! quantas horas de sono perdidas...). Claro que é brincadeira, valeu Jeca!

À minha super querida tia Rosita Schneider pelo igual amor e carinho nestes dois anos. Por todo o apoio, pelo chamas sempre animado pelas conversas! Por todo o cuidado e preocupação, os almoços sempre maravilhosos! Por sempre fazer questão da minha visita, embora eu quase nunca tivesse tempo! E pelo seu ótimo humor e simpatia! Eterno obrigado!

Ao meu tio Edson Vasconcelos que tantas vezes largou o que estava fazendo para me ajudar, principalmente quando estava me instalando em Poa. Pelo seu ótimo humor, pelas gargalhadas e pela generosidade em me aceitar como sobrinho de coração.

À minha querida priminha Brenda Schneider, por ser tão fofa e por assistir comigo seus desenhos!

Aos meus familiares não menos amados, meu irmão Haig Wing, meus primos César, Braian, Carol, Cecília, Douglas e meu tio Jonas e minha tia Ariane por simplesmente serem a melhor família que eu poderia ter. Pelo bom humor de todos, as bobagens, as molecagens, enfim, por me fazerem sentir acolhido e protegido. Obrigado a todos!

Ao meu irmão Tiago Rafael, que reencontrei nesta vida e espero continuar reencontrando em outras. Por toda a admiração que sinto pela sua inteligência e sabedoria sagitarianas, pelo seu

insuperável humor (suba, chuchu!), mas principalmente por sempre abrir um pouquinho mais o burquinho da fechadura para que eu pudesse ver o mundo de uma forma diferente.

Ao Flávio Rodrigues (binho), por estar ao meu lado, faça chuva ou faça sol, em todos os momentos. Por ser meu exemplo de postura científica, em dedicação e honestidade. Por tornar o dia a dia tão melhor! Por ter me acompanhado nesta loucura de atravessar o país pra passar frio no Sul! Conseguimos!

Ao meu orientador David da Motta Marques, que me acolheu mesmo sendo um desconhecido vindo de longe e ofereceu todas as possibilidades de realização de um trabalho de mestrado, sempre com generosidade e estímulo para que o trabalho fosse sempre melhorado. Pelo suporte, pelas discussões enriquecedoras e por acreditar em mim.

Aos queridos amigos do IPH que vou guardar para sempre no coração. Eliete Canterle, pelo seu exemplo de dedicação, esforço, competência e principalmente pelo carinho e preocupação sempre! À Lúcia Rodrigues pela sua imensa generosidade e bom-humor! Pelos exemplos de competência e honestidade e por cuidar tão bem da gente tantas vezes no campo, né Lúcia? Eita mulher que sabe manobrar reboque!!! Ah claro, pelas inúmeras caronas, sempre tão gentis! À Christiane dos Santos, que é um exemplo de postura profissional excepcional. Por seu humor e energia contagiante e principalmente pela presteza e generosidade inesgotáveis e por ser um exemplo de mulher batalhadora e valente!! Aos amigos Ivanir Ávila e Jorge, que tantos galhos já quebraram, sempre com muita boa vontade! Ao amigo Tiago Finkler por tantos dias de campo compartilhados, pelo bom-humor e principalmente pela generosidade em compartilhar seus pontos de amostragem. Aos amigos mais recentes, mas não menos queridos que estão ou passaram pelo IPH: Carlos Ruberto Fragoso Jr., Maria Angélica Cardoso, Luciane Crossetti, Daniela Bes, Danieli Ledur Kirst, Juliana Zanoteli, Sílvia, Juliana Borba, Ilka Sant'Anna, Viviane Juliano (que generosamente me hospedou em sua casa em Rio Grande no Encontro de Limnologia mar/2008), Simone Oliveira, Viviane Trevisan (precisava agradecer pelas piadas, são ótimas!), Betina Marques e demais colegas por tornarem a convivência tão melhor!

Aos colegas de mestrado André Barbosa, Cláudia Brandt, Vera Troian, Letícia Graf e demais pela ótima convivência e pelas discussões regadas a cafezinho e doce. Por terem sobrevivido junto comigo à estatística!!!

Aos meus queridos amigos da FEPAM (Mariana Coronas, Tatiana Pereira, Laiana Beltrami, Andréia Lemos, Demétrio, Jocelita Aparecida), que me acolheram como membro honorário do Laboratório de Mutagênese Ambiental (olha que eu quase sei fazer um teste de Ames já!). Pelas inúmeras risadas e bons momentos, pelas palavras novas jogando Academia.

Aos amigos novos feitos aqui nestes dois anos: Mara, Fernanda, Lara, Paulo, Bruna, William, Romilda, Carmine, Verônica, Odete, Ingrid e demais do 25 de Julho, por tornarem tantas vezes a vida mais doce.

#### Apoios ao projeto

Ao CNPQ, órgão financiador do projeto PELD (Sistema Hidrológico do Taim, Sítio 7) e também fomentador da bolsa de mestrado que apoiou o presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRGS, pela acolhida e suporte à realização deste trabalho de mestrado.

Ao Instituto de Pesquisas Hidráulicas – UFRGS, onde este projeto foi realizado.

À Eliete Canterle, que muito generosamente compartilhou seus conhecimentos adquiridos na UFJF e me ensinou tudo o que sei de métodos microbianos. Por ter me aceitado como companheiro nesta hercúlea batalha que foi implementar cada um dos métodos!

À Simone Oliveira, pela imensa ajuda na implementação do FISH e na ajuda de outras dúvidas, sempre com muita boa vontade e bom-humor.

À Christiane dos Santos, que me ensinou como me virar no laboratório sem quebrar todos os beakers! Pelo auxílio nas análises químicas e pelo carinho de sempre arrumar para qualquer um de nós aquela pequenas coisas que esquecemos ou não tivemos tempo de fazer no laboratório.

À Mara Domingues, a quem tantas vezes fui bater à porta para incomodar. E mesmo assim sempre disposta a ajudar da melhor maneira possível! Muito obrigado pela presteza!

Ao Roberto Hallam, nosso contador, que resolve tantos pepinos pra gente! Muito obrigado pela boa vontade e por sempre estar disponível.

À profa. Dra. Laura Utz, que de forma extremamente solícita auxiliou nos métodos de coleta, preservação e enumeração de protozoários, sempre imensa boa vontade.

À Dra. Luciane Crossetti, pelas análises do fitoplâncton e pelos inúmeros e-mails respondidos sobre as bibliografias, sempre com muita boa vontade.

Ao Prof. Dr. Luiz Kucharski, pelo generoso empréstimo do cintilador, auxílio nos métodos radioativos e tantas outras gentilezas.

Aos professores do Centro de Ecologia da UFRGS, pela dedicação e pelos conhecimentos repassados. Por terem me permitido enxergar uma frestinha deste complexo mundo da Ecologia.

Ao prof. Adriano Melo, pela dedicação, por sempre estar disposto a ajudar os alunos e pelos aconselhamentos estatísticos e empréstimo de bibliografia.

Ao Tonho, da Agronomia, por ter quebrado alguns galhos meus com as análises de carbono “pra ontem”.

Ao pessoal da fazenda Porteira de Ferro, Aldo, Judice e família, lagoa Mangueira Sul, que me acolheram e me permitiram realizar meu trabalho de campo. Pela generosidade espontânea e calor humano!

A todos os funcionários do IPH e da UFRGS que trabalham para que tenhamos um dia a dia melhor.

*Eterna gratidão a todos.*



## RESUMO

A planície costeira do Rio Grande do Sul apresenta vários lagos subtropicais rasos com origem semelhante e uma grande amplitude de tamanho, distância e conectividade entre lagos, e desta maneira é aqui considerada como apropriada ao endereçamento de questões tais como diversidade e metabolismo do bacterioplâncton, um tópico atual de pesquisa. Em uma primeira abordagem, nós acessamos a diversidade bacteriana usando a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) em um sub-conjunto destes lagos e inesperados padrões biogeográficos foram encontrados, a despeito da baixa resolução taxonômica empregada por esta técnica. Uma vez que os resultados do FISH têm sido relacionados também ao estado fisiológico das células, além de diversidade, nós procuramos por uma explicação alternativa para situações metabólicas bacterianas associadas aos fatores testados. Os resultados mostraram que as macrófitas exercem um efeito negativo sobre o fitoplâncton através de mecanismos antagonistas e que este último, por sua vez, afeta as bactérias, além de um possível efeito direto sobre o fitoplâncton e o bacterioplâncton pela liberação de compostos alelopáticos e substâncias húmicas. A competição entre o fitoplâncton e as bactérias sob condições de alta densidade algal pode igualmente criar condições inadequadas para o metabolismo bacteriano. Estes resultados indicam que fatores locais podem ter um efeito importante sobre a distribuição de estados metabólicos do bacterioplâncton. Em uma segunda abordagem, nós examinamos em detalhe a transição a partir da zona litoral dominada por macrófitas até a zona pelágica dominada pelo fitoplâncton, acompanhando as respostas contínuas do bacterioplâncton à mudança de dominância de produtor primário, uma vez que os resultados da primeira abordagem demonstraram que importantes respostas das bactérias estão associadas a estes dois habitats putativos. Os resultados também indicaram um padrão de inibição na presença de macrófitas aquáticas, potencializado pelas altas cargas de substâncias húmicas dos massivos banhados circundantes. O bacterioplâncton aumentou em densidade, biovolume e biomassa em direção às zonas pelágicas, mas a Eficiência de Crescimento Bacteriana indicou que as bactérias possivelmente tenham melhor performance metabólica em locais de dominância bem definida. Mudanças na estrutura da comunidade incluindo zooplâncton, fitoplâncton e bacterioplâncton foram encontradas, confirmando constatações prévias sobre o papel estruturador das macrófitas em lagos rasos, com a comprovação adicional de que este papel aplica-se também às bactérias.

Palavras-chave: lagos costeiros sub-tropicais; metabolismo do bacterioplâncton; diversidade do bacterioplâncton; macrófitas; fitoplâncton; dominância.

## ABSTRACT

The coastal plain of Rio Grande do Sul state presents several subtropical shallow lakes with similar origin and a wide range of size, distance and connectivity between lakes, and therefore is considered as suitable to address questions such as bacterial diversity and metabolism, a current research subject. In a first approach we assessed bacterial diversity using the technique of Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) in a sub-set of these lakes and unexpected biogeographic patterns arised, despite the low resolution employed by this technique. Since FISH results might be linked also to physiological status of cells, rather than diversity itself, we looked for an alternative explanation for bacterial metabolic situations associated with the drivers tested. Our results showed that macrophytes exert a negative effect on phytoplankton through antagonistic mechanisms and the latter, at its turn, affects bacteria, besides a possible direct effect on phyto- and bacterioplankton by release of allelopathic compounds and humic substances. Competition between phytoplankton and bacteria in high algal density areas can create also inadequate conditions for bacterial metabolism. These results indicate that local factors can have an important effect on bacterioplankton metabolic status distribution. In a second approach we examined in detail the transition between a macrophyte dominated littoral zone to a phytoplankton dominated pelagic zone, following the continuous responses of bacterioplankton to the shift of primary producer dominance, since our previous results from the first approach showed that important responses of bacteria are associated to this two putative habitats. Overall data showed also a pattern of inhibition in the presence of aquatic macrophytes, potentialized by high loads of humic substances from surrounding massive wetlands. Bacterioplankton increased in density, biovolume and biomass towards pelagic zones, but Bacterial Growth Efficiency indicated that bacteria might perform better in well defined dominance sites. Changes in community structure of zooplankton, phytoplankton and bacterioplanton was found, confirming previous statements about the structuring role of macrophytes in shallow lakes, with the additional comprovation that this role applies also for bacteria.

Key-words: subtropical coastal shallow lakes; bacterioplankton metabolism; bacterioplankton diversity; macrophytes; phytoplankton; dominance.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág.

## INTRODUÇÃO

Fig. 01: *Microbial loop* no contexto da teia trófica clássica 10

## MATERIAL E MÉTODOS GERAL

Fig. 02: Teste piloto de pré-filtros para amostras bacterianas 26

Fig. 03: Teste piloto para avaliação de número mínimo de imagens a serem analisadas para estimativa de biovolume bacteriano 28

## CAPÍTULO 1

Fig 1 Área de estudo – planície costeira do Rio Grande do Sul com os 10 lagos amostrados 41

Fig. 2 Distribuição filotípica dos grupos bacterianos no conjunto de lagos analisado 48

Fig.3 Distribuição morfotípica dos grupos bacterianos no conjunto de lagos analisado 49

Fig. 4 Similaridade da assembléia bacteriana *versus* similaridade ambiental, distância geográfica e similaridade de tamanho de lagos no conjunto de lagos amostrado 50

Fig. 5 Similaridade da assembléia bacteriana *versus* similaridade ambiental, distância geográfica e similaridade de tamanho de lagos no conjunto de lagos amostrado, em zona de margem e pelágica 51

Fig. 6 Similaridade da assembléia bacteriana *versus* similaridade da razão B:P nos lagos analisados 52

Fig. 7 Similaridade de morfotipos bacterianos *versus* similaridade ambiental, distância geográfica e similaridade de tamanho de lagos no conjunto de lagos amostrado 53

Fig. 8 Similaridade de morfotipos bacterianos *versus* similaridade ambiental, distância geográfica e similaridade de tamanho de lagos no conjunto de lagos amostrado, em zona de margem e pelágica 54

Fig. 9 Similaridade morfotípica bacteriana *versus* alcalinidade, cor, substâncias húmicas, DOC/TOC, DOC/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e DOC/PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> 55

Fig. 10 Tipo de cobertura macrofítica como variável preditora para a biomassa do fitoplâncton 56

Fig. 11 Tipo de cobertura macrofítica e biomassa algal como variáveis preditoras para o %EUB detectado 57

Fig. 12 medidas de pH no lago Mangueira em zona de margem e pelágica 63

## CAPÍTULO 2

Fig. 1 Área de estudo – lago Mangueira sul 75

Fig. 2 Transecto de amostragem de zona litoral coberta por macrófitas para zona pelágica dominada pelo fitoplâncton 76

Fig. 3 Cobertura macrofítica, produção primária, biomassa do fitoplâncton e clorofila a ao longo do transecto 83

Fig. 4 Principais variáveis limnológicas ao longo do transecto 85

Fig. 5 Abundância dos principais grupos planctônicos ao longo do transecto 86

Fig. 6 Variáveis relacionadas ao metabolismo bacteriano ao longo do transecto 87

Fig. 7 Estrutura dos principais grupos planctônicos ao longo do transecto 88

Fig. 8 Gráficos de PCA para estações amostrais do transecto 90

Fig. 9 Valores de similaridade da assembléia bacteriana em zona litoral e pelágica de nove lagos da planície costeira do Rio Grande do Sul, comparados às estações amostrais do transecto 96

## LISTA DE TABELAS

Pág.

### **CAPÍTULO 1**

Tab. 1 Principais variáveis limnológicas para o conjunto de lagos amostrados 47

Tab. 2 Produção bacteriana, assumida como medida de status fisiológico, como variável preditora e resposta em relação a similaridade de tamanho de lagoas, distância geográfica, similaridade da assembléia bacteriana e similaridade de morfotipos 58

### **CAPÍTULO 2**

Tab. 1 Valores de nutrientes, carbono e razões carbono:nutrientes ao longo do transecto amostrado 84

Tab. 2 Cobertura de macrófitas e biomassa do fitoplâncton como variáveis preditoras para variáveis limnológicas, zooplâncton e bacterioplâncton para as estações do transecto amostradas 89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEE - Carbono Extracelular Excretado  
CI – Carbono Inorgânico  
CO – Carbono Orgânico  
CT – Carbono Total  
Da - Dalton  
DIC – *Dissolved Inorganic Carbon* (Carbono Inorgânico Dissolvido)  
DOC – *Dissolved Organic Carbon* (Carbono Orgânico Dissolvido)  
DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucléico)  
RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido Ribonucléico)  
rRNA – Ribosomal Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico Ribossomal)  
ECB - Eficiência de Crescimento Bacteriano  
 $\lambda$  - comprimento de onda  
 $\mu\text{L}$  – microlitro ( $10^{-6}$  L)  
 $\mu\text{m}$  – micrômetros ( $10^{-6}$  m)  
MO – Matéria Orgânica  
MOD - Matéria Orgânica Dissolvida  
nm – nanômetros ( $10^{-9}$  m)  
OD – oxigênio dissolvido  
PB – produção bacteriana  
RB – respiração bacteriana  
rpm – rotações por minuto  
SSU – *Small Sub-Unit* (Sub-unidade Menor)  
TOC- *Total Organic Carbon* (Carbono Orgânico Total)  
UTO – Unidade Taxonômica Operacional  
UV – radiação ultra-violeta

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	li
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	v
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	8
1.1 Diversidade microbiana	8
1.2 Bacterioplâncton – definição	9
1.3 Idéias centrais da ecologia aquática microbiana	10
1.3.1 Matéria orgânica nos ambientes aquáticos	11
1.3.2 Gradientes tróficos	12
1.3.3 Controle de números bacterianos	13
1.4 Importância do bacterioplâncton nos biogeociclos	14
1.5 Ecologia aquática microbiana no Brasil e em lagos subtropicais no Rio Grande do Sul	15
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b>	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL</b>	19
3.1 Variáveis limnológicas	19
3.1.1 Nutrientes	19
3.1.1.1 Formas nitrogenadas	19
3.1.1.1.1 Nitrogênio total	19
3.1.1.1.2 Nitrato	19
3.1.1.1.3 Nitrito	19
3.1.1.1.4 Amônia	19
3.1.1.2 Formas fosfatadas	19
3.1.1.2.1 Fósforo total	19
3.1.1.2.2 Fósforo hidrolisável	19
3.1.1.2.3 Fósforo reativo	20
3.1.2 Sílica	20
3.1.3 pH e alcalinidade	20
3.1.4 Sólidos	20
3.1.4.1 Sólidos totais	20
3.1.4.1.1 Sólidos totais fixos	20
3.1.4.1.2 Sólidos totais voláteis	20
3.1.4.2 Sólidos totais suspensos	20
3.1.4.2.1 Sólidos suspensos fixos	21
3.1.4.2.2 Sólidos suspensos voláteis	21

3.1.5 Substâncias húmicas, cor e turbidez	21
3.1.6 Série de carbono	21
3.2 Variáveis biológicas	22
3.2.1 Fitoplâncton	22
3.2.1.1 Clorofilas	22
3.2.1.2 Produção primária	22
3.2.1.3 Densidade, biovolume, biomassa e principais grupos do fitoplâncton	23
3.2.2 Densidade do zooplâncton	24
3.2.3 Densidade de ciliados	25
3.2.4 Variáveis bacterianas	25
3.2.4.1 Procedimento de campo	25
3.2.4.2 Densidade, biovolume, biomassa e morfotipos	26
3.2.4.2.1 Captura de imagens	27
3.2.4.2.2 Processamento de imagens	27
3.2.4.2.3 Densidade	28
3.2.4.2.4 Biovolume	29
3.2.4.2.5 Biomassa	30
3.2.4.2.6 Morfotipagem	30
3.2.4.3 Produção bacteriana	30
3.2.4.4 Respiração bacteriana	31
3.2.4.5 Eficiência de crescimento bacteriano	32
3.2.4.6 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	32
3.2 Normatização do texto	34
<b>4. CAPÍTULO 1</b>	<b>35</b>
4.1 Apresentação	35
Bacterioplankton diversity and functionality driven by geographic and local factors in coastal subtropical shallow lakes	36
<b>5. CAPÍTULO 2</b>	<b>70</b>
5.1 Apresentação	70
Bacterioplankton responses to a gradient of macrophyte to phytoplankton dominance in a large coastal subtropical shallow lake	71
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>104</b>
Agradecimentos especiais	105
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO – Normas para publicação na revista Aquatic Ecology</b>	<b>115</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Diversidade Microbiana

Microorganismos podem ser arbitrariamente definidos como procariotos e eucariotos invisíveis a olho nu ( $\sim < 1\text{mm}$ ) (WEISSE, 2006), compreendendo portanto uma grande diversidade de organismos.

A diversidade microbiana é uma questão que esbarra primeiramente no próprio conceito de espécie, para o qual não há ainda consenso. Weisse (2006), em sua extensa revisão de literatura sobre diversidade de microrganismos de água doce, traz diversas questões a este respeito. Um primeiro ponto é uma crítica ao Conceito Biológico de Espécie, que pressupõe a necessidade de reprodução sexuada. Outros conceitos alternativos existem, como o Conceito de Coesão de Espécie, o Conceito Filogenético de Espécie e o Conceito Ecológico de Espécie. Estes conceitos no entanto não deixam totalmente claros os limites entre o que é entendido como espécie, dificultando comparações operacionais da diversidade entre ambientes e métodos empregados. Isto levou a algumas propostas de cunho prático para se trabalhar com uma unidade de diversidade; foram sugeridos os *ecotipos* (populações de organismos que ocupam o mesmo nicho), *unidades taxonômicas operacionais* (UTOs, conceito bastante amplo e aplicável, entre inúmeras outras situações, a trabalhos com migração eletroforética de fragmentos de DNA em géis, onde os fragmentos são assumidos como unidades semelhantes a espécies; quando se trabalha com seqüenciamento, esta definição pode ser assumida como seqüências que difiram  $\leq 1-2\%$  (BOHANNAN; HUGHES, 2003; HUGHES et al., 2001)) e *unidades significativas evolucionárias*, definido como um grupo de organismos que sofreu significativa divergência genética de outros grupos da mesma espécie, muitas vezes cunhado como linhagens e cepas, por exemplo (WEISSE, 2006 e referências).

Não obstante as dificuldades encontradas, progressos têm se acumulado em ecologia microbiana utilizando estes conceitos operacionais, notadamente as UTOs. Os questionamentos a respeito da distribuição da diversidade microbiana no ambiente geraram uma proposição inicial de que pela sua grande abundância e reduzido tamanho, os microrganismos assumem distribuição cosmopolita. Isto seria resultado de reduzidas taxas de extinção e altas de migração, resultando em ubiquidade e baixo número de espécies (FENCHEL; FINLAY, 2004). Algumas evidências apóiam esta idéia; organismos menores podem apresentar incrementos menores de diversidade ao longo de gradientes de tamanho de habitat, indicando que a diversidade local é muitas vezes bastante próxima da



diversidade global (AZOVSKI, 2002). Isto levou à proposição de Finlay, um dos grandes defensores desta hipótese, de que não há biogeografia para organismos <1mm (WHITFIELD, 2005).

Por outro lado, as técnicas de biologia molecular atuais têm permitido acumular evidências de que embora o cosmopolitanismo possa ocorrer para algumas espécies, há sim padrões biogeográficos para microrganismos. Diversos exemplos têm demonstrado padrões de diversidade microbiana associados a tamanho de habitat e distribuição espacial (LINDSTRÖM; LESKINEN; 2002; HORNER-DEVINE et al., 2004; BELL et al., 2005; RECHE et al., 2005; YANNARELL; TRIPLET, 2004; GREEN; BOHANNAN, 2006; MARTINY et al., 2006; CRUMP et al., 2007), alimentando uma discussão que ainda está longe de acabar (WHITFIELD, 2005).

A despeito de discussões em torno da aplicabilidade dos atuais métodos para acessar diversidade microbiana, os esforços para se conciliar função e diversidade, mesmo em níveis de baixa resolução taxonômica, têm sido encorajados (Bent et al. 2007).

## 1.2 Bacterioplâncton – definição

As bactérias, entre os microrganismos, são o objeto de interesse neste trabalho, sendo atualmente reconhecidas com base na classificação filogenética de 21.000 seqüências de DNA correspondentes ao RNA ribossomal da sub-unidade menor ribossômica (SSU rRNA). Esta classificação, compreendendo uma grande variedade de organismos, de escalas micro a macro, hipotetizou a existência natural de três grandes ramos da vida: Dominio Bacteria, Dominio Archaea e Dominio Eucarya (LUDWIG; SCHLEIFER, 2005).

O Dominio Bacteria pode ser dividido em filos (maiores linhas de descendência dentro deste Dominio), num total atual em torno de 20. Este número não é preciso, pois relações entre estes filos iniciais propostos ainda não são totalmente compreendidas (mono ou parafiletismo incerto) e novas descobertas agregam informações que modificam a classificação (LUDWIG; SCHLEIFER, 2005).

No presente trabalho, dentro da grande diversidade taxonômica e de nichos, estão enfocadas dentro de Bacteria aquelas de hábito planctônico (bacterioplâncton) heterotrófico, isto é, organismos do Dominio Bacteria que utilizam-se exclusiva ou preferencialmente de compostos orgânicos reduzidos como fonte de energia (organotrofia) (PACE, 1997) na coluna d'água.

### 1.3 Idéias centrais da ecologia aquática microbiana

Os primeiros micróbios foram observados por Van Leeuwenhoek ainda no século XVII. Desde então a ecologia microbiana passou por uma longa fase de estagnação e só surgiu como disciplina na metade do século XX (PACE, 1997; COTNER; BIDDANDA, 2002).

Durante cerca de três séculos prevaleceu a visão clássica de que os microrganismos atuam no meio ambiente como meros decompositores (COTNER; BIDDANDA, 2002). Neste modelo de teia trófica, o fluxo de matéria e energia é unidirecional e a matéria só retorna ao compartimento biológico na forma inorgânica, depois de ter passado pela decomposição bacteriana (Fig. 01).

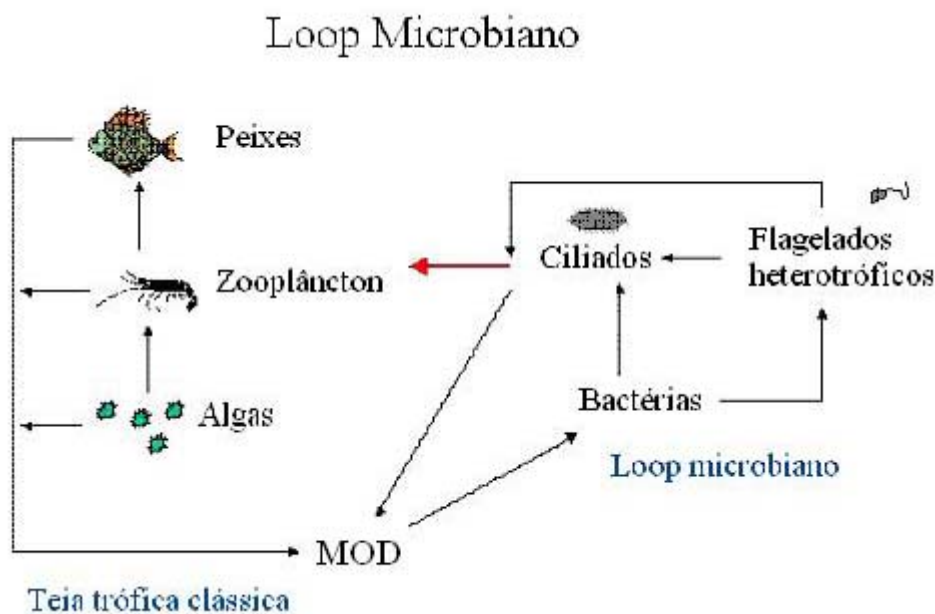


Figura 01: Modelo simplificado de uma teia trófica aquática clássica e a moderna, que incorpora o loop microbiano. MOD: Matéria orgânica dissolvida. Fonte: modificado de Schulz, 2006.

A partir da metade do século XX, uma série de idéias começou a surgir reavaliando o papel dos microrganismos na natureza. POMEROY (1974) foi o primeiro a reconhecer os microrganismos como os principais consumidores de energia nos oceanos e reorganizou a teia trófica clássica de modo a incluir as novas conexões que estavam sendo descobertas. Porter e Feig (1980) indicaram que bactérias e algas cianofícias poderiam ser os principais contribuintes para os processos heterotróficos e autotróficos, respectivamente, em sistemas planctônicos.

Azam et al. (1983) sintetizou esta nova visão em um modelo, chamado de *Microbial Loop* ou Alça Microbiana. A idéia central deste modelo, que baseia-se nas conexões já estabelecidas por Pomeroy (1974), é a de que as bactérias, uma vez transformando MO dissolvida em biomassa

bacteriana, podem ser predadas pelo nano e micropâncton e estes por organismos maiores. Esta etapa é o elo que transporta matéria de volta à teia trófica, sem passar pelo estado inorgânico obrigatório para ser consumida pelo fitoplâncton e assim entrar na teia trófica clássica (JAHNKE; CRAVEN, 1995). Posteriormente Sherr e Sherr (1988), demonstraram a inserção do *Microbial Loop* no restante da teia trófica, enfocando principalmente as transferências de carbono entre compartimentos biológicos.

Estas idéias surgiram em um contexto de desenvolvimento de métodos mais acurados de trabalho como técnicas moleculares e bioquímicas e o método de contagem direta usando corantes fluorescentes (HOBBIE et al., 1977), uma técnica largamente empregada à época. Em particular este último método foi muito importante para o dimensionamento do impacto que as bactérias têm sobre os processos aquáticos, pois 99% das bactérias não são cultiváveis e seus números eram subestimados nos tradicionais métodos de contagem através de técnicas de cultivo (PACE, 1997).

Com a implementação das técnicas modernas, importantes características das assembléias bacterianas começaram a ser delineadas, como a de que a maioria das bactérias da coluna d'água possui dimensões reduzidas, com um diâmetro em geral variando de 0,3 a 0,7  $\mu\text{m}$ , apresentando-se em estados metabólicos variados no ambiente (HOBBIE et al., 1977) e de vida livre (HOBBIE et al., 1972; AZAM; HODSON, 1977). Atualmente é consenso que os fatores que regulam a abundância, distribuição, taxa de crescimento e respiração bacterianas são grandes responsáveis pela regulação de funções-chave ecossistêmicas (COLE, 1999).

O estado atual de conhecimento da Ecologia Aquática Microbiana permite realçar três características principais que devem ser levadas em conta em estudos de bactérias aquáticas.

### 1.3.1 Matéria orgânica nos ambientes aquáticos

A matéria orgânica, na condição de recurso alimentar, é um dos principais componentes ecossistêmicos que regulam os microrganismos heterotróficos, influenciando variáveis tais como densidade, estado metabólico e composição específica. Neste sentido, a forma, a quantidade e a distribuição da MO no ambiente torna-se uma importante variável a ser avaliada. A MO, por sua vez, também sofre o processo inverso e é regulada por estes organismos. Nos ambientes aquáticos naturais oligotróficos, a maior parte da MO encontra-se na forma dissolvida - tipicamente 10:1 em relação à MO particulada, tendendo esta proporção a diminuir, no entanto, ao longo do gradiente trófico (COTNER; BIDDANDA, 2002). Esta assertiva tem importantes implicações: os microrganismos controlam os estoques e rotas da MO, pois são praticamente os únicos componentes biológicos do ecossistema capazes de assimilá-la na forma dissolvida (osmotrofia) (MÜNSTER; CHRÓST, 1990).

Sabe-se atualmente que as bactérias tem preferência por matéria orgânica não-húmica e de tamanhos moleculares menores (<3000 Da) (ROSENSTOCK et al., 2005), ainda que a degradação de MO húmica e de alto peso molecular também possa ocorrer através de processos bacterianos (COATES et al., 2002; ROSENSTOCK; SIMON, 2003). Porém, o próprio entendimento da composição da matéria orgânica ainda é bastante desconhecido em função de dificuldades metodológicas. A maior proporção do carbono reduzido em solos, sedimentos e águas naturais é molecularmente não-caracterizada, proporção que aumenta após passar pelo processamento microbiano (HEDGES et al., 2000).

### 1.3.2 Gradientes tróficos

O processo de eutroficação é interpretado em termos da teia trófica clássica como o aumento agudo ou crônico da concentração de nutrientes em corpos d'água, tendo como consequência um incremento do crescimento autotrófico e consequentemente do heterotrófico. Como resultado, em função da grande quantidade de biomassa produzida, há acúmulo de detritos biogênicos que demandam oxigênio para sua degradação, fenômeno que pode levar a episódios severos de hipóxia. Como estes eventos afetam toda a comunidade aquática (GRAY, 1992), é plausível que os efeitos sejam também aplicáveis aos microrganismos.

Para os procariotos heterotróficos, existem evidências de que a influência microbiana na coluna d'água aeróbica é maximizada em sistemas oligotróficos, pois à medida que o ambiente aumenta em produtividade, há um aumento da importância relativa dos organismos fagotróficos tais como protozoários, o zooplâncton e os peixes, em função da seleção exercida pelo aumento relativo da matéria particulada em relação à dissolvida. Outros mecanismos também possíveis seriam o aumento da pressão de predadores e da mortalidade induzida por vírus, competição com o fitoplâncton por nutrientes, redução relativa do Carbono Extracelular Excretado (CEE) e Lábil e diminuição da Eficiência de Crescimento Bacteriano (ECB), entre outros (COTNER; BIDDANDA, 2002).

Legendre e Rassooulzadegan (1995) mostraram que as teias tróficas pelágicas possuem dois pontos extremos instáveis, um dominado pelos consumidores herbívoros (eutrófico) e seus predadores e outro dominado pelos consumidores microbianos e seus predadores (oligotrófico). Esta instabilidade cria um *continuum* trófico, fazendo com que a maioria dos ambientes encontra-se em um estado multívoro mais estável.

Outro aspecto importante é a indicação é de que, ao longo do gradiente trófico, ainda que uma associação entre produção primária e produção bacteriana se mantenha, parece haver uma relativa desconexão entre estas duas variáveis conforme a produtividade do ambiente aumenta, ocorrendo a

relativa independência da produção bacteriana, girando em torno de 5% da produção primária (KAMJUNKE et al., 1997). Esta constatação é consistente com a idéia previamente exposta de que o CEE é proporcionalmente reduzido ao longo do gradiente trófico, diminuindo sua participação no consumo bacteriano (COTNER; BIDDANDA, 2002).

Em casos extremos, como ambientes hipertróficos, porém, a dinâmica da comunidade pode assumir um comportamento completamente oposto, confluindo para o estado apresentado pelos ambientes oligotróficos. A dominância de espécies de cianobactérias impalatáveis ou de grandes dimensões pode determinar que as bactérias sejam a base alimentar do zooplâncton, uma vez que a abundante biomassa da produção primária não é consumida e termina por produzir grande quantidade de exudatos (CEE) aproveitáveis pelas bactérias (KAMJUNKE et al., 1997).

### 1.3.3 Controle de números bacterianos

A relação de nutrientes e predadores como fatores relacionados à abundância bacteriana já havia sido levantada por Azam et al. (1983). Na concepção de Pace e Cole (1994), o controle *bottom-up* (ascendente) se dá sobre o metabolismo bacteriano e é exercido pelos nutrientes e substratos (abundância, forma e biodisponibilidade) e o controle *top-down* (descendente) está diretamente relacionado ao controle de números bacterianos e é exercida pelos predadores flagelados e ciliados heterotróficos e em menor extensão por alguns metazoários.

O controle *top-down*, por sua vez, parece estar subordinado às condições que regem o controle *bottom-up*. Pace e Funke (1991) não observaram, em experimentos fatoriais em dois lagos temperados, efeito *top-down* do zooplâncton e de predadores protozoários, mas concluíram que esta regulação provavelmente varia em função do estado trófico do ambiente.

Billen et al. (1990) demonstraram que regressões de biomassa em função da produção são uma medida da dependência da assembléia bacteriana em relação aos recursos (controle *bottom-up*), pois a produção bacteriana varia conforme a disponibilidade de substratos. Se há uma estrita dependência da biomassa em relação a recursos e independência em relação a predadores, estas regressões devem ter uma inclinação íngreme.

Pace e Cole (1994), em experimentos fatoriais de curta duração, encontraram aumento de biomassa bacteriana com adição de nutrientes, ausência de diferença significativa com adição de Cladocera (que predaram significativamente os protozoários) e ausência de diferença com adição de nutrientes e Cladocera (interação). A conclusão dos autores foi a de que a bacterivoria tem um papel de menor importância na determinação da biomassa bacteriana. Porém, estes autores não levaram em

conta que esta interação deveria apresentar aumento de biomassa bacteriana caso a predação não fosse um fator importante.

Estudos posteriores têm demonstrado esta dependência em relação ao estado trófico do ambiente, que resulta numa conexão maior entre bactérias e protozoários ao longo do gradiente trófico. Tem sido demonstrado, segundo Cole (1999), em sua revisão de literatura, que a maioria das assembléias bacterianas, de forma mais acentuada em ambientes menos produtivos, é dominada por células dormentes. Existem evidências de que isto é decorrente da predação seletiva de flagelados sobre células maiores e mais ativas (DEL GIORGIO et al., 1996; COLE, 1999), reforçando o papel dos predadores sobre a estrutura das assembléias bacterianas (COTNER; BIDDANDA 2002), numa relação positiva com a crescente produtividade do ambiente, conforme estudos anteriores já apontavam (PACE; FUNKE, 1991).

Todos estes mecanismos (a dominância das bactérias em sistemas oligotróficos e seu controle por predadores acentuada em sistemas eutróficos) produzem como resultado final uma relativa constância nos números bacterianos - da ordem de  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> - ao longo do gradiente trófico, embora que em termos absolutos haja um aumento de densidade e biomassa bacterianas com o aumento da produtividade do ambiente (AZAM ET AL., 1983; COTNER; BIDDANDA, 2002). Esta existência de algum mecanismo homeostático responsável pela pequena variação de densidade do bacterioplâncton na coluna d'água já havia sido questionada por Azam et al. (1983).

#### 1.4. Importância do bacterioplâncton nos biogeociclos

O principal impacto que os microrganismos aquáticos representam ocorre sobre os ciclos de nutrientes e do carbono, sendo responsáveis pela maior parte da respiração aeróbica, toda a respiração anaeróbica e uma enorme proporção da regeneração de nutrientes (COLE, 1999). Portanto, o fluxo de energia nos ecossistemas aquáticos passa em grande extensão pela utilização da matéria orgânica dissolvida (MOD) pelas bactérias heterotróficas (TRANVIK, 1997).

Aos predadores ciliados e flagelados é atribuído o maior papel na mineralização de nutrientes uma vez que as bactérias re-assimilam a grande maioria dos nutrientes liberados, enquanto seus predadores excretam uma considerável proporção do carbono e nitrogênio assimilado (AZAM et al. 1983). Contudo, este cenário parece ocorrer principalmente em ambientes oligotróficos, onde há alta conexão entre bactérias e produção primária; em ambientes eutróficos, por sua vez, a seleção pela fagotrofia e a competição com o fitoplâncton determinam exportação líquida de matéria e energia do compartimento biológico, incorrendo em acumulação de nutrientes (alta remineralização) (COTNER;

BIDDANDA, 2002). Atualmente sabe-se que a importância relativa da participação das bactérias na remineralização varia de acordo com o estado trófico do ambiente, acompanhando a ECB (COTNER; BIDDANDA, 2002).

### 1.5 Ecologia Aquática Microbiana no Brasil e em lagos subtropicais no Rio Grande do Sul

A produção de textos teóricos no Brasil abordando questões de Ecologia Aquática Microbiana é bastante recente, podendo ser encontrada em livros e capítulos de livros. Os temas são bastante amplos e incluem teias alimentares microbianas (THOMAZ, 1999), ciclagem do carbono em sistemas aquáticos continentais (VIDAL et al., 2005), diversidade microbiana e técnicas empregadas para acessá-la (Cesar et al., 2005) e fotodegradação do carbono na água (SUHETT et al. 2006).

Paralelamente, a produção de conhecimento em universidades através de teses e dissertações vêm se acumulando. Alguns tópicos explorados incluem estimativa de produção bacteriana em sistemas aquáticos associados ao Rio Doce (MG) (PETRUCIO, 2003), ecologia de diversos grupos microbianos em sistema fluvial-lagunar nordestino (MAGNÓLIA, 2004), morfologia, morfometria e densidade bacterianas em reservatórios (RACY, 2004) e diversos aspectos de estrutura e diversidade da assembléia bacteriana em reservatórios de geração de energia, sendo um dos pioneiros na aplicação de uma abordagem biogeográfica aplicada a estudos microbianos no Brasil (DEL'DUCA, 2007).

Com relação a trabalhos publicados, estes se concentram basicamente na região sudeste, abordando aspectos como comparação entre sistemas costeiros e oceânicos (TENENBAUM et al., 2001), em lagoas costeiras no estado do Rio de Janeiro (RJ) (FARIA; ESTEVES, 2001), produção bacteriana e primária em área de ressurgência na plataforma continental no RJ (DE CARVALHO; RODRIGUEZ, 2004), comparações de abundância e produção do bacterioplâncton em sistema marinho oligotrófico e estuarino eutrófico no RJ (ANDRADE et al., 2003), adequação metodológica para estimativas de produção bacteriana na Baía de Guanabara (RJ) (GONZALEZ, 2000), a influência de uma laguna carioca sobre a assembléia bacteriana costeira (TAKETANI et al., 2003), distribuição espacial da abundância de bactérias heterotróficas na lagoa Rodrigo de Freitas (Gonzalez et al., 2006), distribuição de grupos de bactérias na plataforma continental, diferenciados em termos de quantidade de ácidos nucléicos (ANDRADE et al., 2007), comparação entre lagoas costeiras tropicais brasileiras com lagos na Alemanha (FURTADO, 2001), estrutura da comunidade do protozooplâncton em um lago no sudeste brasileiro (GOMES; GODINHO, 2003), excreção de polissacarídeos bacterianos em experimento a partir de amostras de reservatório (SP) (PANHOTA et al., 2007), diversidade filotípica no rio Tietê (SP) (ABE et al., 2003), taxas de respiração bacteriana em sistema estuarino na Cananéia (SP) (HILDA, 1994),

manipulação de substratos e predadores em águas costeiras e oceâncias (METZLER, 2000) e taxas de produção bacteriana e fitoplanctônica em lagos associados ao Rio Doce (MG) (PETRUCIO et al., 2004). Outras regiões do país também têm tido alguma produção através de tópicos como respiração bacteriana e rotas de degradação de carbono em planícies de inundação e lagos amazônicos (Waichman, 1996; ROLAND; VIDAL, 2001; FARJALLA et al., 2002; AMADO ET AL., 2006), distribuição espacial e sazonal de diversos aspectos metabólicos do bacterioplâncton em sistema fluvial-lagunar no nordeste brasileiro (ARAÚJO; GODINHO, 2008) e interações tróficas envolvendo bacterioplâncton no reservatório de Corumbá (BONECKER; AOYAGUI, 2005).

Na região sul do país, que se diferencia das demais regiões pelo clima subtropical, há trabalhos em sistemas estuarinos (KOLM; ANDRETTA, 2003) e fluvial-lagunares no Paraná, onde foram abordados temas como efeito de fatores bióticos e abióticos sobre a abundância bacteriana (CARVALHO et al., 2003) e biomassa e abundância de bactérias associada a padrões de distribuição do fitoplâncton na plataforma continental do Paraná (SIQUEIRA et al., 2006).

No estado do Rio Grande do Sul os trabalhos nesta área têm focado o estuário da Lagoa dos Patos: destacam-se a tese de Cesar (2002), que estudou a estrutura, dinâmica e diversidade do bacterioplâncton em relação a nutrientes, predadores e regime de chuvas, o artigo de Anesio et al. (2003), onde o papel complementar de organismos livres e aderidos foi focado com relação à degradação de detritos de uma macrófita estuarina, (ABREU et al., 2003), que relatou a desconexão entre uma espécie de diatomácea e abundância do bacterioplâncton e a revisão de Cesar e Abreu (2001), que contempla os estudos realizados na Lagoa dos Patos e regiões costeiras próximas.

Um grande número de lagos no Rio Grande do Sul concentra-se na planície costeira. Esta, com uma superfície total de 22.740 km<sup>2</sup>, apresenta uma grande proporção em área superficial de lagos e lagunas: 14.260 km<sup>2</sup> (63%). A presença de grande número de lagos rasos (profundidade máxima ~11m) apresenta-se como uma das principais feições nesta planície, tendo estes lagos se originado no quaternário como consequência de uma regressão marinha pós-glacial, moldados posteriormente por erosão fluvial, deposição marinha, dinâmica praial e movimentos isostáticos da plataforma continental. Esta seqüência de lagos, com origem semelhante, variações de até três níveis de grandeza em área superficial, variados níveis de conectividade entre si e distribuídos de acordo com um gradiente latitudinal é bastante interessante para o endereçamento de questões mais complexas da ecologia microbiana (SCHWARZBOLD; SCHÄFER, 1984; SCHÄFER, 1988; HOLZ, 1999).

O vento tem sido considerado uma importante forçante em toda a planície costeira (SCHWARZBOLD; SCHÄFER, 1984), promovendo efeito *patchiness* (distribuição horizontal heterogênea) sobre o fitoplâncton, o que tem levantado a hipótese de que estes lagos podem comportar-se como um



mosaico de situações ecológicas internas (Fragoso et al., submetido). Este efeito do vento sobre gradientes de variáveis limnológicas já foi comprovado em um lago desta planície (Itapeva), havendo efeitos sobre o fitoplâncton e o zooplâncton (Cardoso; Motta-Marques, 2003; Cardoso; Motta-Marques, 2004; Cardoso; Motta-Marques, 2007). O fitoplâncton, por sua vez, tem sido considerado o principal mediador entre fatores extrínsecos meteorológicos e respostas do bacterioplâncton, determinando situações de sincronia na fenologia do fito- e bacterioplâncton em escala regional (Kent et al., 2007).

Um outro fator importante que pode estar relacionado à criação destes mosaicos é que muitas destes lagos apresentam grande influência de vegetação macrofítica. As macrófitas também apresentam influência sobre o metabolismo do bacterioplâncton, especialmente em lagos rasos e pequenos com baixas razões de zona pelágica:litoral (HUSS; WEHR 2004), onde liberam grande quantidade de lixiviados orgânicos que influenciam este metabolismo (Wetzel, 1992; FARJALLA et al., 2001). As macrófitas estão presentes em maior abundância e riqueza em lagos menores (SONDERGAARD et al., 2005; SCHEFFER; VAN GEEST, 2006), prevenindo a dominância do fitoplâncton através de diversos mecanismos como diminuição da incidência solar, liberação de compostos alelopáticos (SCHEFFER; JEPPESEN, 1997; KÖRNER; NICKLISCH, 2002) e competição por nutrientes (HUSS; WEHR 2004; STANLEY et al. 2003; ROONEY; KALFF 2003), o que por sua vez também acaba por criar uma influência indireta sobre o bacterioplâncton como consequência desta interação com o fitoplâncton (COTNER; BIDDANDA 2002). Questões como a distribuição e a abundância de macrófitas e do fitoplâncton têm sido elencados como variáveis explanatórias significativas para o bacterioplâncton (CURRIE, 1990; WETZEL, 1992; ROBARTS et al., 1996; KAMJUNKE et al., 1997; HULOT et al., 2001; HORNER-DEVINE et al., 2003; SCHLICKEISEN et al. 2003; PETRUCIO et al., 2006).

Questões mais complexas como a existência de padrões biogeográficos de diversidade bacteriana em lagos têm sido relacionados ao tamanho de habitat (Horner-Devine et al., 2004; Reche et al., 2005; Bell et al., 2005) e distribuição espacial (Lindström; Leskinen; 2002; Yannarell; Triplett, 2004; Green; Bohannan 2006). Porém, ainda não há um consenso de que há biogeografia para bactérias, pois a heterogeneidade ambiental e fatores locais têm sido elencados como os responsáveis pelas possíveis respostas biogeográficas encontradas (AZOVSKI, 2002; FENCHEL; FINLAY, 2004; VAN DER GUCHT et al., 2007).

Uma importante questão que soma-se a isto é o fato que estes modelos biogeográficos têm sido desenvolvidos em áreas temperadas. Contudo, nos sistemas tropicais do Brasil têm surgido evidências de que há diferenças significativas com relação à diversidade de ambientes temperados, mesmo de grandes grupos bacterianos (ABE et al., 2003; DEL'DUCA, 2007).

## 2. OBJETIVOS GERAIS

Neste contexto de intenso debate a respeito da existência de biogeografia bacteriana e da necessidade de comprovação da aplicabilidade dos modelos existentes para áreas tropicais e subtropicais, o presente trabalho adotou um sub-conjunto de lagos subtropicais na planície costeira do Rio Grande do Sul para endereçar os seguintes objetivos:

I) avaliar a existência de padrões de distribuição para o bacterioplâncton, utilizando como fatores:

a) o tamanho de lagos e distância entre eles (fatores biogeográficos);

b) a heterogeneidade ambiental e distinção entre dois possíveis habitats principais, a zona litoral (dominado por macrófitas) e a zona pelágica (dominância do fitoplâncton) (fatores locais);

e

II) avaliar fatores locais (mosaico de habitats) através da estimativa de metabolismo, estrutura e diversidade do bacterioplâncton, bem como variáveis relacionadas em uma transição contínua a partir do ambiente litoral até o pelágico no maior lago deste sub-conjunto de lagos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Variáveis limnológicas

##### 3.1.1 Nutrientes

###### 3.1.1.1 Formas nitrogenadas (MACKERETH et al., 1989):

3.1.1.1.1 Nitrogênio total – método colorimétrico que emprega oxidação de todo o nitrogênio da amostra a nitrato com persulfato de potássio sob pressão e posterior redução em coluna de cádmio, transformando todo o nitrato em nitrito. Posteriormente ocorre a diazotação da sulfanilamida pelo nitrito, formando um composto colorido e lido em espectrofotômetro a 543nm;

3.1.1.1.2 Nitrato – método colorimétrico com redução do nitrato presente na amostra em coluna de cádmio, sem passar pela etapa de oxidação, ocorrendo, após, a diazotação da sulfanilamida pelo nitrito formado, criando um composto colorido e lido em espectrofotômetro a 543nm;

3.1.1.1.3 Nitrito – método colorimétrico de diazotação da sulfanilamida pelo nitrito presente na amostra em condições ácidas sem passar pelas etapas de oxidação e redução. Ocorre a formação de um composto colorido e lido em espectrofotômetro a 543nm;

3.1.1.1.4 Amônia – método que utiliza-se da reação da amônia com fenol e hipoclorito em solução alcalina para formar indofenol azul, que é lido em espectrofotômetro a 635nm.

###### 3.1.1.2 Formas fosfatadas (MACKERETH et al., 1989):

3.1.1.2.1 Fósforo total - método colorimétrico através de condensação ácida e sob pressão dos íons ortofosfato com o molibdato em meio contendo persulfato de potássio, o que provoca a transformação de todo o fósforo em ácido molibdofosfórico. Este possui coloração azul e é lido a 880nm em espectrofotômetro.

3.1.1.2.2 fósforo hidrolisável – método colorimétrico que emprega hidrólise ácida da amostra em solução de ácido forte, sob pressão. Após digestão, a amostra é neutralizada e reage com o ácido cítrico adicionado, gerando composto de cor azul, lido em espectrofotômetro a 880nm.

3.1.1.2.3 fósforo reativo - método colorimétrico de condensação de íons ortofosfato e molibdato em solução ácida (sem digestão), gerando ácido molibdofosfórico, composto de coloração azul lido a 880nm em espectrofotômetro.

Espectrofotômetro utilizado: Varian Cary 1-E

### 3.1.2 Sílica

A sílica (silicato) foi quantificada através de método fotométrico em kit específico (Si Merck Spectroquant® kit para silicatos –ácido silicílico).

### 3.1.3 pH e Alcalinidade

O pH das amostras foi medido através de método potenciométrico, com pHmetro TecnoPON (MPA 210p) . A alcalinidade foi medida através de método titulométrico de Gran (WETZEL; LIKENS, 2000).

### 3.1.4 Sólidos

A concentração de sólidos foi determinada por método gravimétrico, sendo discriminadas as seguintes frações (APHA 1999) :

3.1.4.1 Sólidos Totais: massa sólida remanescente da evaporação da parte líquida da amostra (100mL), primeiramente evaporada em banho-maria e posteriormente seca em estufa a 105 ° C por uma hora;

3.1.4.1.1 Sólidos Totais Fixos: massa sólida remanescente após calcinação dos Sólidos Totais em mufla a 450 °C por uma hora;

3.1.4.1.2 Sólidos Totais Voláteis: calculados como a diferença entre Sólidos Totais e Sólidos Totais Fixos;

3.1.4.2 Sólidos Totais Suspensos: massa sólida remanescente em filtro após secagem em estufa a 105 ° C por uma hora de uma quantidade de amostra estabelecida. O filtro utilizado (Macherey-Nagel) é fabricado em fibra de vidro e possui retenção média de 1,4 µm.

3.1.4.2.1 Sólidos Suspensos Fixos: massa sólida remanescente após calcinação dos Sólidos Totais Suspensos em mufla a 450 °C por uma hora;

3.1.4.2.2 Sólidos Suspensos Voláteis: calculados como a diferença entre Sólidos Totais Suspensos e Sólidos Suspensos Fixos;

### 3.1.5 Substâncias húmicas, cor e turbidez

A cor, turbidez e teor de compostos húmicos da água foi estimada pela absorbância em espectrofotômetro (Varian Cary 1-E) a 430, 750 e pela razão 250:365nm, sendo esta considerada uma proporção entre compostos de baixo e alto peso molecular (STROME; MILLER, 1978).

Radiações curtas (na faixa do ultravioleta UV,  $\lambda < 400\text{nm}$ ) são mais absorvidas por moléculas menores do que maiores e esta razão pode aumentar com a exposição à UV, porque moléculas maiores são mais suscetíveis à fotólise. Assim, moléculas maiores (compostos húmicos) expostas à radiação UV tendem a se degradar pela absorção de comprimentos de ondas maiores (estimado pela absorção a 365nm) e seus componentes passam a absorver nos comprimentos de onda menores (estimado pela absorção a 250nm), aumentando a razão (STROME; MILLER, 1978; LINDELL et al., 1995).

### 3.1.6 Série de carbono

A concentração de carbono nas amostras foi medida através da quantificação do Carbono Inorgânico Dissolvido (DIC), do Carbono Orgânico Total (TOC) e do Carbono Orgânico Dissolvido (DOC). O carbono orgânico considerado neste trabalho trata-se de carbono dissolvido, discriminado entre TOC (amostra bruta) e DOC (amostra filtrada em filtros de fibra de vidro previamente calcinados a 450 °C por uma hora - Macherey-Nagel, 0,6  $\mu\text{m}$  de retenção média).

A coleta das amostras para análise de carbono foi feita em vidros âmbar, calcinados da mesma forma que os filtros, com bocal protegido da tampa de plástico por folha de alumínio. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e no escuro até análise.

Para quantificação, as amostras foram lidas em Analisador de Carbono Orgânico Total (Shimadzu 5000), sendo lidos diretamente o CI (Carbono Inorgânico, DIC) e o CT (Carbono Total, que é igual a CI + CO, sendo o CO o carbono orgânico). A diferença entre CT e CI é o TOC nas amostras brutas e o DOC nas amostras filtradas.

## 3.2 Variáveis Biológicas

### 3.2.1 Fitoplâncton

#### 3.2.1.1 Clorofilas

As clorofilas a, b e c e também feofitinas foram quantificadas através do método de extração fria com etanol e leitura em espectrofotômetro a 630, 664, 665 e 647nm, corrigidos da leitura da turbidez a 750nm (JESPERSEN; CHRISTOFFERSEN, 1987).

#### 3.2.1.2 Produção primária

O procedimento para a estimativa da produção primária seguiu Wetzel e Likens (2000). Este método foi utilizado somente no trabalho apresentado no capítulo 2.

As amostras de água superficial de cada ponto foram coletadas em triplicatas em frascos plásticos de polietileno de 1L. A incubação foi realizada em frascos tipo DBO de 100mL, sendo adicionados a estes 1000  $\mu$ L de solução radioativa de bicarbonato de sódio radiomarcado ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ), atingindo uma concentração final de 8,0 $\mu$ Ci/mL. A incubação foi realizada, de acordo com a amostragem, em triplicatas, claro e escuro, e frascos iniciais (totalizando 9 frascos por ponto amostral), ao qual foi adicionado 1mL de formaldeído comercial (40%), com concentração final 0,4% (diluído 1:100 vol:vol).

As amostras foram incubadas entre 12:50 e 16:50. Os frascos foram suspensos e homogeneamente distribuídos em dois quadros de PVC de 1 $\times$ 1m com cordões de aproximadamente 10cm de comprimento amarrados em torno dos gargalos (um quadro para frascos claros e outro para os escuros). A incubação foi apenas à superfície, uma vez que a profundidade no ponto de amostragem não excedeu dois metros e a dinâmica do vento exerce intensa mistura da coluna d'água. O quadro foi ancorado em área de margem, a aproximadamente 0,5m de profundidade.

Após a incubação, a atividade do fitoplâncton dos frascos foi interrompida da mesma forma que para o frasco inicial. Os frascos foram então refrigerados e acondicionados em local escuro até preparação em laboratório.

O seguinte procedimento foi adotado para cada frasco: a amostra foi filtrada (15mL) em filtro de fibra de vidro GF1 (Macherey-Nagel) de 0,7 µm de retenção média. O filtro foi recolhido em tubo tipo Eppendorf (2mL) e 2,5 mL do filtrado foi colocado em placa de poços com uma pastilha magnética. A placa foi colocada sobre agitador magnético e em seguida foram adicionadas 3 gotas de HCl concentrado (comercial) ao filtrado, com a amostra sendo agitada em meio ácido por 5 minutos em capela. Foram recolhidos então 2 mL do filtrado também em tubos tipo Eppendorf (2mL).

Para contagem, os filtros foram secos em geladeira, apenas deixando os tubos abertos pelo período de uma semana. Após a secagem, foram transferidos para vials plásticos de polietileno de 8mL e receberam aproximadamente 2 mL (ou até cobrir o filtro) de líquido de cintilação Optiphase HiSafe III (Wallac). O filtrado também foi transferido para os vials plásticos e receberam até 20 mL de líquido de cintilação (até as amostras ficassem transparentes, para não interferir na contagem).

A leitura se deu em um cintilador (contador de partículas beta, Cintilador LKB Wallac 1209). A contagem em CPM (contagens por minuto) foi realizada por 600s duas vezes e a partir das médias de cada contagem foi calculada uma nova média, esta utilizada nos cálculos da produção, uma vez descontada a média do tubo inicial. Os valores informados já são em DPM, não sendo necessária correção para eficiência do aparelho.

Para a estimativa da produção primária, usou-se a seguinte equação:

$(x)(c) = (a)(b)(d)$ , onde (x) é o  $^{12}\text{C}$  assimilado, (c) é o  $^{14}\text{C}$  disponível, (a) é o  $^{12}\text{C}$  disponível, (b) é o  $^{14}\text{C}$  assimilado e (d) é o fator dimensional que converte  $\text{mg.L}^{-1}$  para  $\text{mg.m}^{-3}$ .

Os resultados foram expressos em  $\text{mgC. m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ .

### 3.2.1.3 Densidade, biomassa e principais grupos do fitoplâncton

Coleta – As amostras para o capítulo 1, exceto para a lagoa Mangueira (coleta descrita para o capítulo 2, abaixo), foram coletadas em frascos de polietileno de 250mL sem prévia concentração. Para o capítulo 2, o fitoplâncton foi concentrado em peneira de 20 µm através da filtração de 20L da amostra do local nos mesmos frascos. Para ambas as coletas, a fixação foi feita em solução de formaldeído 4% (Formaldeído comercial 40%, diluído em 1:10 vol:vol) e as amostras acondicionadas no escuro e à temperatura ambiente até análise.

A densidade foi estimada utilizando-se câmaras de Sedgwick-Rafter em microscópio invertido (APHA, 1999). Foram quantificados pelo menos 100 indivíduos da espécie mais abundante, sendo os resultados expressos em  $\text{indivíduos.mL}^{-1}$ .

A biomassa do fitoplâncton foi estimada em no mínimo 20 indivíduos (quando possível) de cada espécie, sendo seu biovolume calculado através de aproximações a sólidos geométricos (SUN; LIU 2003; HILLEBRAND et al., 1999). A biomassa fresca ( $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1} = \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi calculada através da multiplicação do biovolume pela densidade de cada espécie. A biomassa fresca foi posteriormente convertida em biomassa de carbono por fatores de conversão empíricos (WETZEL; LIKENS 2000). Os resultados foram expressos em  $\text{mg} \cdot \text{C} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Grandes grupos do fitoplâncton (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Chlorophyceae, Cyanobacteria, Dynophyceae, Euglenophyceae, Zygnemaphyceae) foram identificados de acordo com van de Hoek et al. (1998) e as densidades respectivas de cada um foi calculada da mesma maneira que para a densidade geral.

### 3.2.2 Densidade do zooplâncton

As amostras para o zooplâncton foram coletadas através da filtração de 20L em peneira de nylon de 20  $\mu\text{m}$  de abertura de malha. Foram então acondicionadas em frascos de polietileno de 250mL em solução de formaldeído 4% (Formaldeído comercial 40%, diluído em 1:10 vol:vol), sob refrigeração e no escuro até triagem (WETZEL; LIKENS, 2000).

Em laboratório as amostras foram concentradas, na mesma peneira, a 30mL e contadas integralmente em câmaras de sedimentação (Ütermohl) e analisado sob microscópio invertido e aumento de 100 $\times$ . O número total de organismos contados (densidade) foi determinado através da equação  $N^{\circ} \text{org} \cdot \text{m}^{-3} = (N \times 1000 / V_{\text{filt}})$ , onde N é igual ao número total de organismos contados, 1000 é o fator dimensional para transformação de  $N^{\circ} \text{org} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $N^{\circ} \text{org} \cdot \text{m}^{-3}$  e  $V_{\text{filt}}$  é o volume de amostra filtrado (20L).

A análise qualitativa abrangeu apenas grandes grupos (Cladocera, Copepoda, Náuplios, Rotifera e Outros), por tratarem-se dos principais componentes deste ambiente. Os protozoários foram analisados separadamente (WETZEL; LIKENS, 2000).



### 3.2.3 Densidade de ciliados

Os protozoários (ciliados) foram coletados de duas formas. No capítulo 1, exceto para a lagoa Mangueira (coleta descrita para o capítulo 2), foram coletados 50mL de amostra, sendo estas fixadas com lugol 0,5% (Lugol comercial 5% diluído em 1:10 vol:vol) em frascos de polietileno de 50mL de capacidade e acondicionados sob refrigeração e no escuro até análise. No capítulo 2, foram filtrados 2L de água em peneira de nylon de 20 $\mu$ m de abertura de malha. As amostras foram fixadas e acondicionadas como descrito acima para o capítulo 1 (modificado de WETZEL; LIKENS, 2000).

Para enumeração, as amostras foram contadas integralmente em câmaras de sedimentação (Ütermohl), sendo discriminadas somente a classe “Ciliados Totais” (KUDO, 1966; GRELL, 1973).

### 3.2.4 Variáveis bacterianas

#### 3.2.4.1 Procedimento de campo

O primeiro procedimento adotado a partir da amostra bruta foi a pré-filtração com papel quantitativo (MN 640d Macherey-Nagel) de retenção média 2,0 a 4,0  $\mu$ m para excluir interferentes para a análise automatizada de imagens, tais como detritos e organismos do zoo- e fitoplâncton. Foram realizados vários testes com filtros de fibra de vidro e papel de diversas retenções (Macherey-Nagel) para determinar o melhor pré-filtro para a amostra. Os resultados de contagens em 20 campos em cada filtro testado, bem como das contagens da água Mili-Q utilizada na suspensão bacteriana por ocasião da filtração estão sumarizados na Figura 02. Todos os filtros testados apresentaram valores pequenos de organismos do nanoplâncton (> 2,0  $\mu$ m) e maiores.

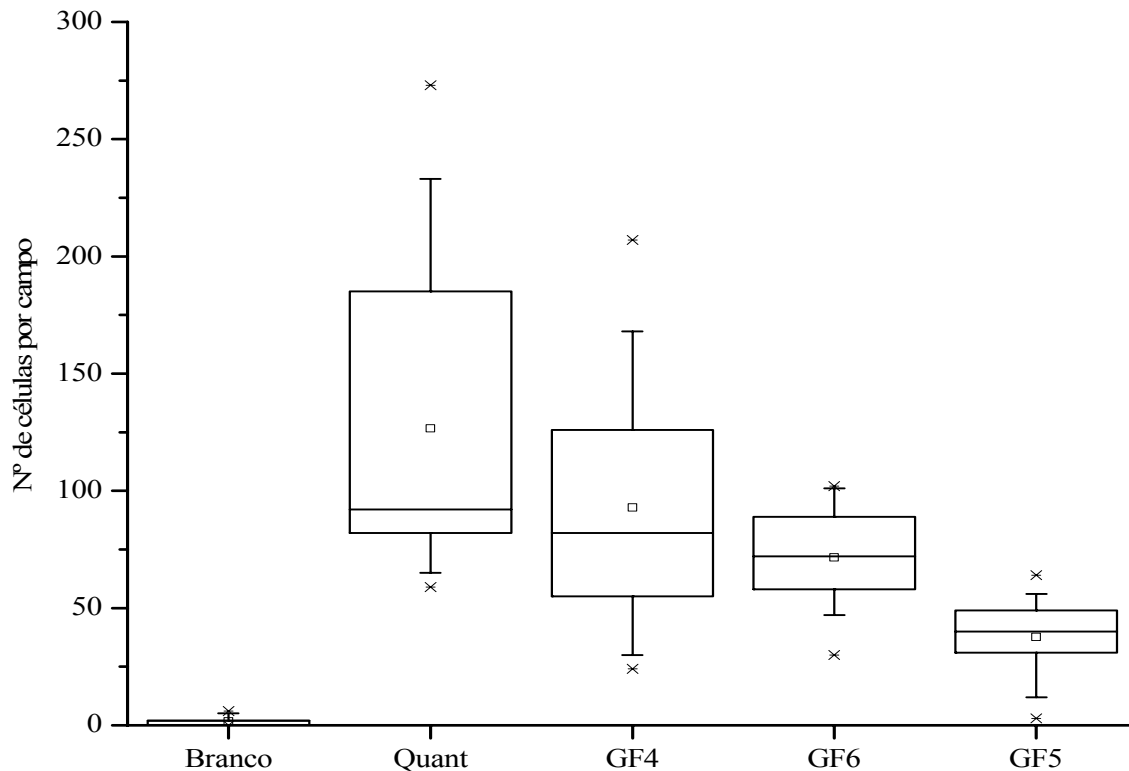


Figura 02: Teste de diferentes filtros de fibra de vidro e de papel para pré-filtrações de amostras bacterianas. Branco - água Milli-Q utilizada para as suspensões bacterianas; Quant - filtro de papel MN (95% celulose, retenção média de 2 -4  $\mu\text{m}$ ); GF4, GF6 e GF5 - filtros de fibra de vidro MN: 1,4; 0,6 e 0,4  $\mu\text{m}$  de retenção média, respectivamente. Valores de número de células por campo referem-se a contagens sob microscopia de epifluorescência.

As amostras então foram fixadas a partir de 9 mL de amostra de água pré-filtrada e 1 mL de formol comercial (40%, 1:10 vol:vol) em frascos plásticos de polietileno, atingindo a concentração final de 4% (valor dentro do intervalo levantado por Kepner e Pratt, 1994). O acondicionamento se deu em refrigerador até o momento da análise (DALEY; HOBBIÉ, 1975).

#### 3.2.4.2 Densidade, biovolume, biomassa e morfotipos

As amostras foram filtradas (<5,0 kPa) em torre de filtração (Vaccum Manifold, Millipore) com membranas de policarbonato black 0,2  $\mu\text{m}$  de porosidade (GE). Procedeu-se a filtração de 2mL de amostra + 1 mL de água Milli-Q para melhorar a distribuição das bactérias no filtro. Os filtros foram corados durante cinco minutos com o corante fluorescente acridina laranja 10% (3,6-bis[*dimetilamino*]cloreto de acridina) (modificado de Hobbie et al., 1977).

A montagem das lâminas seguiu de acordo com o protocolo original de Hobbie et al. (1977). Estas foram acondicionadas refrigeradas e analisadas em geral até o dia seguinte, dentro do período máximo de uma semana (PORTER; FEIG, 1980).

#### 3.2.4.2.1 Captura de imagens

A captura de imagens foi realizada em microscópio com câmera refrigerada acoplada (MOTIC 5000) a microscópio de epifluorescência Olympus IX-70, com o auxílio do programa MOTIC Image (v.3.2).

Foram capturadas cerca de 10 imagens sistematicamente espalhadas por filtro. O valor da relação  $\mu\text{m}/\text{pixels}$  (0,086) das imagens no sistema utilizado está dentro da faixa reportada por Massana et al. (1997): 0,067 – 0,090 para outros sistemas de análise de imagens.

#### 3.2.4.2.2 Processamento das imagens

Foram analisadas sempre 6 imagens e >200 bactérias no total no programa Image Tool (v.3.00), com a seguinte rotina: coloração para escala de cinza, filtro Gauss (5 x 5), Laplace (5 x 5) e 3x Median (3 x 3) (MASSANA et al., 1997). O número de imagens a serem analisadas foi sugerido por Massana et al. (1997) entre 4 a 6, sendo o número mínimo de 6 imagens indicado em teste piloto para o presente estudo (Fig.03).

Por último procedeu-se a binarização da imagem através da escolha do limiar que mantém as partículas de interesse e exclui os ruídos, etapa esta necessária para as análises posteriores.

As imagens binárias processadas pelo programa Image Tool (v.3.00) foram carregadas no programa Image Tool (v.1.27), sendo utilizado deste ponto em diante o sistema de análise de imagens CMEIAS (LIU et al., 2001) [<http://www.cme.msu.edu/CME/index.html>], que consiste em uma série de plug-ins especialmente desenvolvidos para o Image Tool (v.1.27) [<http://uthscsa.edu/dig/itdesc.html>], que fornecem as medidas celulares individuais e classificação em morfotipos (detalhes na seção 3.2.4.2.6, abaixo).

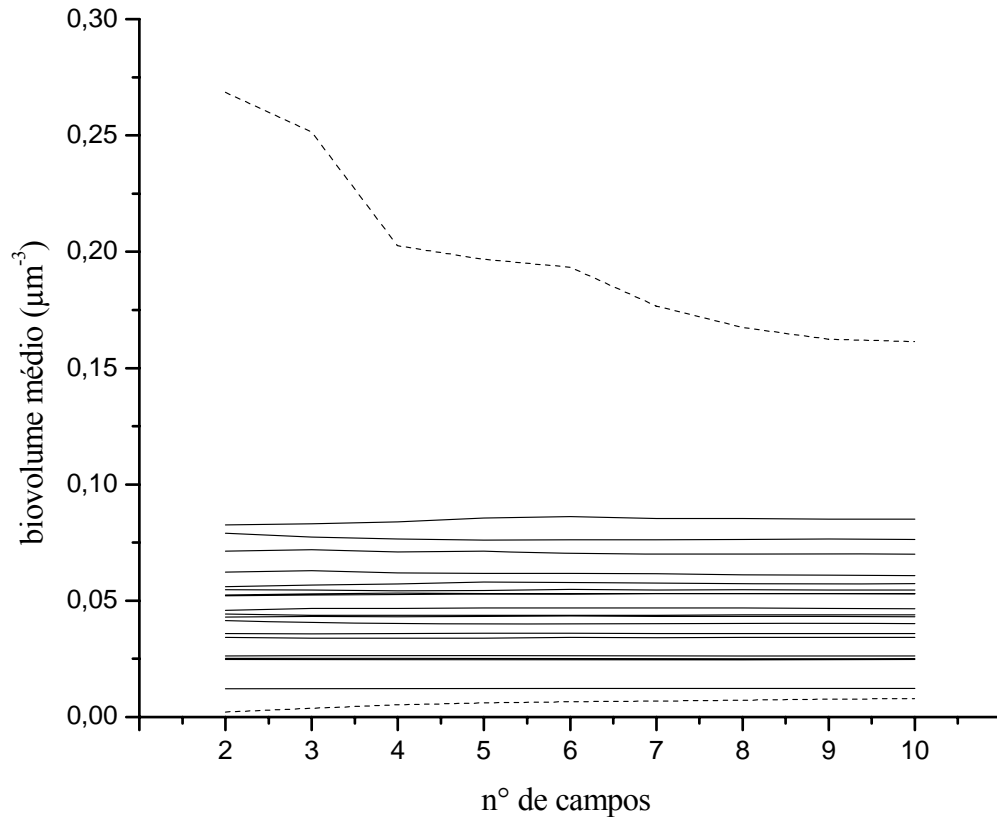


Figura 03: Biovolume médio calculado a partir da análise de número crescente de imagens (campos) por filtro em 18 amostras. Linhas pontilhadas indicam o limites de confiança de 97,5% superior e 2,5% inferior para a distribuição de valores obtido por teste de aleatorização.

### 3.2.4.2.3 Densidade

Os valores de densidade foram calculados a partir da média do número de objetos identificados por campo nas imagens analisadas para cada amostra. Esta média foi transformada em densidade através da equação (KEPNER; PRATT, 1994):

$$n^{\circ} \text{ céL.mL}^{-1} = \frac{(N \times Af)}{(d \times Vf \times Ag)}$$

onde,

N = número médio de células contadas por amostra (média de todas as imagens analisadas); Af = área de filtração (área do filtro onde as bactérias efetivamente ficaram retidas); d = fator de diluição em função do preservante (volume final/volume da amostra, neste caso 0,9); Vf = volume filtrado de amostra (mL) previamente diluída pelo preservante e Ag é a área do campo de contagem do sistema utilizado.

#### 3.2.4.2.4 Biovolume

A partir das medidas obtidas pela análise das dimensões bacterianas foram calculados os biovolumes individuais das bactérias a partir de duas equações (MASSANA et al., 1997):

Para formas não Cocus (através dos cálculos intermediários de *We* e *Le*):

$$\text{I) } We = \frac{P - \sqrt{(P - 4\pi A)}}{\pi}$$

$$\text{II) } Le = \frac{P}{2} + We \left(1 - \frac{\pi}{2}\right)$$

$$\text{III) } V1 = \frac{\pi}{4} We^2 \left(Le - \frac{We}{3}\right)$$

Para formas Cocus ou aproximadamente esféricas:

$$V2 = \frac{4}{3} \sqrt{\frac{A^3}{\pi}}$$

onde,

A = área do objeto, medida como número de pixels na aproximação poligonal da célula; P = perímetro, medido como comprimento do contorno externo do objeto, representado como um polígono.

Foi calculado o biovolume médio de cada imagem a partir de todas as bactérias presentes e posteriormente o biovolume médio de todas as imagens analisadas, expresso em  $\mu\text{m}^3$ .

#### 3.2.4.2.5 Biomassa

A biomassa bacteriana foi calculada através de um modelo alométrico, que estipula o conteúdo de carbono em função do biovolume celular para cada bactéria na imagem através da equação  $C = 0,09 \times volume^{0,9}$  (NORLAND 1993). Foi calculado o conteúdo de carbono celular médio (pgC) de todas as bactérias em cada imagem e depois uma média de todas as imagens. Esta média geral, por sua vez, foi multiplicada pela densidade geral (ind. mL<sup>-1</sup>) e o resultado expresso em pg.C.mL<sup>-1</sup> (picogramas de carbono bacteriano por mL).

#### 3.2.4.2.6 Morfotipagem

Para a análise dos morfotipos, o programa CMEIAS utiliza múltiplas medidas de cada objeto (esfericidade, alongação, nível de compactação, curvatura máxima, razão largura/comprimento, razão área/menor quadrado retangular contendo o objeto e ainda descritores Fourier (derivados a partir do contorno do objeto). O classificador de morfotipo funciona de forma hierárquica, utilizando análise estrutural e classificação estatística para enquadrar cada objeto dentro de 11 morfotipos possíveis (Cocus, Espiral, Bastão curvo, Bastão em forma de “U”, Bastão regular, Filamento não-ramificado, Elipsóide, Taco, Prostecado, Bastão rudimentarmente ramificado e Filamento ramificado) (LIU et al., 2001). O programa fornece uma nova imagem pseudocolorida dos objetos de acordo com a classe que lhe foi atribuída e a listagem com a numeração e a classe da cada objeto.

Os resultados foram expressos em termos de representatividade percentual na amostra.

#### 3.2.4.3 Produção bacteriana

A produção bacteriana foi estimada a partir do método de incorporação de leucina radiomarcada com trício (L[4,5-<sup>3</sup>H] Leucina) e microcentrifugação (SIMON; AZAM, 1989; KIRCHMAN, 2001).

Foram adicionados 1700 µL de amostra para 11µL de solução de leucina (concentração final na amostra de aproximadamente 20 nmoles.L<sup>-1</sup>) em tubos para microcentrífuga tipo Eppendorf (2mL). O tempo de incubação foi de 30min em placas de banho-maria com água do local à temperatura ambiente (15-16°C). A interrupção da atividade bacteriana foi provocada pela adição de 89µL de Ácido Tricloroacético (TCA) dos tubos iniciais e posteriormente dos incubados. Estes foram acondicionados em refrigeração e escuro até análise.

A preparação para leitura das amostras se deu inicialmente pela centrifugação dos tubos a 14.000 rpm em três ciclos: I) sem adição de nenhuma solução, apenas para concentração das células, seguido de aspiração do líquido; II) adição de 1mL de TCA 5% ao pellet, seguido de aspiração do líquido; III) adição de 1mL de etanol 80% e aspiração do líquido. Os tubos foram então deixados abertos para evaporar a água dos pellets durante um período variável, em torno de uma semana dentro de refrigerador.

A leitura se deu em um cintilador (contador de partículas beta, LKB Wallac 1209) após a adição de 1mL de líquido de cintilação Optiphase HiSafe III (Wallac) a cada tubo (Wallac). A contagem em CPM (contagens por minuto) foi realizada por 180s duas vezes e a partir das médias de cada contagem (valor informado pelo próprio aparelho) foi calculada uma nova média, esta utilizada nos cálculos da produção, uma vez descontada a média do tubo inicial. Os valores em CPM foram corrigidos para DPM a partir da eficiência do aparelho utilizado (em torno de 94%).

Para os cálculos foram assumidos os seguintes valores:

- a) diluição isotópica intracelular igual a 2;
- b) 0,073 o percentual molar de leucina no pool protéico bacteriano;
- c) 0,86 a razão média carbono/proteína bacteriana;

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g.C.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

#### 3.2.4.4 Respiração Bacteriana

A respiração bacteriana foi determinada através do método de consumo de oxigênio em garrafas de Demanda Bioquímica de Oxigênio de ~100mL de capacidade. Utilizou-se a determinação espectrofotométrica do oxigênio dissolvido (ROLAND et al., 1999), modificação do método de Winkler descrito em Golterman et al. (1978). Nesta modificação, a cor amarelada resultante da adição dos reagentes sulfato manganoso, azida sódica e ácido sulfúrico concentrado é lida em espectrofotômetro na faixa de 430 nm e a absorbância é proporcional à quantidade de oxigênio da amostra. O método espectrofotométrico apresenta como vantagem uma maior precisão na determinação de variações pequenas na concentração de OD e uma maior eficiência analítica. A curva empírica estabelecida para os reagentes entre determinações titulométricas do método clássico (x) e a absorbância lida em espectrofotômetro (y) foi  $y = 0,1391 + 0,0336x$ , com  $R^2 = 0,9923$  e  $n = 28$ . A interferência da cor e

turbidez foi testada em laboratório sob variadas concentrações simuladas. A conversão entre oxigênio e carbono foi feita assumindo um fator de conversão molar igual a 1,0 ( $6CO_2 + 6H_2O = C_6H_{12}O_6 + 6O_2$ ), ou seja, para cada 12g de carbono produzido são consumidos 32g de oxigênio (DEL GIORGIO et al., 1997).

O isolamento da fração bacteriana foi feita através de filtração das amostras em papel quantitativo 95% celulose (MN 640d Macherey-Nagel) de retenção média 2,0 a 4,0  $\mu$ m. Mesmo na ausência de produtores primários, as amostras foram incubadas no escuro pelo recobrimento dos frascos com várias folhas de alumínio. A incubação foi feita *in situ*. Os frascos foram suspensos e homogeneamente distribuídos em um quadro de PVC de 1×1m, com cordões de aproximadamente 10cm de comprimento amarrados em torno dos gargalos dos frascos. O quadro foi ancorado em área de margem, aproximadamente 0,5m de profundidade. O tempo de incubação foi de 5 dias (120h). Este método só foi utilizado no capítulo 2.

#### 3.2.4.5 Eficiência de Crescimento Bacteriano (ECB)

A ECB foi calculada (no trabalho apresentado no capítulo 2) a partir das taxas de produção e respiração  $ECB = (PB)/(PB + RB)$  (DEL GIORGIO; COLE 1998), onde PB é a taxa de produção bacteriana e RB é a taxa de respiração bacteriana.

#### 2.2.4.6 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH – Fluorescent *in situ* Hybridization) é uma técnica molecular que utiliza oligonucleotídeos de DNA complementares à seqüências específicas de RNA ribossomal da subunidade 16S bacteriana.

Foram utilizados 6 sondas marcadas com o fluorocromo Cy3 (indocarbocianina fluorescente) para determinar a composição geral da assembléia bacteriana:

I) CN – Controle negativo [Cy3]5'-CCTAGTGACGCCGTCGAC-3' - seqüência não específica a nenhum grupo de bactérias, utilizado para avaliar a eficiência de hibridização;

II) EUB338 [Cy3]5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' - específica para o Dominio Bacteria;

III)  $\alpha$  968 [Cy3]5'-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3' - específica para a sub-classe alfa-Proteobacteria;



IV)  $\beta$  42a [Cy3]5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3' - específica para a sub-classe beta-Proteobacteria, acrescida do competidor  $\gamma$  42a não marcado 5'-GCCTTCCCACATCGTTT;

V)  $\gamma$  42a [Cy3]5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3' - específica para a sub-classe gama-Proteobacteria, acrescida do competidor  $\beta$  42a não marcado 5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3';

VI) CF319a [Cy3]5'-TGGTCCGTGTCTCAGTAC-3' – específica para o grupo *Cytophaga-Flavobacter*.

O método utilizado é descrito em Pernthaler et al. (2001) e Cottrell (2005):

As amostras foram pré-filtradas em papel quantitativo tarja azul (Mackerey-Nagel) de 2-4  $\mu$ m de retenção média para excluir interferentes nas contagens bacterianas por análise de imagens, da mesma forma que descrito na seção 3.2.4.1. Após a pré-filtração, foram filtrados 2mL de amostra em filtro de polycarbonato (GE) 0,2  $\mu$ m de porosidade e 25mm de diâmetro com auxílio de holder e seringa. Para uma distribuição mais homogênea das bactérias, foi adicionado 1mL de água Mili-Q para suspensão na amostra e filtro de fibra de vidro (Mackerey-Nagel) 0,7  $\mu$ m de retenção por trás do filtro de polycarbonato.

Os filtros foram colocados em placas de poços e cobertos com 1-2 mL de solução de paraformaldeído (PFA) 4% tamponado (pH aprox. 7,0) por no máximo 24 h em refrigerador. Os filtros que não foram imediatamente utilizados para hibridização foram estocados em tubos de PVC transparentes individuais também em refrigerador (segundo Glöckner et al., 1999, não há modificação aparente neste tipo de estocagem por vários meses). Alguns filtros que haviam sido fixados previamente com uma concentração de 2% de PFA foram posteriormente banhados com uma solução de 4%.

Para a hibridização, os filtros foram inicialmente cortados pela metade. Uma delas foi cortada em 6 pedaços – um para cada sonda, enquanto que a outra foi novamente estocada para uma eventual repetição. Os seis pedaços foram colocados em lâminas cobertas com parafilme. Nas lâminas, sobre cada pedaço foi adicionado 40 $\mu$ L da solução de hibridização (10  $\mu$ L embaixo e 30 $\mu$ L sobre o filtro): NaCl 0,9 M; Tris-HCl 20 mM pH 7.2; Formamida 35% (CF319a) e 30% (demais sondas); EDTA 5 mM; Dodecil Sulfato de Sódio 0,01% e 100 ng de oligonucleotídeo. Os filtros foram hibridizados por aproximadamente 24h em estufa bacteriológica (Biopar) a  $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Após a incubação, os pedaços de filtro foram colocados em placas de poços com solução de lavagem pré-aquecida (NaCl 80mM (CF319a) e 102mM (demais sondas); Tris-HCl 20 mM pH 7.2; EDTA 10 mM e Dodecil Sulfato de Sódio 0,01% por 15 min em estufa (Biopar) a  $48 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

Para a contagem de bactérias total, os pedaços foram transferidos para outras placas de poços e cada um coberto com 50-100  $\mu\text{L}$  de solução de DAPI (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por no mínimo 5 min. Os seis pedaços de cada filtro foram lavados com etanol 80% e então montados em lâminas, cobertos com 100  $\mu\text{L}$  de óleo de fixação (Nujol) e lamínula. As lâminas foram mantidas congeladas até análise.

Para as contagens foi utilizado o mesmo sistema de captura de imagens utilizado para a determinação da densidade (seção 3.2.4.2.3). Foram registrados 10 campos por cada pedaço de filtro, sendo capturadas duas imagens de cada campo, uma na banda de excitação UV (365/366nm) para visualização da contagem total (coloração DAPI) e outra na banda de excitação do fluorocromo Cy3. As imagens foram processadas de acordo com o protocolo de Massana et al. (1997) e foram eliminados objetos  $>2,0 \mu\text{m}$ . Aqueles menores que  $0,2 \mu\text{m}$  não foram excluídos, pois em muitos casos o sinal emitido pela sonda era muito fraco, que pode ser ocasionada pelo estado metabólico baixo das bactérias da amostra (BOUVIER; DEL GIORGIO, 2003); acrescenta-se a isto o fato do sítio de ligação do DAPI ser preferencialmente nos ácidos nucleicos - que subestima a real dimensão da bactéria (SUZUKI et al., 1993).

Os resultados foram expressos em percentagem da densidade estimada dos grupos. Considerou-se como *densidade total* as células coradas pelo DAPI; cada grupo (*alfa*, *beta*, *gama* e *CF*) pelas respectivas contagens das células marcadas nestas sondas. *Bacteria* aquelas células marcadas com a sonda universal EUB338 ou, no caso deste valor ser inferior à soma (*alfa+beta+gama+CF*), *outras Bacteria* foi considerado igual a zero e *Bacteria* foi igualada à esta soma. *outras Bacteria* foi calculado como a diferença *Bacteria* menos (*alfa+beta+gama+CF*); *não Bacteria* foi calculado como a diferença entre *densidade total* e *Bacteria*.

### 2.3. Normatização do texto

Os textos em português contemplados no capítulo introdutório, objetivos, material e métodos geral, apresentações dos capítulos e considerações finais foram padronizados nas normas da ABNT (GIUSTI, 2003). Os textos dos capítulos 1 e 2 foram escritos em forma de artigo de acordo com as regras de submissão do periódico Aquatic Ecology (ANEXO), de acordo com a padronização adotada pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRGS.

## 4. CAPÍTULO 1

### 4.1 Apresentação

O presente trabalho trata de questões de biogeografia bacteriana em um conjunto de lagos costeiros no Rio Grande do Sul, avaliando variáveis como tamanho e distância entre lagos. De forma complementar, busca fatores que possam estar mascarando padrões biogeográficos inesperados para a técnica utilizada para estimar diversidade, tais como o estado metabólico das células, por sua vez possivelmente relacionado a um mosaico de situações ecológicas intrínseca a cada lago.

# **Bacterioplankton diversity and functionality driven by geographic and local factors in coastal subtropical shallow lakes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Artigo redigido de acordo com as normas da revista Aquatic Ecology (ANEXO)

**Abstract** Bacterioplankton phylotypic distribution in 10 subtropical shallow lakes using Fluorescent in situ Hybridization (FISH) was assessed by biogeographic approach (testing for environmental heterogeneity, geographic distance and size similarity), what led to results in accordance with finer taxonomic resolution works. Since FISH may indicate physiological status of the cells, we sought metabolic drivers responsible for the unexpected results. Bacterial morphotype distribution adherence to the same factors was tested, once it is directly related to metabolic status of the assembly. Results showed that morphotypes were more important than phylotypes for the factors tested, including bacterial production. Macrophytes were responsible for an important part of this variation, indicating an effect on environmental heterogeneity and negative effect on phytoplankton production. Once smaller lakes present higher macrophytic coverage, and conversely lower phytoplankton biomass, our data set may harbor an intrinsic mosaic of metabolic situations for bacteria, that ultimately reflected in the bacterial diversity assessment employed.

**Key-words:** FISH; Bacterioplankton; coastal lakes; morphotypic diversity; macrophyte inhibition.

## 1. Introduction

Patterns in bacterial distribution are related to evolutionary background and ecological processes (Pommier et al. 2007), as opposed to the previous view that bacterioplankton is composed of few and cosmopolitan species (Fenchel and Finlay 2004). Complex multi-scale patterns are likely to occur, with physical effects predominating at broad spatial scales while biological effects at finer ones (Pinel-Alloul and Ghadouani 2007). Recent studies point out in the direction that smaller organisms tend to have less steep increments in diversity along an habitat size gradient when compared to larger organisms. This has been attributed to higher density and greater dispersal capability, which diminishes local extinction and allopatric speciation. This led to the early hypothesis that microorganisms were composed of few, cosmopolitan species. This statement has been rejected, but in part it has been confirmed that local diversity is a stronger component than global diversity for such microorganisms (Azovski 2002).

Bacterial diversity is itself still a controversial subject, since a solid and widely accepted species concept does not exist and consequently the modern molecular techniques available give incomparable results concerning taxonomic levels (Weisse 2006). Despite the fact that the applicability of such methods to assess diversity is still a matter of debate, the importance to relate diversity, even at coarse taxonomic resolution, and function in microbial world is needed (Bent et al. 2007; Danovaro and Pusceddu 2007).

Several techniques are nowadays available to assess bacterial diversity (Martiny et al. 2006). Among them, Fluorescent in situ Hybridization (FISH) is widely used to assess specific roles of microbes in biogeochemical cycles and food web dynamics (Bouvier and del Giorgio 2003). Although, these authors argue that FISH protocols may present differences in signal detectability due to cell physiological status or phylogenetic composition, the latter being affected by intrinsically different detection thresholds. Thus, FISH may provide important information on assembly physiology (Bouvier and del Giorgio 2003), and is therefore useful to assess whether patterns in bacterial metabolism could be affecting patterns in diversity assessed by this method.

More recently, bacterial diversity has been related to habitat size (Horner-Devine et al. 2004; Reche et al. 2005; Bell et al. 2005), and spatial distribution (Lindström and Leskinen 2002; Yannarell and Triplett 2004; Green and Bohannan 2006), and many of these works were done in lakes. Environmental heterogeneity, as a function of increasing geographic distance, has been recently strikingly linked to bacterial diversity in these systems (van der Gucht et al. 2007).

General understanding is that bacteria relates to its carbon source, namely algae, in many ways, with the potential of phytoplankton primary productivity to drive bacterial diversity patterns (Horner-Devine et al. 2003) and also synchronize bacteria to extrinsic factors (Kent et al. 2007). Therefore factors that affect phytoplankton have a high potential to ultimately affect bacteria at some extent. This turns to be specially relevant to works that deal with large scales, where expected differences in environmental heterogeneity leading to different conditions is likely to occur, originated either from structural differences in the habitats sampled (e.g. size) or spatial distribution of taxons, originated from geographic distance.

As a physiological response to variation in its carbon source (substrates availability), bacteria may exhibit changes in density, biomass, production and growth efficiency (Robarts et al. 1996; Huss and Wehr 2004; Kritzberg et al. 2005), and also structural changes in bacterial shapes (surface:volume ratios) of either individual cells (Steinberger et al. 2002) and/or shape distribution in the sample.

A few works have included morphotypic diversity in their scopes. These examples showed good agreement between molecular and morphophysiological approaches, in different situations including guano decomposition (Zdanowski et al. 2005) and bacterial community structure in bioreactors (Fernandez et al. 2000).

In effect, a study in Brazilian tropical reservoirs reported an increasing in coccus-like forms toward more eutrophic systems, fact that was associated with an “r strategy”, because of high density of these forms (Racy 2004). Still, this matter still demands further research effort, since 87% dominance by cocci morphology has been found in ultraoligotrophic areas (Robarts et al. 1996). Even though morphology has been long recognized as an inaccurate estimation of diversity (Weisse 2006), it may reflect important environmental features by their relative distribution in the bacterial assembly, namely metabolic driving forces. We were open to consider it as an useful tool to be compared to FISH results, as it also gives a frequency distribution for each sample and is also a measure of both diversity and metabolic status.

In the present work we evaluated in a set of ten subtropical shallow lakes the influence of geographic distance, lake size similarity and environmental similarity on bacterioplankton assemblies similarity assessed by FISH to assess whether there were detectable patterns in its distribution and also complementary assessed morphological diversity as a measure of assembly response to metabolic status. Our hypothesis is that FISH results, once dealing with coarse taxonomic resolution, will relate mainly to physiological status of the bacterial assembly. Given the broad spatial scale under study, it is expected that environmental heterogeneity plays a major role defining assembly metabolic prevailing condition.

## **2 Material and Methods**

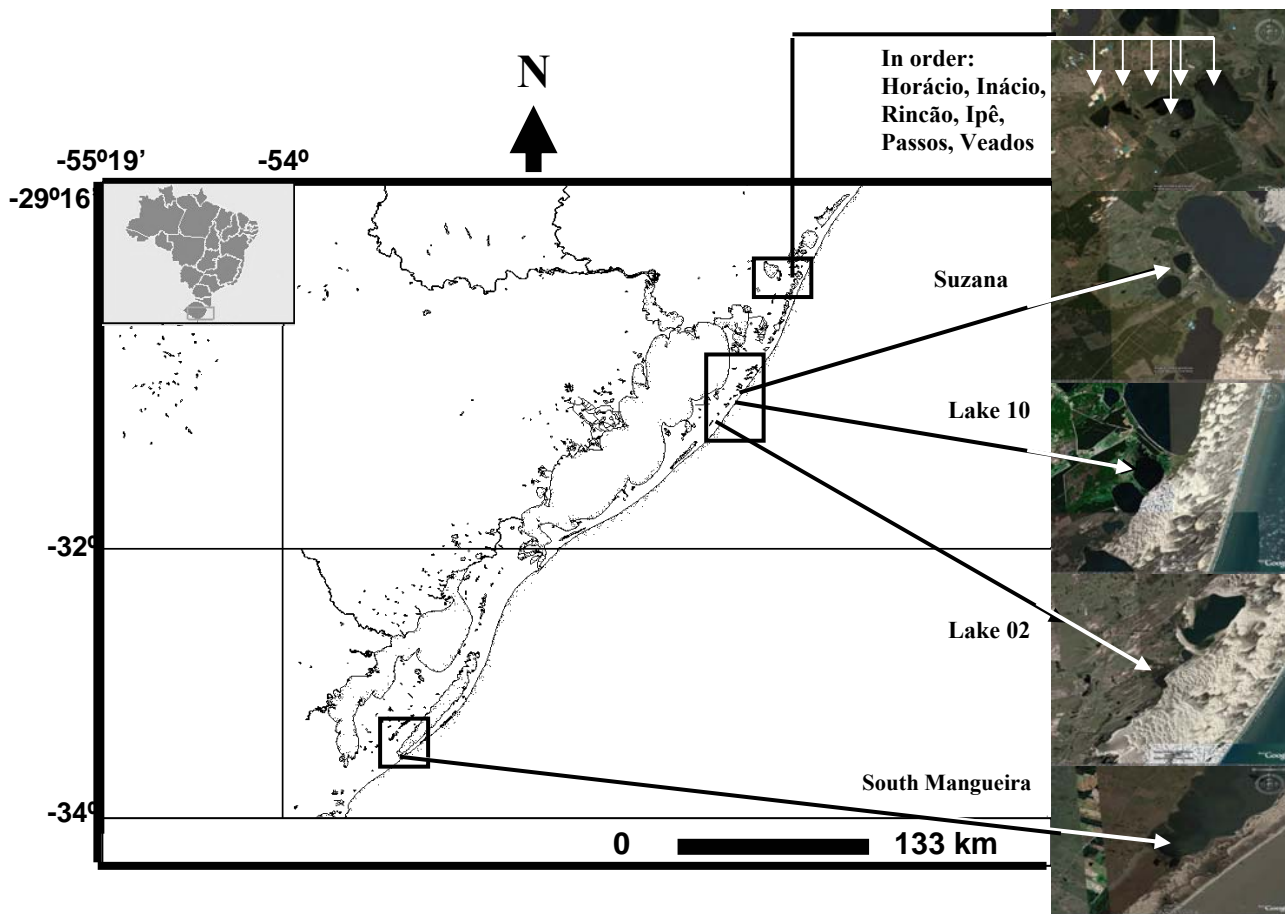
### **2.1 Study area**

The study area comprises the coastal plain of the Rio Grande do Sul state (Brazil). This area presents several lakes that were originated in the Quaternary as a result of a marine regression (Holz 1999). All these lakes are very shallow, the deepest reaching maximum depth at 11m (Schwarzbald and Schäfer 1984; Schäfer 1988).

We have sampled 10 lakes (Fig.1) in a gradient of size (13-80.800 ha) with a scale of distance between lakes ranging from ~1Km until ~ 490Km. This range included small (0-10Km) to intermediate (10-3000 Km) scales of geographic distance, according to Martiny et al. (2006).

Each lake was sampled in two sampling points: centroid of the lake (pelagic zone) and margin (littoral zone). Of the 10 lakes set, Mangueira lake surface water samples were sampled in later October 2007. The other nine lakes were sampled with a PVC pipe that was used to integrate the water column until ~10cm of the sediment. The sampling was carried from January to May 2007.





**Fig. 1** Lake set sampled in the coastal plain of Rio Grande do Sul state (Brazil): Horácio (58ha), Inácio (30ha), Rincão (60ha), Ipê (13ha), Passos (69ha), Veados (222ha), Suzana (97ha), Lake 10 (192ha), Lake 02 (36ha) and Mangueira Lake (80800ha). Sources: modified from IBGE (2005) and Google Earth (2008)

## 2.2 Variables

### 2.2.1 Bacterial resources

Nutrients were determined through colorimetric methods: Total Nitrogen (TN), Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), Total Phosphorus (TP) and Soluble Reactive Phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) following Mackereth et al. (1989). Chlorophyll a (Chla) was quantified after cold ethanol extraction (Jespersen and Christoffersen 1987) and the Carbon series was determined in Carbon Analyzer (Shimadzu Vcph 5000). Dissolved Organic Carbon (DOC) was accounted as the fraction that passed through a 450 °C pre-combusted glass fiber filter (Macherey-Nagel GF6 - 0,6 $\mu\text{m}$  average mesh size) and Total Organic Carbon (TOC) was the unfiltered sample.

For phytoplankton biomass, 20 L were concentrated in a 20 µm mesh sieve and fixed in formaldehyde solution (4% vol:vol). Samples were stored in dark and room temperature until analysis. In Sedwick-Rafter chambers (APHA 1999), at least 20 individuals (when possible) from each species were measured and their biovolume determined (Sun and Liu 2003; Hillebrand et al. 1999). Fresh biomass ( $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1} = \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was estimated multiplying biovolume by density of each taxon. Fresh biomass was then converted in carbon biomass by empirical conversion factors (Wetzel and Likens 2000).

Aquatic macrophyte coverage (%) was calculated separately for macrophyte type. For emergent and floating macrophytes, it was visually estimated by coverage classes in  $1\text{m}^2$  square quadrats (Braun-Blanquet 1964). Submersed aquatic macrophyte coverage was estimated by the Percentual of Volume Infested (PVI) method, which employs the multiplication of the estimated visual coverage of a plant stand by its length and then division by the local water depth (Canfield 1984).

### 2.2.2 Bacterial predators

Total ciliate density was determined through whole sample counting in sedimentation chambers under inverted microscope (Olympus IX70) at 400x magnification.

For Mangueira Lake, 2L of water lake was concentrated in a 20µm mesh size sieve in 50mL samples for carrying and storage. For the other nine lakes, 50mL of the water lake was collected. All samples were fixed with lugol (9:1 vol:vol) and stored in dark under refrigeration until analysis.

### 2.2.3 Physical and chemical variables

Total Suspended Solids was determined gravimetrically following APHA (1999). Water colour (Col), turbidity (Turb) and Humic Substances (HS) ratio were determined as the absorbance at 430, 750 and the ratio between 250 and 365nm, respectively, in a 1cm quartz cuvette and spectrophotometer (Varian Cary 1-E).

Alkalinity (Alk) Gran titration method was calculated as described in Wetzel and Likens (2000).

Silicate was also assessed through a photometric method (Si Merck Spectroquant® kit for silicates - silicilic acid).

#### 2.2.4 Bacterial diversity

To assess bacterioplankton assemblies diversity, the technique of Fluorescent in situ hybridization (FISH) was employed. The following six oligonucleotide probes (UNISCIENCE) complementary to a region of the 16S rRNA were used: Eub338R – domain Bacteria with its sub-groups: Alf968 –  $\alpha$ -proteobacteria; Bet42a –  $\beta$ -proteobacteria; Gam42a –  $\gamma$ -proteobacteria; CF319a-*Cytophaga-Flavobacter* and also a negative control non-complementary to any bacterial group (Glöckner et al. 1999).

The samples were pre-filtered in quantitative paper (MN 640d Macherey-Nagel – average retention size of 2,0 to 4,0  $\mu\text{m}$ ) in order to exclude other organisms than bacteria. Of the pre-filtered samples, 2mL was filtered on 0,2 $\mu\text{m}$  polycarbonate membranes (GE) under low pressure (<5,0 kPa). The filters were fixed under immersion in a 4% paraformaldehyde phosphate-buffer pH 7,2 solution (max. 24h) and stocked frozen at -15°C until hybridization. For the hybridization the filters were cut in two halves and one of the halves was then divided in six parts, each being hybridized (for 24hs at 46 °C) with 40  $\mu\text{L}$  of one of each probe hybridization solution (NaCl 0,9 M; Tris-HCl 20 mM pH 7.2; Formamide 35% (CF319a) and 30% (other probes); EDTA 5 mM; Sodium Dodecyl Sulfate 0,01% and 100 ng of oligonucleotide). For total cell counts DAPI stain was used (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Once slides were prepared, they were processed within a week (Pernthaler et al. 2001). For cell counting we used an image grab system: a refrigerated camera (MOTIC 5000) coupled to an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX70). Image capture (MOTIC Image 3.2) and processing followed Massana et al. (1997) with the help of the Freeware Image Tool (v.1.27). A total of 10 fields per probe were processed in each filter, resulting in a total of 120 images (60 total DAPI counts and 60 labeled cells counts) per filter. Autotrophic cells, although practically never present, were discounted whenever detected. Group targeted density was calculated as the average of the mean countings of each probe labeled cells per field subtracted from the negative control and according to Kepner and Pratt (1994) cell density equation.

Data presentation and computations assumed phylotypic density assessed for  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria,  $\gamma$ -proteobacteria and *Cytophaga Flavobacter* by specific probes. Other Bacteria was computed as EUB338 probe labeled cells (total Bacteria density) minus the sum ( $\alpha + \beta + \gamma$ -proteobacteria and *Cytophaga Flavobacter*). When this sum was higher than EUB338 density, other Bacteria was considered equal to zero. Undetermined groups was computed as total DAPI counts (unspecific stain, total density) minus EUB338 counts or the sum ( $\alpha + \beta + \gamma$ -*Proteobacteria* and

*Cytophaga Flavobacter*), whichever the highest. All probe counts were discounted from negative control (incompatible to any bacterial group).

For morphotypes, samples were fixed in 4% formaldehyde in polyethylene bottles in the field and stored in the dark and refrigerated until analysis. In the laboratory, samples were pre-filtered as described for the FISH protocol (above), and 2mL of each sample was filtered (<5,0 kPa) in a Vacuum Manifold Filtration Tower (Millipore) with 1mL of pre-filtered (0,2µm) Mili-Q water to improve cell dispersion. Cells were concentrated in 0,2µm black polycarbonate membranes (GE). Approximately 1mL of a 10% (weight:vol) acridine orange stain was added to the filters for 5 minutes. They were then washed with 0,2 µm filtered Mili-Q water and air dried. Filters were mounted in slides with mineral oil (Nujol), being processed within 3 days because of quickly faint of acridine. A total of 10 images were captured per filter and image processing was carried on six of them. Image processing and capture system was the same for FISH, described above. Once the images were processed and binarized, they were submitted to CMEIAS software (Liu et al. 2001) for morphotype classification. This program consists of a series of plug-ins for Image Tool (1.27) and utilizes multiple measures of each object, working hierarchically through statistical classification of 11 possible morphotypes (Coccus, Spiral, Curved Rod, U-Shaped Rod, Regular Rod, Unbranched Rod, Ellipsoid, Club, Prosthecate, Rudimentary Branched Rod and Branched Filament).

#### 2.2.5 Bacterial biomass and production

Bacterial biomass determination was a following step after morphotype determination, as the equations employed were based on morphotypic discrimination. Area and perimeter of each object was taken using CMEIAS (Liu et al. 2001). These were further employed in specific calculations following Massana et al. (1997), that applies one equation for coccus-like forms and other for the others. Biovolume derived from these formulas ( $\mu\text{m}^{-3}$ ) was then converted to carbon by the conversion factor ( $C = 0,09 \times \text{biovolume}^{0,9}$  (Norland 1993), which results in pgC content of each cell. The average cell carbon content per cell of the sample is calculated as the average of the averages of the six images analyzed (each image average calculated from all cells present). At last this carbon content per cell is multiplied by the density (Kepner and Pratt 1994) of the sample, resulting in the bacterial carbon concentration of the sample ( $\text{pgC.mL}^{-1}$ ), accounted as bacterial biomass.

Bacterial production was estimated through the method of (L[4,5-<sup>3</sup>H] radiolabeled leucine and microcentrifugation (Simon and Azam 1992; Kirchman 2001). We added 11µL of leucine solution

(approximately  $20 \text{ nmoles.L}^{-1}$ , specific activity of  $65\text{Ci.mmol}^{-1}$ ) to  $1700 \mu\text{L}$  of sample in Eppendorf vials ( $2\text{mL}$ ). An initial vial was interrupted at the beginning and two or three replicates for each sample were incubated for  $30\text{min}$  with lake water at room temperature ( $15\text{-}16 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Interruption of bacterial activity was achieved with the addition of  $89\mu\text{L}$  of trichloroacetic acid (TCA) concentrated. The vials were then stored in the dark and under refrigeration until centrifugation. Samples were centrifuged three times (cell concentrate, +TCA 5%, +Ethanol 80%) and let to dry out for approximately one week inside of the fridge. For beta-particles counting,  $1\text{mL}$  of scintillation liquid (Optiphase HiSafe III Wallac) was added to each vial. Reading was carried (LKB Wallac 1209 Rack beta Liquid Scintillation Counter) during  $180\text{s}$  twice. For calculations, we assumed intracellular isotopic dilution to be equal to 2, the molar percentual of leucine in the proteic pool equal to  $0,073$  and the ratio carbon:protein to be  $0,86$ . Results were handled in  $\mu\text{g.C.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Simon and Azam 1992; Kirchman 2001).

### 2.2.6 Statistical approach

Our biogeographic approach followed the recommendations of Martiny et al. (2006) and the analysis of Del'Duca (2007).

For the overall analysis, four matrices of similarity between every possible pair of sampling points (comparisons between littoral zones, pelagic zones and between littoral and pelagic zones) were used: (1) bacterial assemblies similarity, using Morisita-Horn index on group abundance (phylotypes, assessed by FISH) data  $\log(x+1)$  transformed; (2) bacterial morphotype similarity, computed also as Morisita-Horn index on percentage data; (3) environmental similarity (TSS, Silicon, TN, TP, Alkalinity, Chlorophyll-a, DOC, TOC, Water Colour, Water Turbidity, HS ratio, Ciliate density and the mmol:mmol ratios between  $\text{DOC:PO}_4^{-3}$ ,  $\text{DOC:NO}_3^-$ ,  $\text{DOC:TOC}$ ,  $\text{TN:TP}$ ,  $\text{TOC:TN}$  and Bacterial biomass relative to phytoplankton (B:P Biomass ratio), calculated as  $\{1 - (\text{standardized Euclidean distance})\}$ , and (4) size similarity between lakes, measured as  $\{1 - (\text{standardized Manhattan distance})\}$ . Standardization for Euclidean distance was based on total, while for Manhattan distance it was by range, in order to obtain similarity indexes between 0 and 1. A fourth matrix included geographic distances between sampling points (in km).  $\text{DOC:PO}_4$  and  $\text{DOC:NO}_3$  are considered as measures of proportion of organic to inorganic nutrients in the system, which is assumed to decrease along trophic gradients (Cotner and Biddanda 2002). We also included  $\text{TOC:TN}$ ;  $\text{TN:TP}$ , which refer to the classical Redfield ratio;  $\text{DOC:TOC}$  estimates the ratio of dissolved to total organic in the system, which is assumed to positively favor bacterioplankton (Cotner and

Biddanda 2002) and Bacterial to Phytoplankton carbon biomass was used as an approximation of the dependence of bacteria on primary production, which is higher in oligotrophic systems, where this index tends to be higher (Cotner and Biddanda 2002; del Giorgio et al. 1997). Complementary analysis were further carried with exclusion of comparisons between margin and pelagic zones and the isolated effect of these two putative habitats was evaluated.

Additionally, we tested also the eighteen environmental variables individually by the same method. Each of them generated a resemblance matrix for the ten lakes data set and this eighteen matrices replaced the overall environmental matrix and the association between these matrices and FISH and morphotype matrices was evaluated the same manner as for the first analysis.

Two effects of macrophyte coverage type on bacterioplankton were evaluated: I) indirect, through a possible primary influence on phytoplankton biomass, and II) directly on percentage of bacterial detected cells, with an additional assessment of phytoplankton biomass itself also as predictor variable for this bacterial measure.

Since we were trying to understand if the diversity estimated through FISH was related to a specific pattern of metabolism or if the metabolic status of the cells driven by environmental factors was diversity estimates biased, we tested bacterial production as independent variable against assembly and morphotype similarity and then as dependent variable against lake size similarity and geographic distance. We also isolated pelagic and margins zones in the analysis.

For data association, we used Linear Regression between matrices (Mantel test). Computations were performed in FitoPacShell (v. 1.6.4.25) – Morisita-Horn similarity matrices, Multiv (v.2.3.10) – Euclidean Distance matrices, R (v. 2.6.0) and Origin (v. 6.0) Linear Regressions and graphic presentation, respectively.

### **3 Results**

#### **3.1 Main limnological variables**

TN, TP, TSS, DOC, TOC and water colour showed apparent relative homogeneity with lake size. Alkalinity, pH, turbidity and humic substances (lower HS ratio) were higher in the largest lake. Chlorophyll a had the opposite trend, with lowest values in Mangueira lake (Table 1).

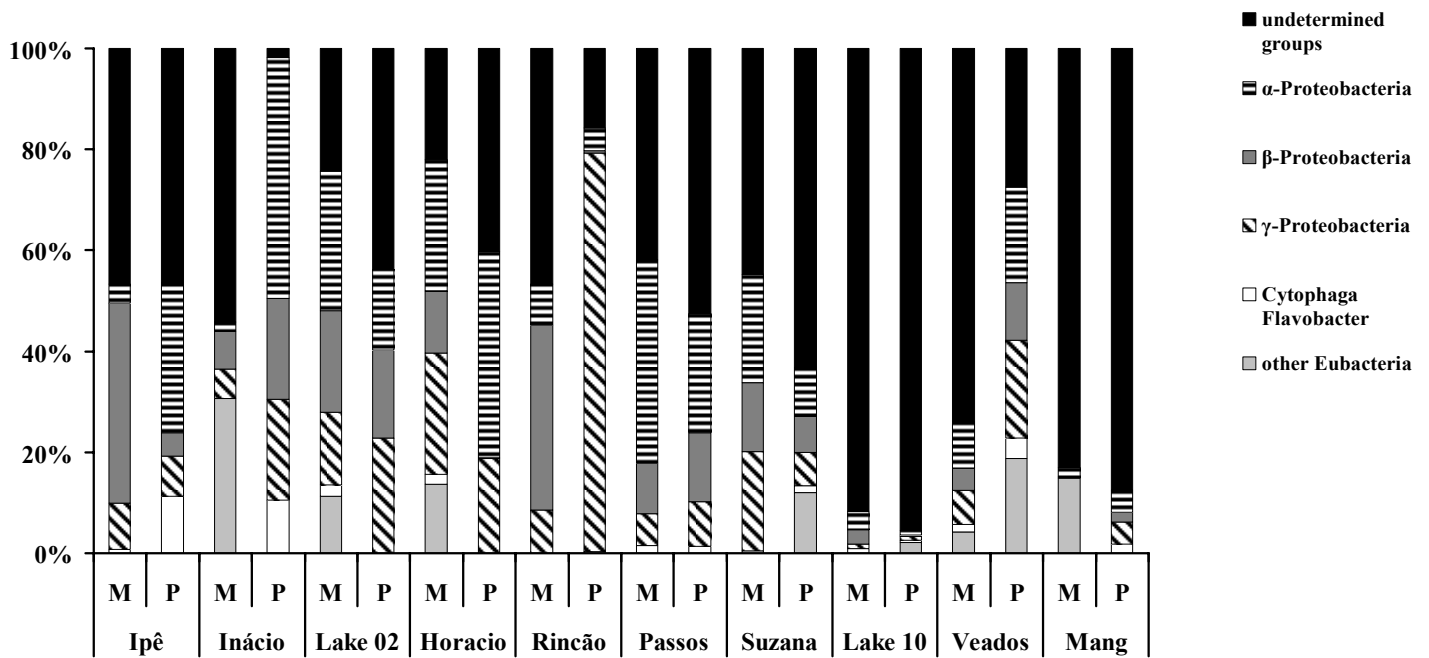
**Table 1** Main limnological variables for the 10 lakes data set sampled from January to October 2007.

Lake	SP	Location	Area	TSS	TN	TP	pH	Alk.	Chla	DOC	TOC	Col	Turb	HS Ratio
			(ha)	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )		(μEq.L <sup>-1</sup> )	(μg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )	430 nm	750 nm	250/365 nm
Ipê	M	29°55'17" S	13	10,40	0,83	0,11	7,5	472	23,19	8,8	10,3	0,034	0,002	4,58
	P	50°11'55" W		8,80	0,31	0,04	7,5	335	19,48	15,3	11,2	0,035	0,002	4,60
Inácio	M	29°54'33" S	30	4,00	0,51	0,04	7,3	250	4,39	6,0	7,6	0,024	0,001	4,74
	P	50°13'21" W		3,60	0,28	0,07	6,9	269	3,86	6,6	5,7	0,025	0,001	4,64
Lake 02	M	30°33'08" S	36	4,00	0,45	0,00	6,5	800	3,25	16,3	6,1	0,033	0,003	4,14
	P	50°25'60" W		4,80	0,33	0,05	7,4	800	1,78	6,1	5,9	0,034	0,003	4,19
Horácio	M	29°54'47" S	58	3,00	0,09	0,04	7,0	246	1,83	5,8	6,0	0,019	0,001	4,83
	P	50°13'59" W		1,33	0,09	0,04	7,0	277	1,54	5,5	6,4	0,020	0,001	4,69
Rincão	M	29°54'37" S	60	1,40	0,55	0,05	7,4	202	3,11	6,9	7,9	0,032	0,001	4,68
	P	50°11'37" W		2,00	0,40	0,01	7,4	225	3,08	6,0	8,6	0,029	0,001	4,82
Passos	M	29°54'29" S	69	5,60	0,13	0,04	6,7	228	3,50	7,8	7,2	0,038	0,003	4,46
	P	50°12'37" W		4,00	0,11	0,04	7,3	222	2,58	6,9	8,0	0,035	0,002	4,52
Suzana	M	30°09'57" S	97	2,33	0,14	0,02	7,3	250	3,66	10,3	8,0	0,039	0,004	4,61
	P	50°16'53" W		5,33	0,13	0,06	7,4	252	3,01	10,3	7,8	0,039	0,004	4,59
Lake 10	M	30°24'44" S	192	4,67	0,18	0,04	7,6	273	6,93	6,1	7,4	0,035	0,006	4,23
	P	50°21'43" W		5,67	0,18	0,05	7,5	320	5,77	5,9	7,3	0,033	0,005	4,27
Veados	M	29°54'21" S	222	1,00	0,29	0,02	6,8	193	2,06	11,3	11,4	0,015	0,000	5,42
	P	50°10'30" W		1,67	0,32	0,06	6,7	99	1,64	7,1	13,0	0,018	0,001	5,18
Mangueira	M	33°31'22" S	80.800	0,11	0,64	0,02	7,6	797	0,06	12,5	8,5	0,035	0,004	0,80
	P	53°07'48" W		0,15	0,74	0,04	8,1	1517	0,26	10,8	6,2	0,019	0,010	1,02

SP, Sampling Point; M, Margin; P, Pelagic; TSS, Total Suspended Solids; TN, Total Nitrogen; TP, Total Phosphorus; Alk, Alkalinity; Chla, Chlorophyll a; DOC, Dissolved Organic Carbon; TOC, Total Organic Carbon; Col, Water Colour; Turb, Turbidity and HS Ratio, Humic Substances Ratio

### 3.2 Phylotype and Morphotype descriptive data

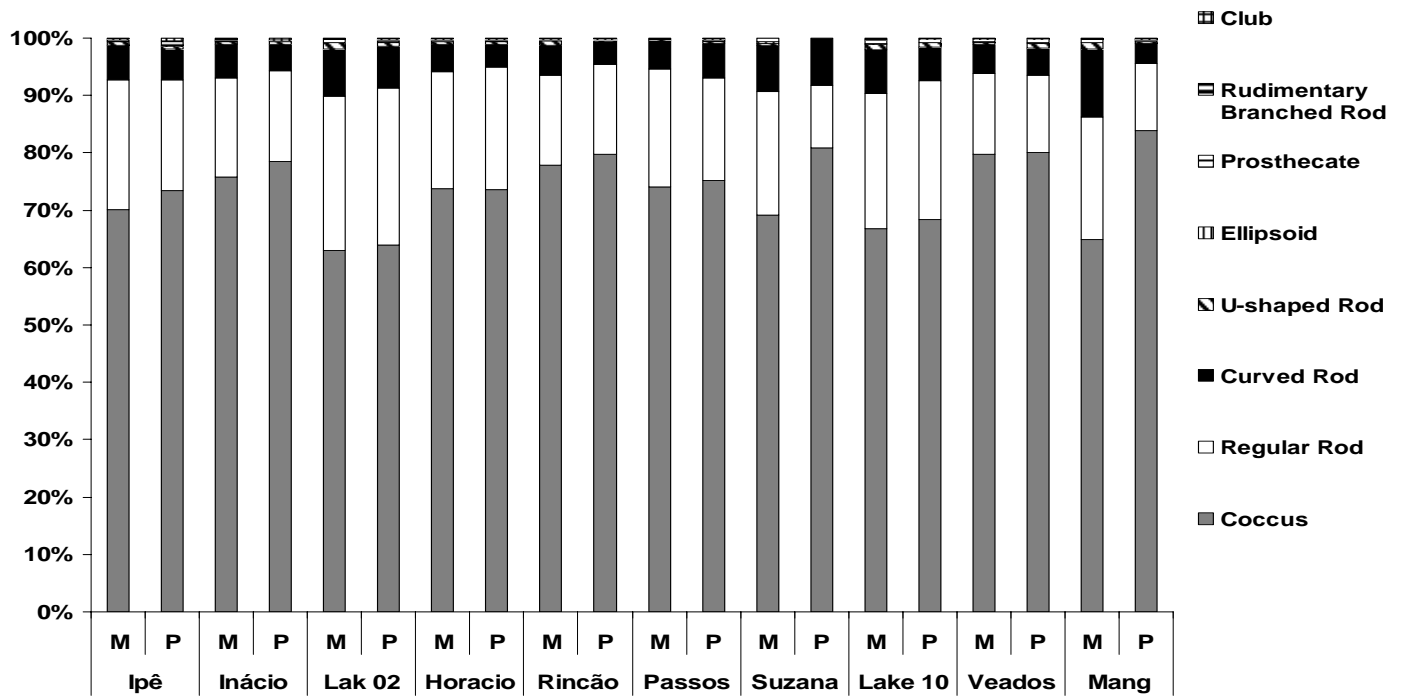
Phylotype results showed no evident pattern associated either to lake size or area (margin and pelagic zone). Some lakes (Lake 02, Passos, Lake 10) had a relatively similar pattern between areas, while in the others the resemblance was lower. Percentage of Bacteria detected was very variable, with mean of 50% and ranging from 4,5% (Lake 10, P) to 98% (Lake Inácio, P) (Fig. 2).



**Fig.2** Contribution of major phylotypic groups to the bacterial assembly composition in 10 coastal subtropical shallow lakes (Margin and Pelagic zones). Lakes ordered in crescent area. Percentage from group density data

Morphotype contribution of major shapes, however, had little variability and striking resemblance between margin and pelagic areas, except for lakes Mangueira and Lake 10, where this resemblance was lower. Cocci comprised always >60% of the shapes and along with Regular Rods and Curved Rods represented always >99% of the cells (Fig. 3).



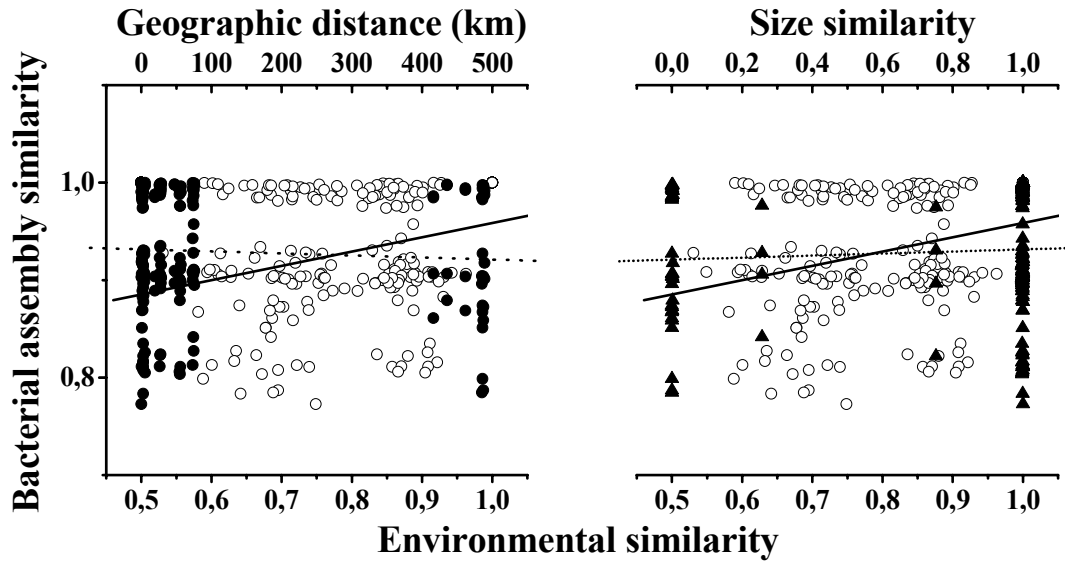


**Fig 3** Percentage contribution of the eight morphotype classes found in the 10 coastal shallow lakes (margin and pelagic zones). Lakes ordered in crescent area. Mang, Mangueira Lake; M, Margin; P, Pelagic zone

### 3.3 Biogeographic approach

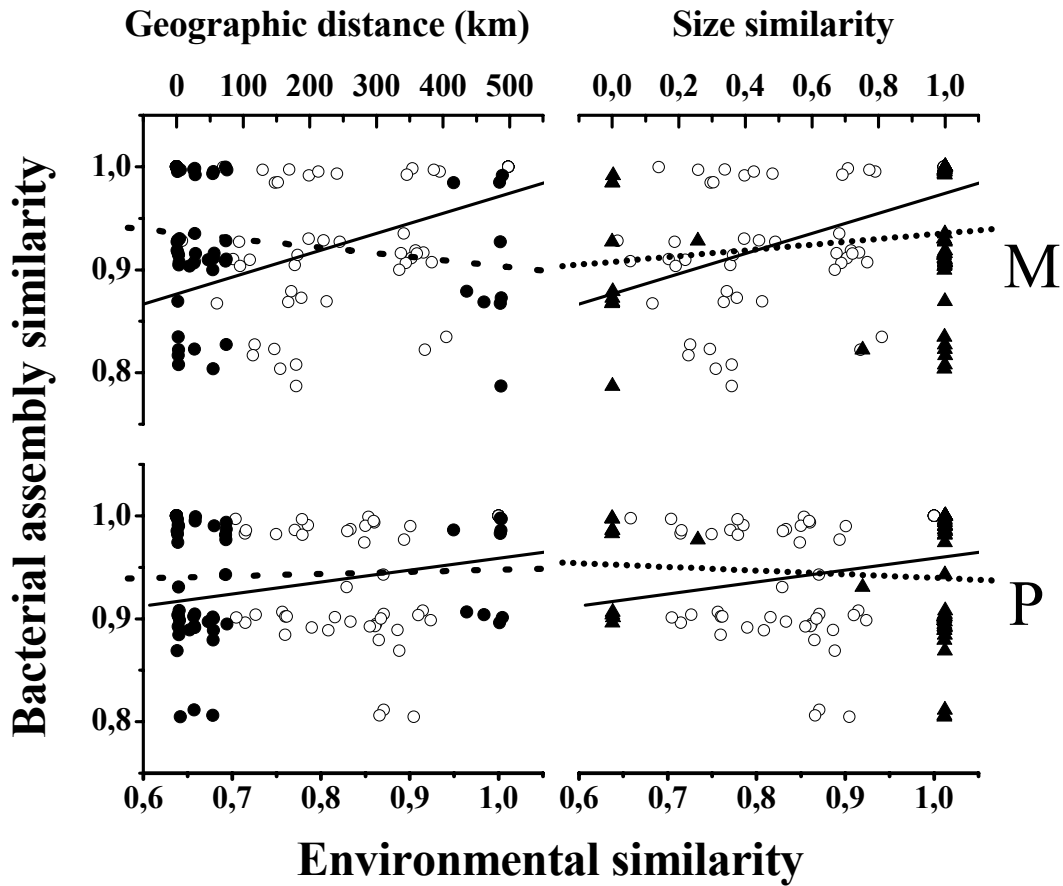
#### 3.3.1 Bacterial assembly similarity

Overall data showed dependence of bacterial assemblies similarity assessed by FISH on environmental similarity ( $R^2=0,27$   $n= 210$   $y =0,81+0,03x$   $p <0,0001$ ), but no pattern in the former was found related to increasing geographic distance or lake size similarity ( $R^2= -0,06$   $n= 210$   $y =0,93-2,08 \times 10^{-5}x$   $p =0,41$  and  $R^2=0,06$   $n= 210$   $y =0,92+0,01x$   $p =0,35$ , respectively) (Fig. 4).



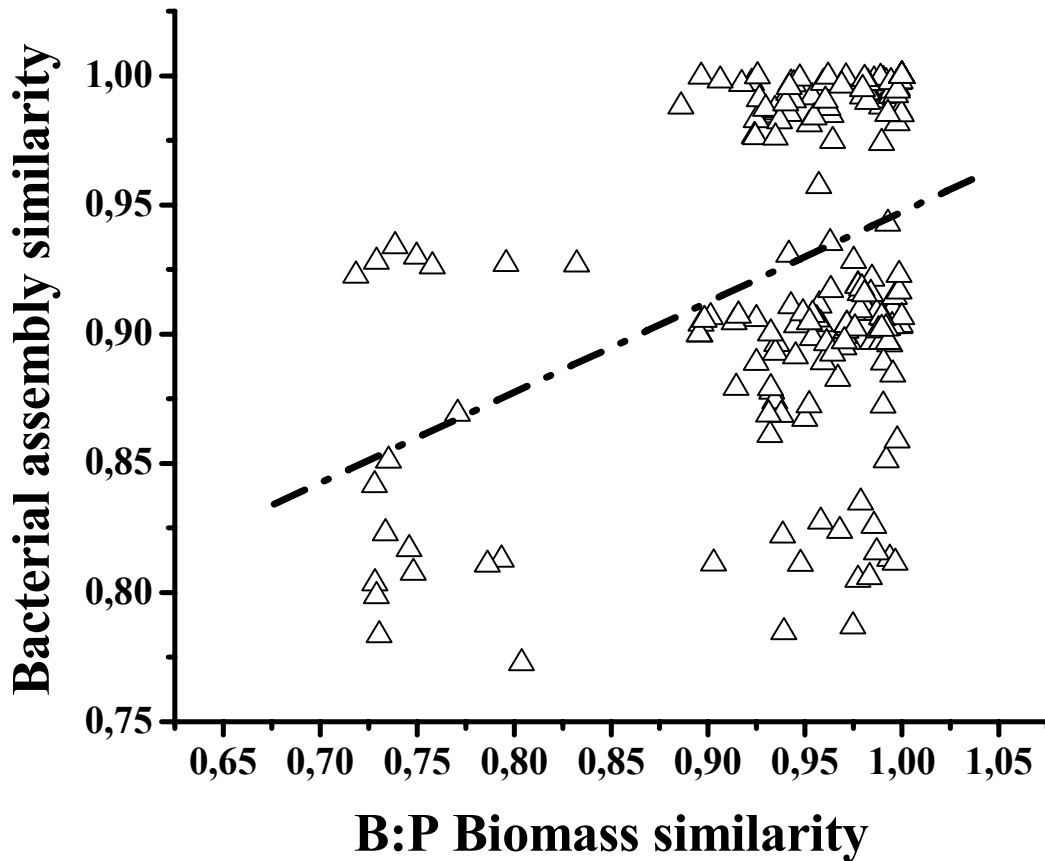
**Fig. 4** All possible comparisons for the ten lakes data set. Bacterial assembles similarity plotted against environmental similarity (in both sides: open circles, solid line), geographic distance (left side: solid circles, dashed line) and size similarity (right side: solid triangles, pointed line)

When the data was analyzed for margin and pelagic zones separately, geographic distance arised then as an important factor for margins habitats only ( $R^2 = -0,17$   $n = 55$   $y = 0,93 - 0,03x$   $p < 0,0001$ ), besides influence of environmental similarity ( $R^2 = 0,45$   $n = 55$   $y = 0,77 + 0,20x$   $p < 0,001$ ) and again no association with lake size ( $R^2 = 0,17$   $n = 55$   $y = 0,905 + 0,029x$   $p = 0,206$ ). Assemblies similarity in pelagic zones did not show association with any factor (environmental similarity:  $R^2 = 0,19$   $n = 55$   $y = 0,84 + 0,12x$   $p = 0,16$ ; geographic distance:  $R^2 = 0,04$   $n = 55$   $y = 0,94 + 1,0 \times 10^{-5}x$   $p = 0,74$  and lake size similarity:  $R^2 = -0,08$   $n = 55$   $y = 0,95 + 0,013x$   $p = 0,52$ ). At first view, margins appear to account for the dependence of the lakes on environmental similarity and geographic distance (Fig. 5).



**Fig. 5** Comparisons only between margin (M, top) and pelagic zones (P, down) for the ten lakes set. Margins: bacterial assembly similarity plotted against environmental similarity (top, both sides: open circles, solid line), geographic distance (top, left side: solid circles, dashed line) and size similarity (top, right side: solid triangles, pointed line). Pelagic: bacterial assembly similarity plotted against environmental similarity (down, both sides: open circles, solid line), geographic distance (down, left side: solid circles, dashed line) and size similarity (down, right side: solid triangles, pointed line)

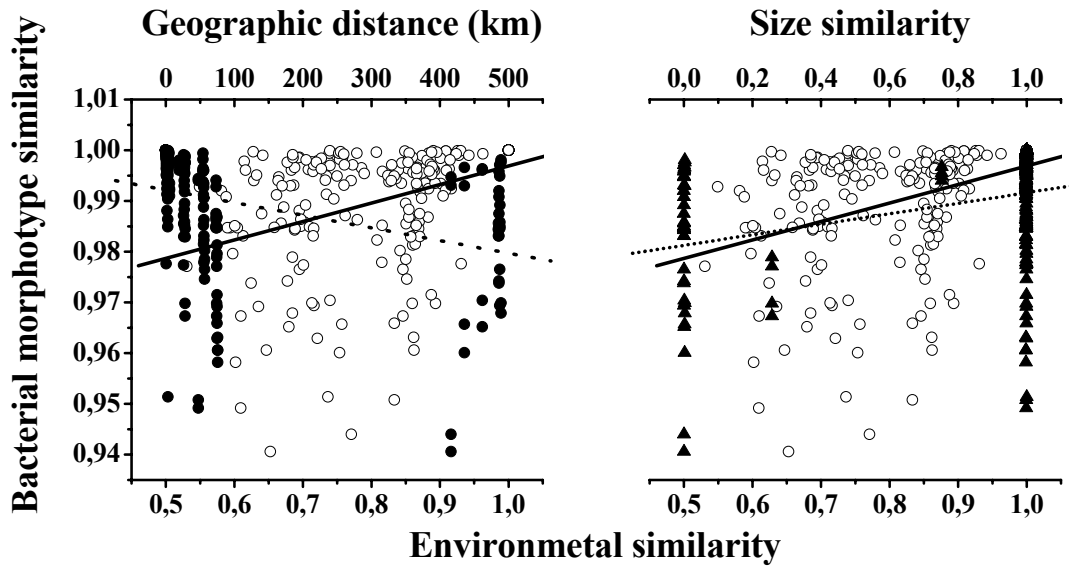
Once environmental similarity measured through the eighteen variables described above was highly relevant, we tested individual association of each of these variables in order to identify major predictors for assembly similarity detected. The only variable that we found to be directly related to the assembly similarity reported was the B:P biomass ratio ( $R^2 = 0,38$   $n = 210$   $y = 0,60 + 0,35x$   $p < 0,001$ ) (Fig. 6).



**Fig. 6** Bacterial assembly similarity against the ratio between B (Bacterial) and P (Phytoplankton) biomass (mmol:mmol carbon) for all possible comparisons for the ten lakes set under study

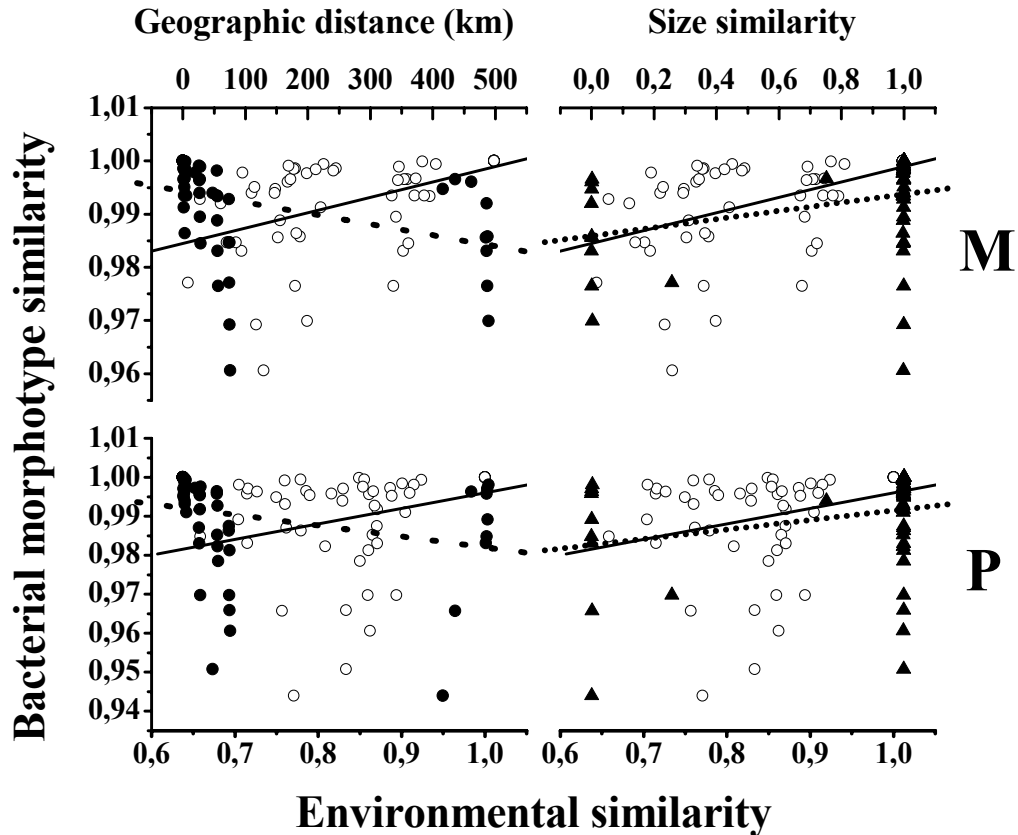
### 3.3.2 Bacterial morphotype similarity

Bacterial morphotype similarity was equally related to environmental similarity, but presented also a relationship with geographic distance and lake size similarity (environmental similarity:  $R^2=0,35$   $n= 210$   $y =0,96+0,01x$   $p <0,0001$ ; geographic distance:  $R^2= -0,35$   $n= 210$   $y =0,99-2,49 \times 10^{-5}x$   $p <0,0001$  and lake size similarity:  $R^2=0,32$   $n= 210$   $y =0,98+0,001x$   $p <0,0001$ ) (Fig. 7).



**Fig. 7** All possible comparisons for the ten lakes data set. Bacterial morphotype similarity plotted against environmental similarity (in both sides: open circles, solid line), geographic distance (left side: solid circles, dashed line) and size similarity (right side: solid triangles, pointed line)

For margin and pelagic zones data separately, morphotype similarity in margins showed also a relationship with lake size ( $R^2=0,32$   $n= 55$   $y =0,986+0,0078x$   $p =0,015$ ) in comparison to assembly similarity, besides association with environmental similarity ( $R^2=0,47$   $n= 55$   $y =0,97+0,03x$   $p <0,001$ ) and geographic distance ( $R^2= -0,38$   $n= 55$   $y =0,99-2,0 \times 10^{-5}x$   $p =0,0038$ ). For pelagic area, all associations were significant with environmental similarity ( $R^2=0,28$   $n =55$   $y =0,95+0,04x$   $p =0,035$ ), geographic distance ( $R^2= -0,27$   $n= 55$   $y =0,99-2,0 \times 10^{-5}x$   $p =0,045$ ) and the least significant was with lake size ( $R^2=0,27$   $n= 55$   $y =0,98+0,009x$   $p =0,049$ ) (Fig. 8).



**Fig. 8** Comparisons only between margins (M, top) and pelagic zones (P, down) for the ten lakes data set. Margins: bacterial morphotype similarity plotted against environmental similarity (top, both sides: open circles, solid line), geographic distance (top, left side: solid circles, dashed line) and size similarity (top, right side: solid triangles, pointed line). Pelagic zones: bacterial morphotype similarity plotted against environmental similarity (down, both sides: open circles, solid line), geographic distance (down, left side: solid circles, dashed line) and size similarity (down, right side: solid triangles, pointed line)

Also as carried for assembly similarity, environmental variables were analyzed individually, and six environmental variables related significantly to morphotype similarity: Alk ( $R^2 = 0,47$   $n = 210$   $y = 0,86 + 0,13x$   $p < 0,0001$ ), Col ( $R^2 = 0,26$   $n = 210$   $y = 0,72 + 0,28x$   $p < 0,001$ ), HS ( $R^2 = 0,35$   $n = 210$   $y = 0,71 + 0,28x$   $p < 0,0001$ ), DOC/TOC ratio ( $R^2 = 0,37$   $n = 210$   $y = 0,78 + 0,21x$   $p < 0,0001$ ), DOC/NO-3 ratio ( $R^2 = 0,36$   $n = 210$   $y = 0,88 + 0,11x$   $p < 0,0001$ ) and N/P ratio ( $R^2 = 0,34$   $n = 210$   $y = 0,95 + 0,04x$   $p < 0,0001$ ) (Fig. 9).

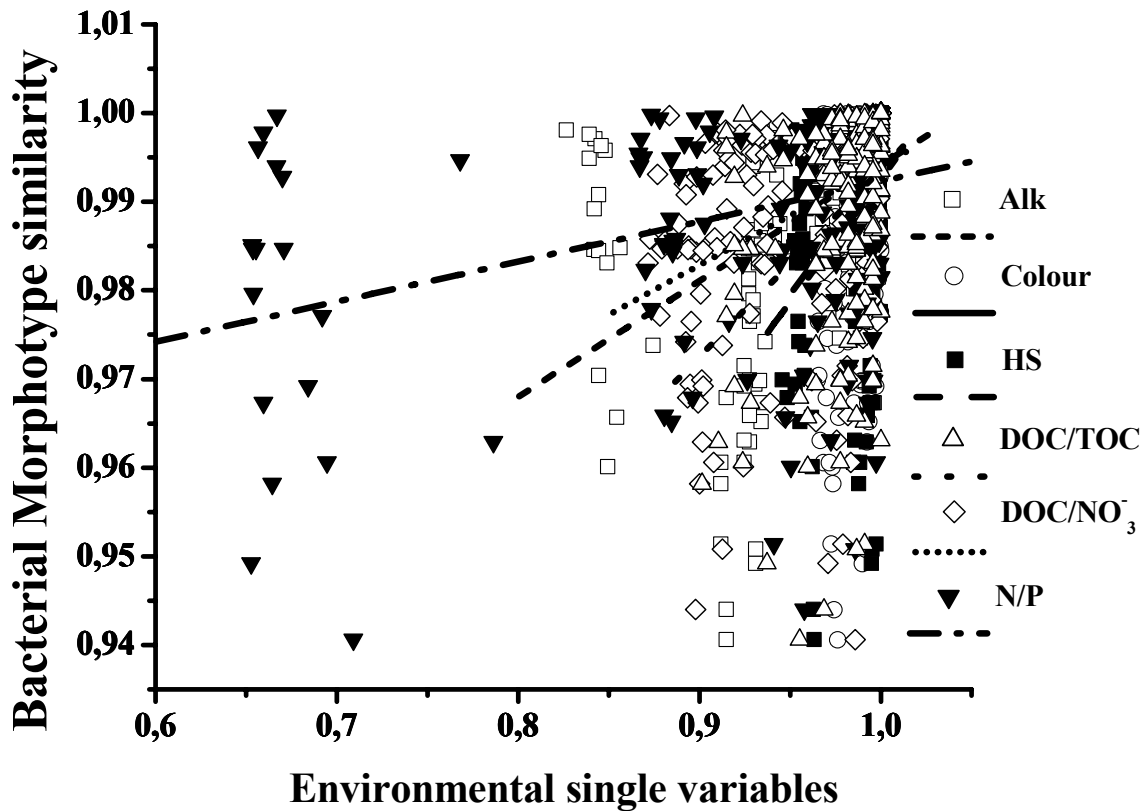
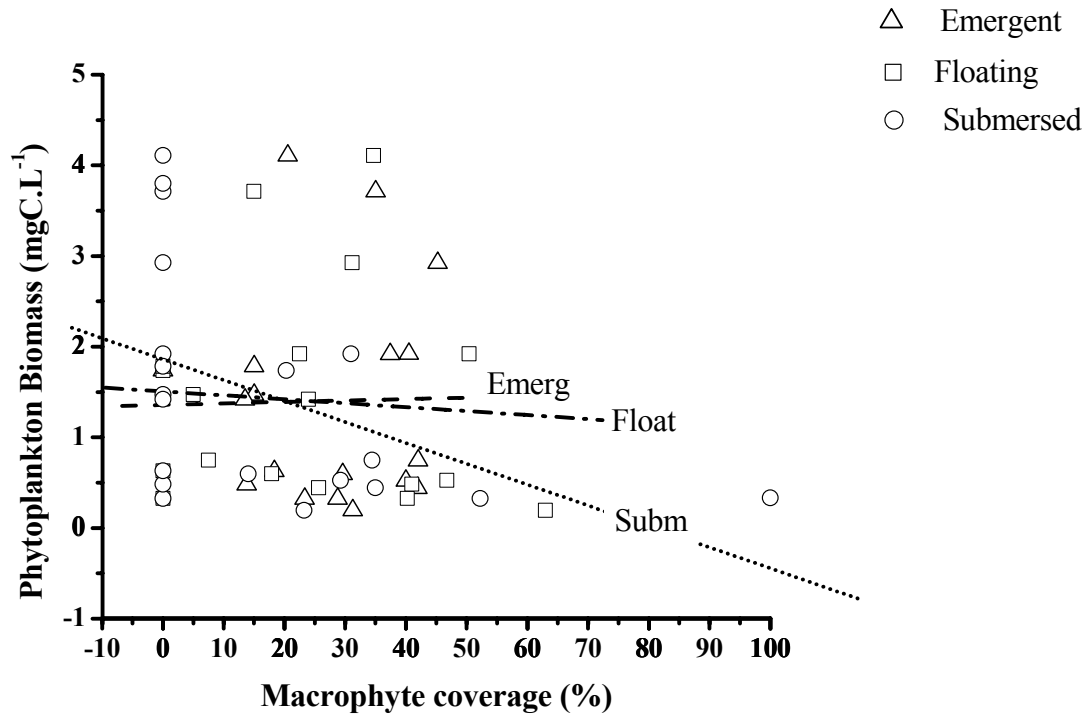


Fig. 9 All possible comparisons for the ten lakes data set under study between Bacterial Morphotype similarity and Alkalinity (Alk), Water Colour (Colour), HS ratio (HS), DOC/TOC ratio , DOC/NO<sub>3</sub> ratio and N/P ratio

### 3.3.3. Macrophyte coverage, phytoplankton biomass and percentage of bacterial detected cells

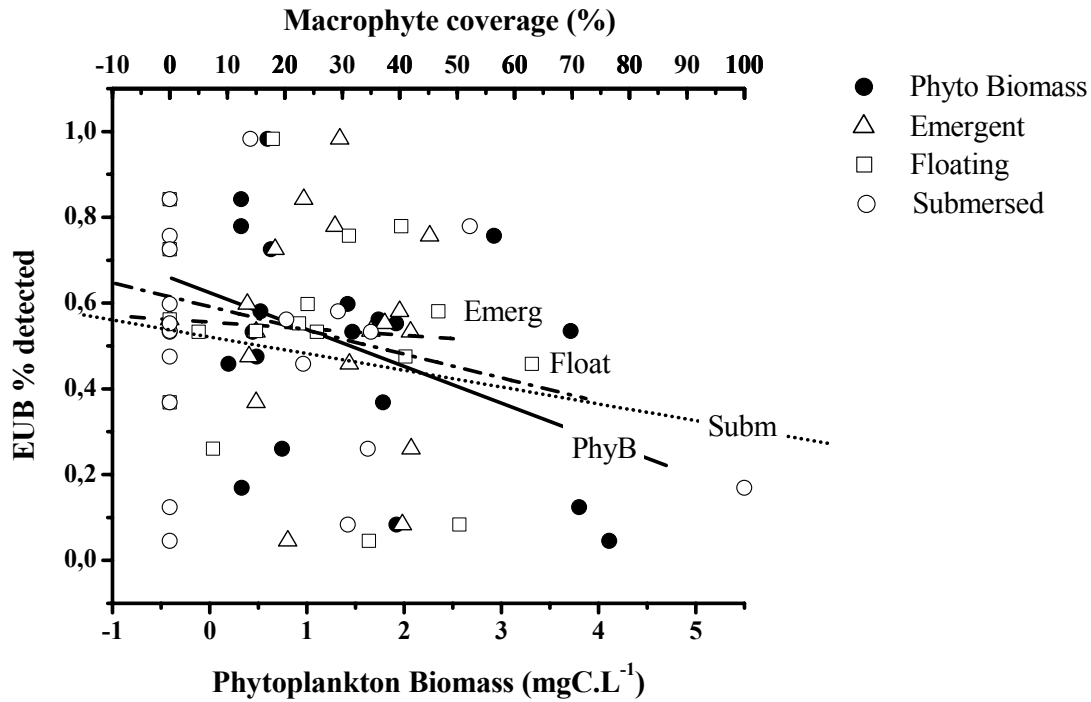
Macrophyte coverage showed always negative relationships when assumed as predictor of phytoplankton biomass. For emergent ( $R^2 = -0,017$   $n = 18$   $p = 0,945$ ) and floating ( $R^2 = -0,07$   $n = 18$   $p = 0,777$ ) macrophytes this relationship was quite weak. For submersed macrophytes, however, this relationship was significant ( $R^2 = -0,46$   $n = 20$   $p = 0,039$ ) (Fig. 10).



**Fig. 10** Macrophyte coverage type as a predictor variable for phytoplankton biomass in the ten lakes data set for submersed (Subm) and for all except Mangueira lake for floating (Float) and emergent (Emerg) macrophytes

The percentage of bacterial cells detected also presented a negative, rather non significant relationships with macrophyte coverage and phytoplankton biomass. Phytoplankton biomass ( $R^2 = -0,42$   $n = 20$   $p = 0,065$ ) had only marginally significant relationships, while emergent ( $R^2 = -0,05$   $n = 18$   $p = 0,850$ ), floating macrophytes ( $R^2 = -0,26$   $n = 18$   $p = 0,290$ ), and submersed ( $R^2 = -0,22$   $n = 20$   $p = 0,336$ ) showed no relevant relationships at all (Fig. 11).





**Fig. 11** Macrophyte coverage type and phytoplankton biomass as predictor variables for percentual of bacterial cells detected (EUB % detected). (*PB* phytoplankton biomass, *Emerg* emergent, *Float* floating, *Subm* submersed). Data for the ten lakes data set for submersed (*Subm*) and for all except Mangueira lake for floating (*Float*) and emergent (*Emerg*) macrophytes

Bacterial production, as a proxy of bacterial activity status, was strongly associated to lake size and geographic distance, regardless the comparisons carried. Like the morphotypic pattern, also littoral zones are suggested to play a major role in the dependence of either assembly and morphotype diversity on bacterial activity (Table 2).

**Table 2** Bacterial production in the coastal shallow lakes data set as a measure of physiological status either as independent or dependent variable in linear regressions with Bacterial assembly similarity, Bacterial morphotype similarity, Lake size similarity and geographic distances between lakes. All comparisons possible refer to comparisons between margins, pelagic and additionally between margins and pelagic of the lakes.

Independent	×	Dependent	Equation	R <sup>2</sup>	p	n
<b>All comparisons possible</b>						
Bacterial Production Similarity		Bacterial assembly Similarity	-	0,06	0,3611	210
		Bacterial Morphotype Similarity	$y = 0,94 + 0,06x$	0,26	<0,001*	210
Lake size similarity Geographic distance		Bacterial Production Similarity	$y = 0,85 + 0,11x$	0,56	<0,0001*	210
			$y = 0,97 - 2,57 \times 10^{-4}x$	-0,77	<0,0001*	210
<b>Comparisons between margins</b>						
Bacterial Production Similarity		Bacterial assembly Similarity	$y = 0,63 + 0,31x$	0,27	0,045*	55
		Bacterial Morphotype Similarity	$y = 0,93 + 0,07x$	0,42	0,001*	55
Lake size similarity Geographic distance		Bacterial Production Similarity	$y = 0,85 + 0,12x$	0,57	<0,0001*	55
			$y = 0,97 - 2,78 \times 10^{-4}x$	-0,83	<0,0001*	55
<b>Comparisons between pelagic areas</b>						
Bacterial Production Similarity		Bacterial assembly Similarity	-	0,11	0,439	55
		Bacterial Morphotype Similarity	-	0,16	0,239	55
Lake size similarity Geographic distance		Bacterial Production Similarity	$y = 0,86 + 0,11x$	0,51	<0,0001*	55
			$y = 0,97 - 2,52 \times 10^{-4}x$	-0,73	<0,0001*	55

(\*) significant relationships at 0,05 alpha probability; (-) non applicable equations because the relationship is assumed to be inexistent, given the p value associated.

## 4 Discussion

### 4.1 Lake distance and connectivity drivers

The dependence of bacterial assembly composition on environmental variables is in accordance with the statement that at small-to-intermediate geographic scales the environmental heterogeneity is a major driving force for bacterial distribution (Martiny et al., 2006). The strictly dependence of bacterial distribution upon environmental factors, rather than on spatial constraints (van der Gucht et al. 2007), namely water chemistry, has been demonstrated in practice (Méthé and Zehr 1999; Lindström et al. 2005).

Apparently not in accordance with these previous results, one feature of our data was the association of the higher bacterial similarity indexes between the lakes geographically closer (what was defined by the negative associations between bacterial assembly and morphotype similarity with geographic distance), indicating a possible influence of habitat connectivity that is more likely to occur in lakes closer at least occasionally. This assumption is supported by other findings (e.g. Crump et al. 2007; Yannarell and Triplett 2005). However, it was not possible to separate the effects of size and distance, since in our data set lakes that are more similar in size are geographically closer (Lake size similarity  $\times$  Geographic distance:  $R^2 = -0,96$   $n = 210$   $y = 1,027 - 0,002x$   $p < 0,0001$ ). Environmental similarity, at its turn, was related to lake size similarity ( $R^2 = 0,46$   $n = 210$   $y = 0,69 + 0,14x$   $p < 0,0001$ ) and geographic distance ( $R^2 = -0,48$   $n = 210$   $y = 0,83 - 3,28 \times 10^{-4}x$   $p < 0,0001$ ).

Intriguingly, given the low resolution of the taxonomic units employed, it is not reasonable to assume that it ensures enough variation to allow detection of important factors that shape bacterial assemblies diversity in these subtropical coastal shallow lakes. Therefore, we looked at another underlying factor, instead of diversity itself, that is likely to be driving FISH results, since morphotypic diversity, that is more related to physiological status of the assembly, was more adherent to the factors tested (lake size, geographic distance) and bacterial production itself.

Once environmental similarity was always important in all comparisons for our data, and therefore seems to be the link between spatial factors and bacterial response, we attempted to find cascading effects that are likely to originate from spatial scales to ultimately influence bacteria.

### 4.2 Macrophytes and Phytoplankton

For bacterioplankton, literature data suggests that there is a positive relationship between cell activity and percentage of Bacteria (EUB%, universal Eub338 targeted probe) detected (Bouvier and del Giorgio 2003), the reason why FISH results have been also used to assess physiological status of cells. Our results showed very low detection of the group Bacteria in some lakes, even though literature data report a variable range of 1-100% for temperate freshwater habitats (Bouvier and del Giorgio 2003).

There has been proposed that competition between bacteria and phytoplankton is an important factor regulating bacterial metabolism. A myriad of studies report on the effect of phytoplankton on bacterial metabolism, e.g. growth efficiency, energy and material fluxes (reviews in del Giorgio and Cole 1998; Cotner and Biddanda 2002 and Cole 1999). As the importance of phytoplankton increases (e.g increasing trophic status, assessed by some phytoplankton biomass estimate), less extra cellular carbon is released and less efficiently bacterioplankton competes for nutrients (Cotner and Biddanda 2002). As previously exposed, factors that control phytoplankton need to be taken into account if we want to understand final effects on bacterioplankton. So, it is reasonable to assume that EUB% could be associated somehow with some phytoplankton abundance measure, namely biomass concentration, even though is not completely clear that productivity is the only predictor for EUB% (Bouvier and del Giorgio 2003). In fact, our results showed that bacterial assembly resembled B:P Biomass ratio (Fig. 6).

From a holistic point of view, studies that approached effect of lake size on limnological variables other than bacteria have found relatively higher coverage of macrophytes and lower phytoplankton chlorophyll concentration in smaller lakes (Sondergaard et al. 2005). These patterns for macrophyte coverage have been summarized also by other authors (Scheffer and van Geest 2006). Small and shallow lakes, with low pelagic to littoral zone ratios may exert an important role in freshwater bacterioplankton through macrophyte influence (Huss and Wehr 2004).

There seems to be a mechanistic explanation for the alternance of macrophyte/phytoplankton in lakes or specific zones inside a lake: macrophytes prevent phytoplankton dominance and vice-versa (Scheffer et al. 1993). In effect, our results showed a negative significant influence of submersed macrophytes on phytoplankton abundance.

Among the explanations for this antagonism is the production of species-specific allelopathic compounds by submersed macrophytes with variable algicidal effects, even though *in situ* confirmations of allelopathy are still lacking (Körner and Nicklisch 2002; van Donk and van de Bund 2002; Leu et al. 2002; Mulderij et al. 2007). Nevertheless, phytoplankton inhibition may play an important role controlling the amount of carbon released by phytoplankton available to bacterial

utilization, besides also direct effects of macrophytes on bacterial metabolism through nutrients and carbon source/sink are known (Huss and Wehr 2004; Stanley et al. 2003; Rooney and Kalff 2003). In contrast, our results showed a lack of direct effect of macrophyte coverage on bacterioplankton. A possible explanation could be a potential metabolization capability of allelopathic inhibitory compounds released from submersed macrophytes by heterotrophic bacteria (Gross et al. 2007), which leads to an indication of primary inhibition of phytoplankton.

Intriguingly, phytoplankton also showed a tendency to play a negative effect (marginally significant) on EUB%. A high proportion of inactive cells (therefore less detectable as EUB%) could be expected in systems with highly selective grazing pressure, i.e., when large, active cells are cropped at higher rates, which results in a high proportion of inactive cells (Cole 1999). However, since ciliate abundance was not an important factor for bacterial assembly and morphotype similarity, phytoplankton competition (Cotner and Biddanda 2002) can be also a possible explanation for this unexpected result. In fact, for values below  $1,0 \text{ mgC.L}^{-1}$  of phytoplankton biomass, the relationship between the latter with EUB% turns out to be positive, even though still non significant (data not shown).

Since we assume macrophytes as major predictors in our lakes data set, another possible explanation, but rather more speculative for differential distribution of phytoplankton and bacterioplankton along spatial scales could be an yet unassessed role of macrophyte biogeography itself, resulting in site-specific composition that could contribute to differences in bacterial response, since species-specific production of allelopathic compounds by macrophyte have been reported and taxon-specific response by either phyto- and bacterioplankton have been suggested (Huss and Wehr 2004). One of the implications of this small scale interaction between macrophytes and phytoplankton is an emerging understanding that large lakes (like Magueira lake), at least in our subtropical areas, are actually a mosaic of small lakes (Fragoso et al., submitted) synchronically dependent on wind driven hydrodynamics (Cardoso and Motta-Marques 2007).

In a context of macrophyte/phytoplankton interaction occur, it seems reasonable to assume that bacteria will track on this interaction, specially in shallow lakes where continuous climatic and aging dynamics determining different ratios of littoral to pelagic zone ratios may occur. This could represent a potential metabolic zonation for bacterioplankton, with different assemblies being kept apart inside of the same lake, which has important implications for diversity sampling designs, as a mosaic of metabolic situations is also likely to occur. This is the opposite of the proposed aquatic community synchrony in temperate lakes (Kent et al. 2007).

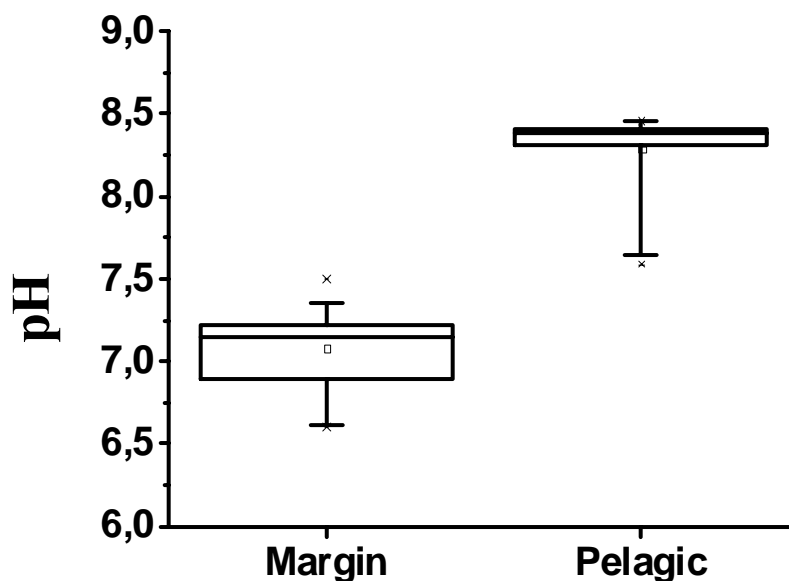
### 4.3 Short chemical gradients supported by macrophytes

Despite the range in size and proximity, our lakes under study are very similar in nutrient contents at first view (TP and TN, see Table 1), which in turn is an indicative of trophic homogeneity. Although, similarity of TN:TP was associated with bacterial morphotype diversity. These nutrients are known to play an important role in the macrophyte-phyto-bacterioplankton interaction (Huss and Wehr 2004 and references therein). Moreover, ratios that have been reported to vary along trophic gradients influenced significantly bacterial similarity, either assembly and morphotype. The relative participation of inorganic nutrients (assessed here as DOC:PO<sub>4</sub> and DOC:NO<sub>3</sub> ratios) and particulate organic matter (DOC:TOC) tends to increase (lower ratios) along the trophic gradient, while the bacterial biomass relative to phytoplankton (B:P Biomass ratio) decreases (Cotner and Biddanda 2002).

So, this is an indication that the short trophic zonation (in terms of phytoplankton biomass) generated in gradients of littoral macrophyte dominance to pelagic phytoplankton dominance may be variable enough to provoke bacterial physiological response (Wetzel 1992).

In effect, a truly chemical zonation in Mangueira lake has been observed, as systematic differences in pH have been already observed between littoral vegetated and unvegetated zones (Fig. 12), very close to each other. Macrophytic leachates may present a set of organic acids that have effects on pH and bacterial metabolism (Farjalla et al. 2001).

Responses of bacterial morphotype similarity to similarity of the other factors also can be attributed to macrophyte influence. Alkalinity is linked to pH (Wetzel and Likens 2000); Water colour is a function also of the dissolved organic carbon (Wetzel and Likens 2000) released by macrophyte along with humic compounds, as we observed in the lakes (unshown results).



**Fig. 12** pH records in 25 points of margin, vegetated areas, and pelagic, littoral unvegetated areas in Mangueira lake, October 2007. The two zones significantly differ:  $F = 326,08$   $p < 0,0001$   $n = 50$ .

These chemical zonation triggered by macrophyte presence in terms of specific composition and biomass in small water bodies has been investigated recently (Joniak 2007). Our results are totally in accordance with their findings. They have reported a consistent effect of macrophytes on water chemistry and stated this as a cause of the formation of specific microecosystems within small water bodies (Joniak 2007).

The structuring role of aquatic macrophytes is not a new issue for other organisms. Among their effects are the above cited phytoplankton, zooplankton and fish density and composition control (Schriver et al. 1995; Scheffer and Jeppesen 1997) along with effects in nutrient availability (Søndergaard and Moss 1997) and specifically vegetated littoral zones have been linked to structure cladocerans (Burks et al. 2001). This work intends to consider this zonation also a possibility for bacterioplankton and we have some indication that at least some kind of metabolic zonation occur, even in small lakes considered here (13ha).

## 5 Conclusions

Our data support the hypothesis that our assembly composition assessed by FISH was influenced by cell activity, rather than by a biogeographic background. Local factors were considered

as a primary cause for this pattern, for bacterial similarity measures (both assembly composition and morphotype distribution) were highly associated with environmental similarity and the latter highly related to lake size similarity and geographic distance. These local factors, at their turn, are hypothesized to be triggered by the zonation of macrophytes and phytoplankton dominated areas inside the lakes. This was further evidenced by chemical gradients of nutrients and organic carbon. Further approaches with higher taxonomic resolution are needed to verify if this zonation determines also distinct compositionally and functionally bacterial assemblies.

## Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agency CNPq/MCT (Taim Hydrological System, Site 7, part of the Brazilian network of Long Term Ecological Research (PELD)) and carried through the Programa de Pós-Graduação em Ecologia, UFRGS and Instituto de Pesquisas Hidráulicas, UFRGS. Special thanks to Luciane Crossetti for phytoplankton analyses, Laura Utz for helping with ciliates handling, Luiz Kucharski for lending the scintillator counter and Tiago Finkler for macrophyte coverage data, valuable suggestions and comments.

## 6 References

- American Public Health Association (APHA) (1999) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association Inc Washington D. C.
- Azovski AI (2002) Size-dependent species-area relationships in benthos: is the world more diverse for microbes? *Ecography* 25:273-282
- Bent SJ, Pierson JD, Forney LJ (2007) Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Appl and Environ Microbiol* 73(7):2399-2401
- Bell T, Ager D, Song J-I, Newmann JA, Thompson IP, Lilley AK, van der Gast CJ (2005) Larger islands house more bacterial taxa. *Science* 308:884
- Bouvier T, del Giorgio PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microb Ecol* 44:3-15
- Braun-Blanquet J (1964) *Pflanzensoziologie* 3rd edn, Vienna, New York, 865p.
- Burks RL, Jeppesen E, Lodge D M (2001) Littoral zone structures as *Daphnia* refugia against fish predators. *Limnol Oceanogr* 46(2):230-237



- Canfield De Jr, Shireman JV, Colle DE, Haller WT, Watkins CEII, Maceina MJ (1984) Prediction of chlorophyll *a* concentrations in Florida lakes: importance of aquatic macrophytes. *Can J Fish Aquat Sci* 41: 497–501
- Cardoso LS, Motta-Marques (2007) Hydrodynamics-driven plankton community in a shallow lake. *Aquat Ecol* DOI: 10.1007/s10452-007-9151-x
- Cole JJ (1999) Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems* 2:215-225
- Cotner JB, Biddanda BA (2002) Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105-121
- Crump BC, Adams HE, Hobbie JE, Kling GW (2007) Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an arctic tundra catchment. *Ecology* 88(6):1365-1378
- Danovaro R, Pusceddu A (2007) Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: does microbial diversity play any role? *Estuar Coast Shelf Sci* 75:4-12
- Del’Duca AT (2007) Bacterioplâncton em reservatórios tropicais de geração de energia: variação no espaço e no tempo da estrutura da comunidade bacteriana em sete reservatórios de Furnas Centrais Elétricas S. A. Master Thesis (Universidade Federal de Juiz de Fora). 130p
- del Giorgio PA, Cole JJ, Cimbleris A (1997) Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nat* 385(9):148-151
- del Giorgio PA, Cole J (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:503-541
- Farjalla VF, Anesio AM, Bertilsson S, Granéli W (2001) Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: abiotic transformations and bacterial response *Aquat Microb Ecol* 24:187-195
- Fenchel T, Finlay BJ (2004) The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience* 54:777–784
- Fernandez AS, Hashsham SA, Dollhopf SL, Raskin L, Glagoleva O, Dazzo FB, Hickey F, Criddle CA, Tiedje JM (2000) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl Environ Microbiol* 66(9):4058-4067
- Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65(8):3721-3726
- Green J, Bohannan BJM (2006) Spatial scaling of microbial diversity. *Trends Ecol Evol* 21(9):501-507
- Gross EM, Hilt (nee Körner) S, Lombardo P, Mulderij G (2007) Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton – state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 584:77-88

- Hillebrand H, Dürseken D, Kirschiel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol* 35:403-424
- Holz M (1999) Do mar ao deserto. *A Evolução do Rio Grande do Sul no Tempo, Geológico*, 2nd edn. Ufrgs, Porto Alegre pp131-144, 144p
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH, Bohannan BJM (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 6:613-622
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannan BJM (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432:750-753
- Huss, A A and Wehr, J D Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria americana*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake *Microb Ecol* v45, p305-315, 2004
- IBGE - Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2008) Brazilian cartographic digital base (1:1000000) version 2003
- Jespersen A-M, Christoffersen K (1987) Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Arch für Hydrobiol* 109(3):445-454
- Joniak T, Kuczýnska-Kippen N, Nagengast B (2007) The role of aquatic macrophytes in microhabitatual transformation of physical-chemical features of small water bodies. *Hydrobiologia* 584:101-109
- Kent AD, Yannarell AC, Rusak JA, Triplett EW, McMahon KD (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *Int Soc Microb Ecol* 1:38-47
- Kepner RLJR, Pratt JR (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev* 58(4):603-615
- Kirchman D (2001) Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: Paul JH (ed) *Methods in microbiology* v.30. Academic Press, USA, pp 227-237
- Körner S, Nicklisch A (2002) Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J Phycol* 38:862-871
- Kritzberg ES, Cole JJ, Pace MM, Granéli W (2005) Does autochthonous primary production drive variability in bacterial metabolism and growth efficiency in lakes dominated by terrestrial C inputs? *Aquat Microb Ecol* 38:103-111
- Leu A, Krieger-Liszkay A, Goussias C, Gross EM (2002) Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiol* 130:2011-2018
- Lindström ES, Leskinen E (2002) Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of the 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microb Ecol* 44:1-9

- Lindström ES, Agterveld MPK-V, Zwart G (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl Environ Microb* 71(12):8201-8206
- Liu J, Dazzo FB, Glagoleva O, Yu B, Jain AK (2001) CMEIAS: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microb Ecol* 41:173-194
- Mackereth FJH, Heron J, Talling JF (1989) *Water analysis: some revised methods for limnologists*. 2nd edn. Freshwater Biological Association
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Furhman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR, Morin PJ, Naeem S, Øvreås L, Reysenbach A-L, Smith VH, Staley JT (2006) Microbial Biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature* 4:102-112
- Massana R, Gasol JM, Bjørnsen PK, Black-Burn N, Hagström Å, Hietanen S, Hygum BH, Kuparinen J, Pedrós-Alió C (1997) Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci Mar* 61(3):397-407
- Méthé BA, Zehr JB (1999) Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia* 401:77-96
- Mulderij G, Van Nes EH, Donk EV (2007) Macrophyte-phytoplankton interactions: the relative importance of allelopathy versus other factors. *Ecol Model* 204:85-92
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, USA, pp339-345, 777p
- Pernthaler J, Frank-Oliver G, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Paul JH (ed) *Methods in microbiology*. v.30, USA, Academic Press, pp 207-226
- Pinel-Alloul B, Ghadouani A (2007) Spatial heterogeneity of planktonic microorganisms in aquatic systems. In: Franklin RB, Mills AL (eds) *The spatial distribution of microbes in the environment*. Springer, pp203-310
- Pommier T, Canbäck B, Riemann L, Boström KH, Simu K, Lundberg P, Tunlid A, Hagström, Å (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol* 16:867-880
- Racy FPP (2004) Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios. Master Thesis (Universidade Federal de São Carlos). pp65
- Reche I, Pulido-Villena E, Morales-Baquero R, Casamayor EO (2005) Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology* 86(7):1715–1722

- Robarts RD, Zohary T, Waiser MJ, Yacobi YZ (1996) Bacterial abundance, biomass, and production in relation to phytoplankton biomass in the Levantine Basin of the southeastern Mediterranean sea. *Mar Ecol Prog Ser* 137:273-281
- Rooney N, Kalff J (2003) Submerged macrophyte-bed effects on water-column phosphorus, chlorophyll a, and bacterial production. *Ecosystems* 6:797-807
- Schäfer A (1988) Tipificação ecológica das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Limnol Bras* 11:29-55
- Scheffer, M, Hosper SH, Meijer M-L, Moss B, Jeppesen E (1993) Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol Evol* 8(8):275–279
- Scheffer M, van Geest J (2006) Small habitat size and isolation can promote species richness: second-order effects on biodiversity in shallow lakes and ponds. *Oikos* 112(1):227-231
- Scheffer M, Jeppesen E (1997) Alternative stable states. In: Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, Christoffersen K (eds) *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer, pp397-406
- Schriver P, Bøgestrand J, Jeppesen E, Søndergaard M (1995) Impact of submerged macrophytes on fish-zooplankton-phytoplankton interactions: large-scale enclosure experiments in a shallow eutrophic lake. *Freshw Biol* 33:255-270
- Schwarzbold A, Schäfer A (1984) Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul – Brasil. *Amazoniana* 9(1):87-104
- Simon M; Azam F (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 51:201-213
- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in sea water using 3H-leucine. *Mar Microb Food Webs* 6: 107-109
- Søndergaard M, Moss B (1997) Impact of submerged macrophytes on phytoplankton in shallow freshwater lakes In: Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, Christoffersen K (eds) *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer, pp115-132
- Søndergaard M, Jeppesen E, Jensen JP (2005) Pond or lake: does it make any difference? *Arch für Hydrobiol* 162(2):143-165
- Stanley EH, Johnson MD, Ward AK (2003) Evaluating the influence of macrophytes on algal and bacterial production in multiple habitats of a freshwater wetland. *Limnol Oceanogr* 48(3):1101-1111
- Steinberger RE, Allen AR, Hansma HGE, Holden PA (2002) Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa* – unsaturated biofilms. *Microb Ecol* 43:416-423
- Sun J, Liu D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 25::1331-1346

- van der Gucht K, Cottenie K, Muylaert K, Vloemans N, Cousin S, Declerck S, Jeppesen E, Conde-Porcuna JM, Schwenk K, Zwart G, Degans H, Vyverman W, De Meester L (2007) The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *PNAS* 104(51):20404-20409
- van Donk E, van de Bund WJ (2002) Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Bot* 72:261-274
- Weisse T (2006) Biodiversity of freshwater microorganisms – achievements, problems, and perspectives. *Pol J Ecol* 54(4):633-652
- Wetzel R G (1992) Gradient-dominated ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia* 229: 181–198
- Wetzel RG, Likens GE (2000) *Limnological Analyses*, 3rd edn. Springer-Verlag, New York, 429pp.
- Yannarell AC, Triplett EW (2004) Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl Environ Microbiol* 70(1):214-223
- Zdanowski MK, Zmuda MJ, Zwolska I (2005) Bacterial role in the decomposition of marine-derived material (penguin guano) in the terrestrial maritime Antarctic. *Soil Biol Biochem* 37:581-595

## 5. CAPÍTULO 2

### 5.1 Apresentação

A partir da constatação da importância de fatores locais, especialmente da possível presença de habitats, estes por sua vez caracterizados pela dominância de macrófitas ou fitoplâncton, responsáveis pela determinação de diferentes estados metabólicos para o bacterioplâncton, o presente trabalho buscou investigar a transição contínua de variáveis bacterianas ao longo de um gradiente de dominância de produtor primário partindo do litoral (dominância de macrófitas) em direção à zona pelágica (dominância de fitoplâncton) no terceiro maior lago da planície costeira do Rio Grande do Sul.

# **Bacterioplankton assembly responses to a gradient of macrophyte to phytoplankton dominance in a large coastal subtropical shallow lake**

**Abstract** Gradients of littoral covered by macrophytes to pelagic zones dominated by phytoplankton occur in shallow lakes, but mainly separate effects of these components have been evaluated. This zonation may structure planktonic organisms, but continuous responses of bacterioplankton remain unknown. In these study, we focused in a gradient of primary producer dominance bacterioplankton for metabolism and diversity in a large subtropical shallow lake, along with a broader data set comprising other plankters abundance and limnological variables. Our results showed an expected consistent gradient of primary producer dominance that triggered a chemical gradient mainly for phosphorus, humic substances, pH and Alkalinity. Biological responses to this gradient indicated that different planktonic assemblies live apart in these two zones, driven by inhibitory effect of macrophytes. These results highlight the importance of small, local scale factors in bacterial regulation, and moreover indicate that the well known structuring role of macrophytes apply also to bacteria.

**Key-words:** macrophytes; phytoplankton; gradient; bacterioplankton; coastal shallow lakes.



## 1 Introduction

Macrophytic vegetation is a conspicuous feature of shallow lakes, once they present low ratios of pelagic to littoral areas. Besides recognition that macrophyte distribution in lakes creates habitat patchiness, little is known about how these different lake habitats contribute to whole lake metabolism (Wetzel 1992; Lauster et al. 2006). This acknowledgment is in accordance with an increasing calling for evaluating also other compartments of the lake, given the skewness caused by excessive pelagic focus of previous works (Vadeboncoeur et al. 2002). In fact, the assumptions about the role of bacteria as a link of primary producers to other trophic levels have been long biased by assumption made upon phytoplankton-dominated systems (Findlay et al. 1991)

In areas where macrophytes are established, they may develop an antagonistic effect on phytoplankton and vice versa. The explanations for this general pattern include competition for light, effect of macrophytes on hydrodynamics and release of allelopathic substances (Scheffer et al. 1993; Scheffer and Jeppesen 1997; Søndergaard and Moss, 1997; Körner and Nicklisch 2002; van Donk and van de Bund 2002; Leu et al. 2002; Mulderij et al. 2007). One of the implications of this interaction is the occurrence of short, local gradients of primary producer dominance that shifts from a littoral dominance by macrophytes to a pelagic zone dominated by phytoplankton. This can be interpreted in terms of some phytoplankton abundance measure as short, slight trophic gradients.

The recognition that patterns of primary producer dominance occurs has important implications for whole lake metabolism. Despite general understanding that bacterioplankton diversity and metabolism tightly relies upon algal primary productivity (e.g. Cotner and Biddanda 2002; Horner-Devine et al. 2003), evidence accumulates that phytoplankton derived organic carbon is in many cases a minor source for the system. Macrophytes can provide directly and indirectly (through support of epiphytes) manifold higher amounts of dissolved organic matter compared to the algae (Wetzel 1992). In fact, bacteria, as the major users of dissolved organic matter and greatly responsible for its cycle in aquatic systems (Münster and Chróst, 1990; Cole 1999) has been proven to present varied reliance on phytoplankton substrates (Garnier and Benest 1990; Karlsoon et al. 2002), reports on uncoupling between bacterial and primary production are well documented (Chrzanowski and Hubbard 1989; Findlay et al. 1991; Simon et al. 1992; Robarts et al 1996; del Giorgio et al. 1997; Duarte and Agusti 1998; Fischer and Pusch 2001; Kritzberg et al. 2005). Indeed, although macrophytic derived organic matter tends to be proportionately more refractory than the algal, an overall dependence of bacteria on this carbon source could be explained in terms of the large amounts of organic matter derived from this source (Wetzel 1992).

Effects of macrophytes on bacterioplankton are not yet fully understood, but several reports on their isolated effects are already available. Macrophytes may also liberate allelopathic compounds that either directly or indirectly inhibits bacteria, in the second case through primary phytoplankton inhibition (Scheffer and Jeppesen, 1997; Körner and Nicklisch, 2002). Additionally, photochemically transformation of derived organic leachates from macrophytes can actually enhance (Farjalla et al. 2001) or inhibit (Anesio et al. 2000) bacterial metabolism, as well as potentially the whole food web with further implications for bacteria (Lange et al. 2003; Daniel et al. 2006).

General assumptions of phytoplankton control of bacteria apply to metabolism, namely bacterial production and bacterial growth efficiency (e.g. Kamjunke et al. 1997; del Giorgio and Cole 1998). Recently, phytoplankton have been found to synchronize bacterial responses to extrinsic factors such as meteorological (Kent et al. 2007). At the other side, at high algal biomass, competition for nutrients and reduced extra-cellular carbon release can be detrimental to bacteria (Cotner and Biddanda 2002)

Since studies on the influence of macrophytes and phytoplankton have been carried isolated, an important feature that remains unaddressed is how is the behavior of the continuous change from a densely macrophyte littoral zone to a pelagic, phytoplankton dominated zone and specially the question: this gradient more likely drives metabolic adaptation or bacterio- and phytoplankton community composition change? In order to verify this question, we have chosen a large, subtropical shallow lake influenced by massive wetlands, located in south Brazil. Wetland-lakes interfaces are very interesting spots to look at this transition of primary producer dominance in small scales, because natural experimental conditions are available to be tested. For that, our hypotheses were: I) there is a consistent gradient of macrophyte to phytoplankton dominance from margin towards pelagic area in this lake and II) this biological gradient is the triggering force that ultimately affects planktonic organisms, namely bacterioplankton.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Sampling site and approach

The sampling site chosen was a large, coastal shallow lake (80.800ha) in Rio Grande do Sul state (Brazil ~ 33°31'22"S 53°07'48"W). Since our hypothesis was to test marked changes in main carbon source of primary producers, sampling was carried in a transect from densely vegetated littoral area (margin covered either by emergent and submerged aquatic macrophytes) to a pelagic, phytoplankton dominated area, assuming this as a natural experimental situation. The lake is influenced by several wetlands, and this particular littoral area sampled is bounded by a large belt of wetland (Figs. 1 and 2)

The transect had a length of approximately 3200m comprising seven sampling points (Fig. 2). Samples were taken superficially in several separated triplicate bottles and handled in a near shore laboratory for immediate analysis, incubation methods, and fixation.

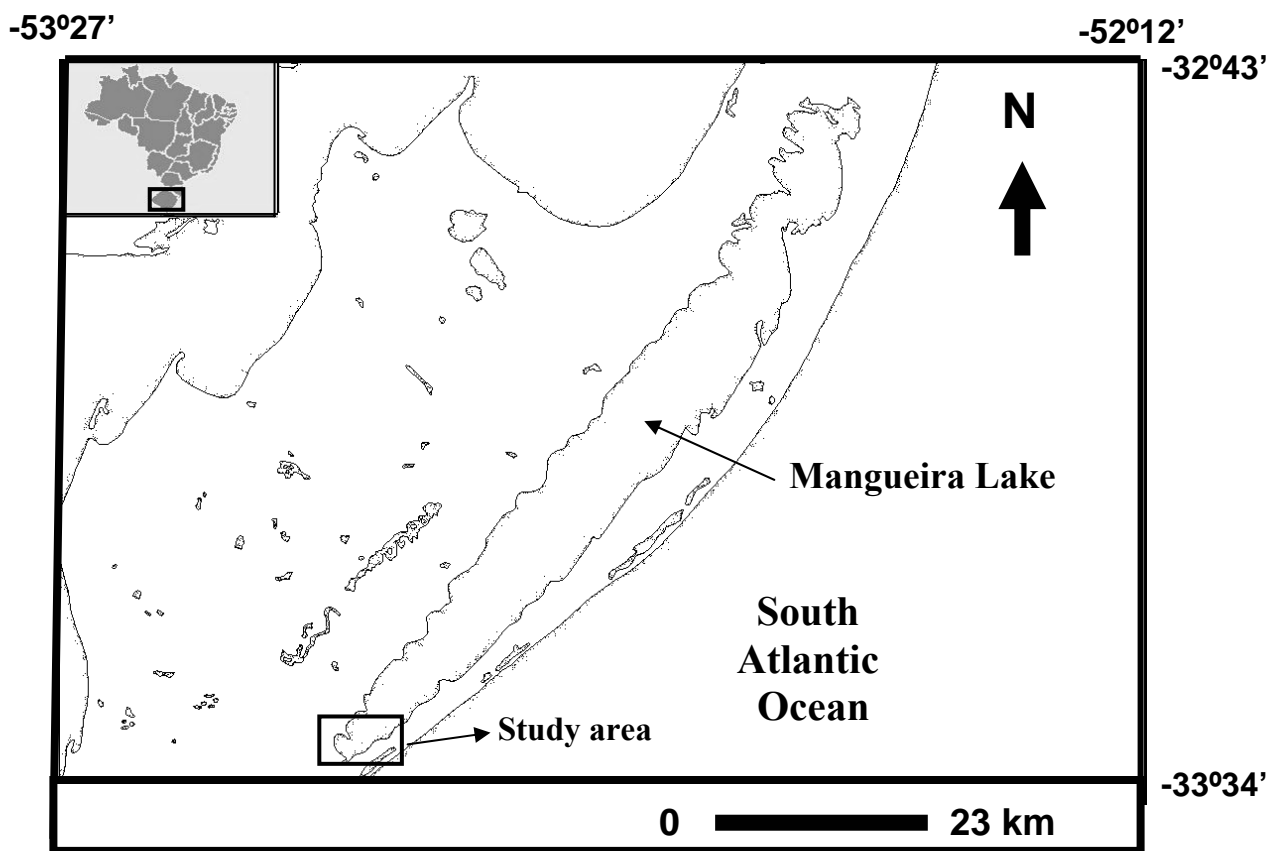


Fig. 1 South Mangueira lake, coastal large lake in Rio Grande do Sul state, Brazil



**Fig. 2** Transect in detail from a densely vegetated littoral zone (sampling stations A-C or 1-3) to a phytoplankton dominated pelagic zone, where no macrophytes are established (sampling stations D-G or 4-6) in Mangueira Lake, Rio Grande do Sul, Brazil. Total length ~3200m

## 2.2 Variables assessed

### 2.2.1 Limnological variables

Gran titration Alkalinity (Alk) and pH were assessed through potentiometric methods (Wetzel and Likens 2000). Water colour (Col), Turbidity (Turb) and Humic Substances ratio (HS ratio) were determined through readings at 430, 750 and the ratio 250:365nm, respectively, using a 1cm quartz cuvette in spectrophotometer (Varian Cary 1E). High HS ratios mean proportionally more small size dissolved molecules, and therefore less refractory substrates (Strome and Miller 1978). Total Solids (TS) was assessed gravimetrically by water evaporation in porcelain dishes (APHA 1999) and Dissolved Organic Carbon (DOC) was determined in a Total Organic Carbon Analyzer (Shimadzu 5000), assumed to be the fraction that passed through a 450 °C pre-combusted glass fiber filter (Macherey-Nagel GF6 - 0,6 µm average particle retention size).

### 2.2.2 Nutrients

Total Nitrogen (TN), Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ -N), Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ -N), Ammonium ( $\text{NH}_3^+$ -N), Total Phosphorus (TP) and Orthophosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ -P) were colorimetrically determined following (Mackereth et al. 1989).

Silicate ( $\text{SiO}_2$ ) was quantified through photometric method (Si Merck Spectroquant® kit for silicates -silicic acid).

### 2.2.3 Primary producers

Phytoplankton samples were collected through filtration of 20L of each sample in a 20 µm mesh sieve and fixed in formaldehyde solution (4% vol:vol). Samples were stored in dark and room temperature until analysis (Wetzel and Likens 2000).

Density was determined in Sedwick-Rafter chambers (APHA 1999) with countings of at least 100 individuals of the most abundant species under inverted microscope. The results were expressed in  $\text{ind.mL}^{-1}$ .

Biomass was also determined in Sedwick-Rafter chambers (APHA 1999), through the counting of at least 20 individuals (when possible) from each species and their biovolume determination (Sun and Liu 2003; Hillebrand et al. 1999). Fresh biomass ( $\text{mm}^3.\text{L}^{-1} = \text{mg.L}^{-1}$ ) was estimated multiplying biovolume by density of each taxon. Fresh biomass was further converted into carbon biomass by empirical conversion factors (Wetzel and Likens 2000).

Community composition of phytoplankton was determined for major groups according to van den Hoek et al. (1998).

Chlorophyll a was quantified through cold ethanol extraction method (Jespersen and Christoffersen, 1987).

Primary production was estimated with the radiolabeled sodium bicarbonate ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ) method (Wetzel and Likens 2000). For each sampling point, BOD glass bottles (100mL) (comprising 3 dark, 3 light and 3 initial, totalizing 9 bottles per point) were filled with lake water and radiolabeled bicarbonate ( $8,0\mu\text{Ci/mL}$ , final concentration). Incubation lasted 4hs by noon and was carried superficially *in situ* ( $\sim 0,5\text{m}$  depth, margin area) with bottles tied to floating PVC pipe squares ( $1\text{m}^2$ ) (one for dark, and the other for light bottles). Interruption of the activity of initial and incubated bottles was achieved with the addition of 1mL of formaldehyde (final concentration 0,4% ,1:100 vol:vol). The bottles were then kept in the dark and under refrigeration until processing. For reading, scintillation liquid Optiphase HiSafe III (Wallac) was added to the samples and the beta particle emission countings was carried in a Rack Beta Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac 1209) for 600s twice. Results were calculated in  $\text{mgC} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . (Wetzel and Likens 2000).

For aquatic submersed macrophytes, the PVI (Percentual of Volume Infested) was obtained by multiplication of the estimated visual coverage (Braun-Blanquet 1964) of the plant by its length and dividing it by the local water depth (Canfield 1984).

#### 2.2.4 Bacterioplankton

Samples for cell counting, biovolume, biomass and morphotypes determination were first pre-filtered in quantitative paper (MN 640d Macherey-Nagel – average particle retention size 2,0 to 4,0  $\mu\text{m}$ ) in order to exclude other organisms than bacteria and then fixed in 4% formaldehyde (vol:vol) in polyethylene bottles in the field and stored in the dark and refrigerated until analysis.

In the laboratory, 2mL of each sample was filtered ( $<5,0$  kPa) in a Vaccum Manifold Filtration Tower (Millipore) with 1mL of Mili-Q water ( $0,2 \mu\text{m}$  filtered) to improve cell dispersion. Cells were concentrated in  $0,2\mu\text{m}$  black polycarbonate membranes (GE). Approximately 1mL of a 10% (weight:vol) acridine orange stain was added to the filters for 5 minutes. They were then washed with Mili-Q water and air dried. Filters were mounted in slides with mineral oil (Nujol), being processed within 3 days because of quickly faint of acridine. A total of 10 images were captured per filter and image processing was carried on six of them with the help of an image grab system. We employed a refrigerated camera (MOTIC 5000) coupled to an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX70). Image capture (MOTIC Image 3.2) and processing followed Massana et al. (1997) with the help

of the Freeware Image Tool (v.3.00). Once the images were processed and binarized, they were submitted to CMEIAS/Image Tool (1.27) software for cell counting, dimensions determination and morphotype classification (Liu et al., 2001).

Cell density was determined with the average number of cells in the 6 images and the cell density equation described in Kepner and Pratt (1994). Bacterial biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) was assigned to each cell according to the morphotype (Massana et al. 1997), utilizing cell dimensions given by CMEIAS/Image Tool (1.27), and the average calculated from all cells in all images. Bacterial biomass (pgC content of each cell) was calculated employing an allometric function of biovolume (Norland, 1993), and the average from all cells in all images was multiplied to the cell density estimation to yield the bacterial carbon concentration of the sample ( $\mu\text{gC.mL}^{-1}$ ).

Morphotype distribution (Coccus, Spiral, Curved Rod, U-Shaped Rod, Regular Rod, Unbranched Rod, Ellipsoid, Club, Prosthecate, Rudimentary Branched Rod and Branched Filament) was reported percentually from the average of the lists of morphotypes given for each image by CMEIAS/Image Tool (1.27).

Bacterial production (BP) was estimated with the method of (L[4,5- $^3\text{H}$ ] radiolabeled leucine and microcentrifugation.  $11\mu\text{L}$  of leucine solution ( $\sim 20 \text{ nmoles.L}^{-1}$ , specific activity of  $65\text{Ci.mmol}^{-1}$ ) was added to  $1700 \mu\text{L}$  of sample in Eppendorf vials ( $2\text{mL}$ ). An initial vial was interrupted at the beginning and the replicates for each sample were incubated for 30min with lake water at room temperature ( $15\text{-}16 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Interruption of bacterial activity was done with the addition of  $89\mu\text{L}$  of concentrated trichloroacetic acid (TCA). Samples were then stored in the dark and under refrigeration until processing. Samples were centrifuged three times and let to dry out for approximately one week in the fridge. Radioactivity counting was carried after addition of  $1\text{mL}$  of scintillation liquid (Optiphase HiSafe III Wallac) to each vial and reading in a Rack beta Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac 1209) during 180s twice. Calculations assumed intracellular isotopic dilution to be equal to 2, the molar percentual of leucine in the proteic pool equal to 0,073 and the ratio carbon:protein to be 0,86. Results were handled in  $\mu\text{gCL}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Simon and Azam, 1992; Kirchman, 2001).

Bacterial respiration (BR) was determined through the classic Winkler method (described in Golterman et al. 1978) of oxygen consumption in dark bottles, with oxygen reading modified from (Roland et al. 1999). Molar conversion factor between carbon and oxygen was assumed to be equal to 1,0 (del Giorgio et al. 1997). BR was isolated through pre-filtration of samples in the same manner as described above. Incubation was carried *in situ*, in BOD darkened bottles suspended also as described for primary production (above). Time of incubation was 120hs, because very low consumption rates in

pilot tests did not allow oxygen consumption detection before 72hs. Results were expressed in  $\mu\text{gCL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Complementary to BP and BR, Bacterial growth efficiency (BGE) was calculated as  $BGE = (BP)/(BP + BR)$  (del Giorgio and Cole 1998).

Bacterial phylotypic diversity was also evaluated with Fluorescent in situ hybridization (FISH). This essay was the only not carried with replicates. Six oligonucleotide probes (UNISCIENCE) complementary to a region of the 16S rRNA were used: Eub338R – domain Bacteria with its sub-groups: Alf968 –  $\alpha$ -proteobacteria; Bet42a –  $\beta$ -proteobacteria; Gam42a –  $\gamma$ -proteobacteria; CF319a-*Cytophaga-Flavobacter* and also a negative control non-complementary to any bacterial group (Glöckner et al. 1999). Samples were pre-filtered as described above and 2mL of each sample was filtered on 0,2 $\mu\text{m}$  polycarbonate membranes (GE) under low pressure (<5,0 kPa). Samples were fixed in paraformaldehyde (4% weight:vol) phosphate-buffer pH 7,2 solution (max. 24h) and stocked frozen at -15°C until hybridization essay. For this, each filter was divided in parts and each part was hybridized (for 24hs at 46 °C) with 40  $\mu\text{L}$  of one of each probe hybridization solution (NaCl 0,9 M; Tris-HCl 20 mM (pH 7.2); Formamide 35% (CF319a) and 30% (other probes); EDTA 5 mM; Sodium Dodecyl Sulfate 0,01% and 100 ng of oligonucleotide). For total cell counts DAPI stain was used (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , for 5 minutes). Slides were mounted with mineral oil (Nujol) and processed within a week (Pernthaler et al. 2001).

Image processing was done in Image Tool (1.27). A total of 10 fields per probe (filter part) were processed in each filter, resulting in a total of 120 images (60 total DAPI counts and 60 labeled cells counts) per filter. Autotrophic cells, although practically never present, were discounted whenever detected. Group targeted density was calculated as the average of the mean countings of each probe labeled cells per field subtracted from the negative control and as described for cell density estimation above (Kepner and Pratt, 1994). Results were reported as percentage from group density data:  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria and *Cytophaga-Flavobacter* assessed by their specific rRNA targeted probes. Other Bacteria was computed as EUB338 probe labeled cells (total Bacteria density) minus the sum ( $\alpha + \beta + \gamma$ -Proteobacteria and *Cytophaga-Flavobacter*). When this sum was higher than EUB338 density, other Bacteria was considered equal to zero. Undetermined groups computed as total DAPI counts (unspecific stain, total density) minus EUB338 counts or the sum ( $\alpha + \beta + \gamma$ -Proteobacteria and *Cytophaga-Flavobacter*), whichever the highest.



### 2.2.5 Zooplankton

Zooplankton samples were collected together with phytoplankton samples (above). In the laboratory, samples were concentrated in the same sieve (20 $\mu$ m mesh size) to 30mL and counted integrally under inverted microscope in sedimentation chambers. Total density was reported as ind.m<sup>-3</sup>. Also a qualitative analysis was carried for major groups (Cladocera, Copepoda, Nauplii, Rotifera and others) (Wetzel and Likens 2000).

### 2.2.6 Ciliates

For ciliates countings, 2L of sample were concentrated in a 20 $\mu$ m (mesh size) sieve to 50mL, fixed with lugol (9:1 vol:vol) and stored in the dark under refrigeration until analysis. Samples were integrally counted in sedimentation chambers under inverted microscope and total ciliate density was reported as ind.m<sup>-3</sup> (Wetzel and Likens 2000).

### 2.2.7 Derived variables

Derived molar ratios between variables were also considered, as there are a general consensus about their change along trophic gradients (measured as chlorophyll concentration). DOC:PO<sub>4</sub> and DOC:NO<sub>3</sub> are considered as measures of proportion of organic to inorganic nutrients in the system, which is assumed to decrease along trophic gradients. TN:TP, refers to the classical Redfield ratio; and Bacterial to Phytoplankton carbon biomass (B:P ratio) was used as an approximation of the dependence of bacteria on primary production, which tends to be higher in oligotrophic systems (Cotner and Biddanda 2002; del Giorgio et al. 1997).

## 2.3 Statistical treatment

In order to better explore the continuous change of biological and limnological variables along this type of gradient, we first employed a rather descriptive approach. Additionally, replicated regression (Cottingham et al. 2005) was used to assess predictive power of macrophyte coverage and phytoplankton biomass on limnological variables, zooplankton and bacterioplankton (R 2.6.2).

We further examined our hypothesis that margin and pelagic areas constitute different niches using PCA (with correlation matrices) to verify whether sampling points cluster according to this hypothesis (PAST v.1.80 (Hammer et al. 2001)). This method was chosen as there are strong intercorrelations in the original data and variables responded rather linearly to the gradient (Gotelli and Ellison 2004; Ramette 2007).

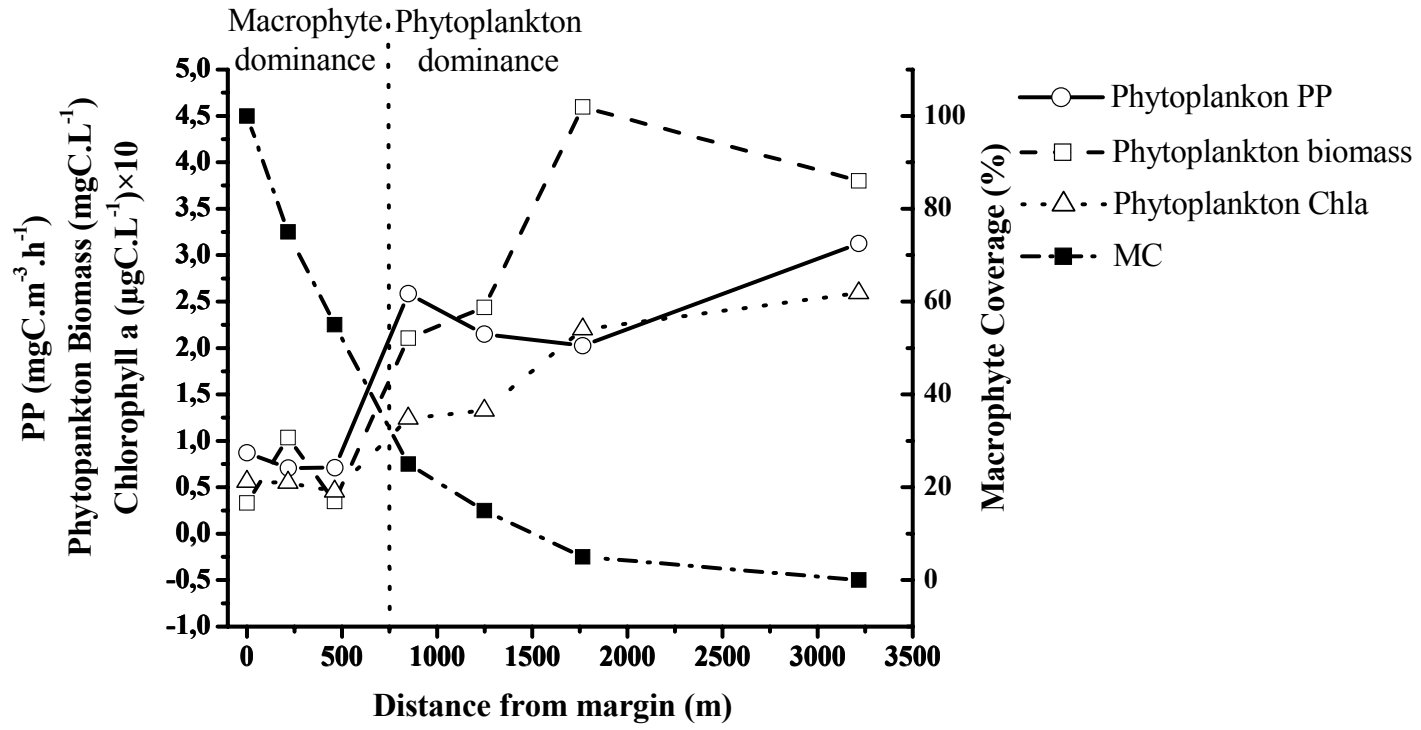
All data was z-score transformed prior to computations in order to achieve normal distribution approximation and homocedasticity, once variables varied many orders of magnitude in their original scales (Gotelli and Ellison 2004).

Graphic presentation was performed in Origin (v.6.0) and PAST (v.1.80). For data presentation, we arbitrarily assigned *macrophyte dominance* and *phytoplankton dominance* areas in the graphics. The former was assigned to stations 1-3 (A-C) until approximately half distance (750m) between stations 3 and 4, comprising the small bay covered with macrophytes; and the latter was assigned to the remaining transect, comprising stations 4-7 (D-G) and aquatic macrophyte uncovered, pelagic zones.

### 3 Results

A shift of primary producer dominance (macrophyte × phytoplankton) was markedly observed along the transect sampled. Macrophyte coverage decreases from 100% in margin area to 0 in the pelagic area, while phytoplankton biomass increases by more than fivefold. Chlorophyll a increased by tenfold (range: 0,28 to 2,7 mg.L<sup>-1</sup>), while primary production of phytoplankton followed the same trend (range: 0,125 to 8,77 mgC.m<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>). The observed transition from one dominance type to the other, assumed here as the lines intersection between macrophyte and phytoplankton variables, was approximately at 40% of aquatic macrophyte coverage for all phytoplankton measures, matching reasonably well our arbitrary distinction between dominances (Fig. 3).

A gradient for chemical variables was observed along this transect. As a trend from margin to pelagic zone, nutrients tended slightly to increase (TN, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N, TP, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>-P and SiO<sub>2</sub>) along the transect. There was also a decrease (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-N and DOC: PO<sub>4</sub>-P) and a lack of evident trend for others (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, DOC and DOC: NO<sub>3</sub>-N). (Table1). DOC showed, however, an important drop in concentration after the interface zone (Fig. 6).



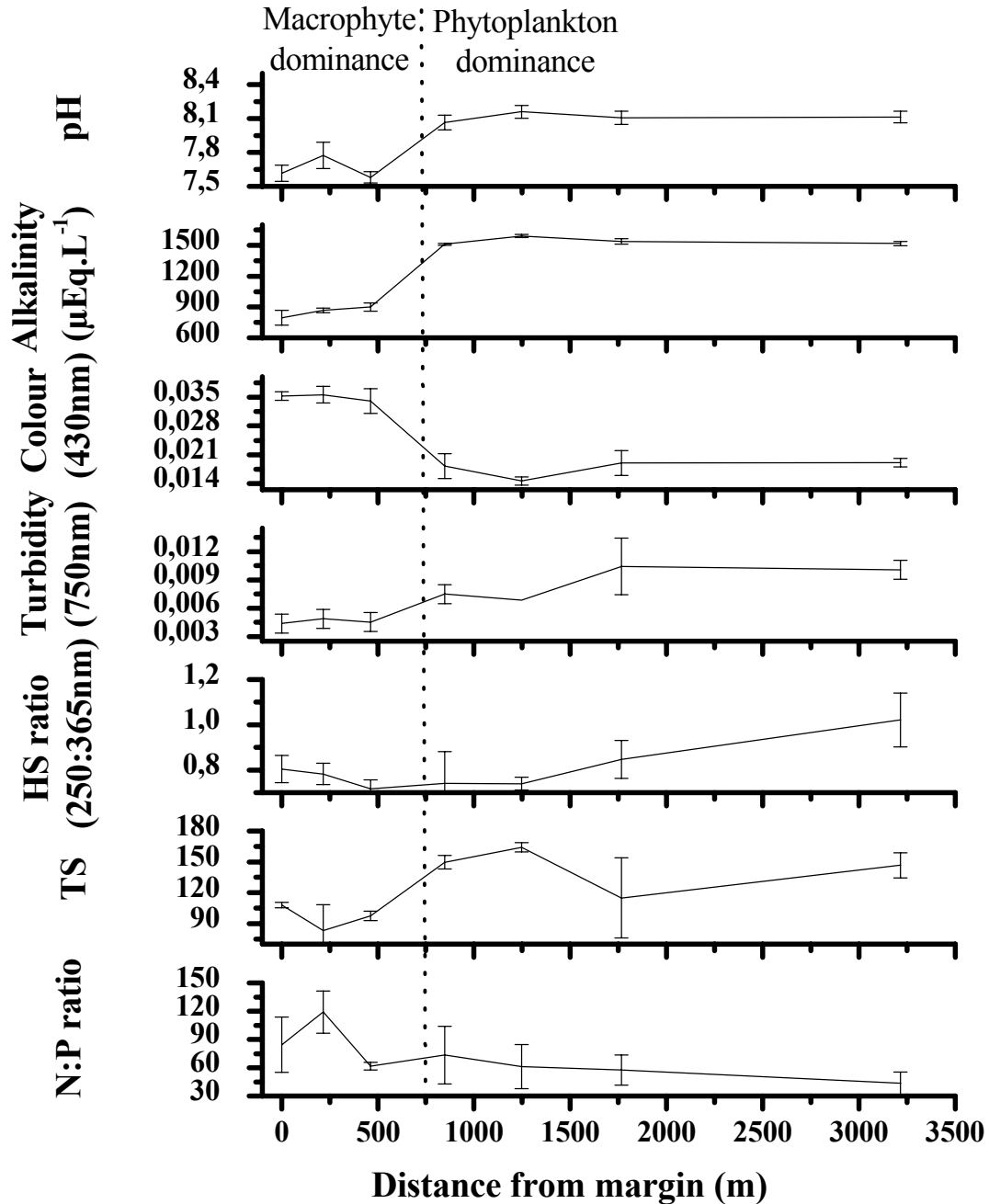
**Fig 3** Primary producer dominance shift assessed by macrophyte coverage (MC) and measures of phytoplankton biomass, chlorophyll a concentration and primary production in a transect from a littoral zone to a pelagic zone in a large subtropical coastal shallow lake. Standard deviations omitted for clarity. PP – primary production; Chla – chlorophyll a; MC – submersed macrophyte coverage

**Table 1** Nutrients, dissolved organic carbon and ratios between carbon and nutrients along a transect from a dense aquatic macrophyte dominated littoral zone to a pelagic zone dominated by phytoplankton in a large subtropical coastal shallow lake. Standard deviations (n =3) in parentheses.

	SP	Distance from margin	TN ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	NO <sub>3</sub> -N ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	NO <sub>2</sub> -N ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	NH <sub>4</sub> -N ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	TP ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	PO <sub>4</sub> -P ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	SiO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	DOC ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	DOC: PO <sub>4</sub> -P (mol:mmol)	DOC: NO <sub>3</sub> -N (mol:mmol)
Macrophyte dominance	1	0	637 (±326)	27 (±0,5)	2,0 (±0,01)	156 (±59)	16,1 (±2,6)	5,4 (±0,4)	2050 (±17)	10956 (±1506)	16100 (±1004)	2120 (±268)
	2	217	579 (±141)	27 (±0,2)	1,9 (±0,08)	108 (±48)	10,7 (±1,1)	4,6 (±0,6)	1963 (±72)	9709 (±809)	16674 (±2288)	1858 (±167)
	3	462	526 (±157)	36 (±2,9)	4,0 (±2,7)	84 (±9)	19,1 (±6,7)	11,7 (±5,4)	2057 (±47)	11947 (±501)	9047 (±3212)	1726 (±200)
Phytoplankton dominance	4	848	734 (±306)	28 (±0,8)	2,8 (±0,53)	81 (±3)	22,1 (±0,4)	13,3 (±1,9)	2327 (±51)	8983 (±1820)	5513 (±1724)	1675 (±347)
	5	1248	704 (±285)	27 (0,4)	3,0 (±0,28)	177 (±126)	25,3 (±0,5)	14,3 (±0,2)	2383 (±38)	7215 (±492)	3997 (±242)	1368 (±84)
	6	1765	744 (±203)	27 (±0,2)	3,0 (±0,27)	99 (±4)	28,7 (±1,2)	16,4 (±0,9)	2450 (±40)	14186 (±6496)	6859 (±3196)	2688 (±1209)
	7	3216	740 (±155)	27 (±0,2)	3,6 (±0,51)	126 (±25)	37,9 (±2,7)	19,7 (±2,4)	2490 (±20)	8693 (±1932)	3457 (±396)	1651 (±357)

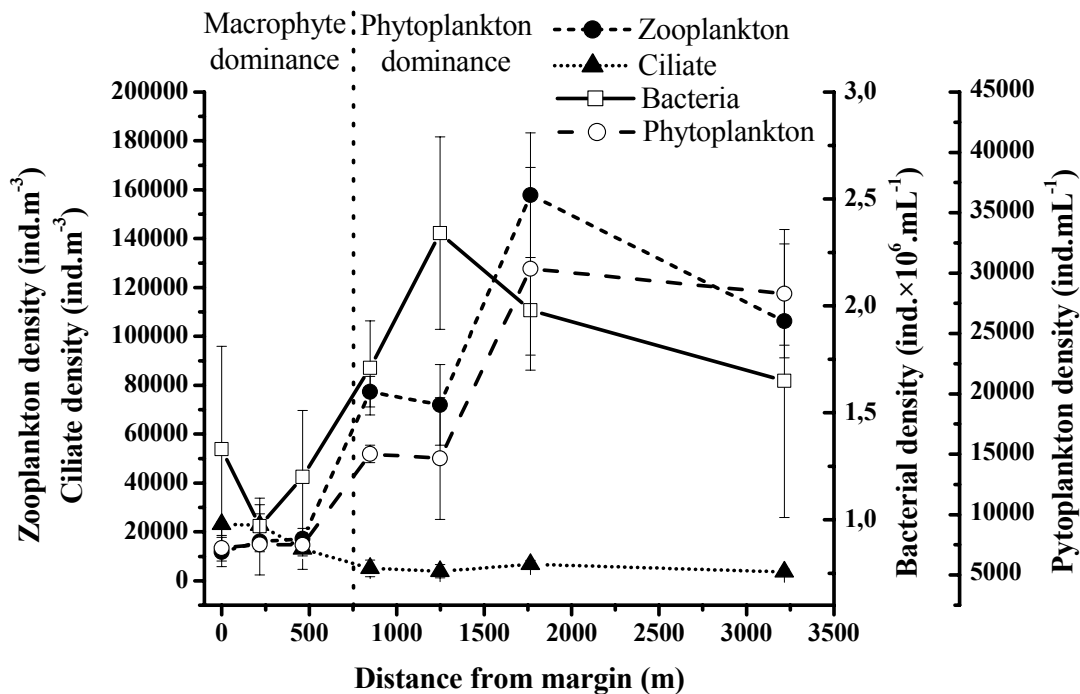
SP, sampling points; TN, total nitrogen; NO<sub>3</sub>-N, nitrate; NO<sub>2</sub>-N, nitrite; NH<sub>4</sub>-N, ammonium; TP, total phosphorus; PO<sub>4</sub>-P, reactive phosphorus; SiO<sub>2</sub>, silicate; DOC, dissolved organic carbon;

Physical and chemical main limnological variables varied strikingly along this gradient of primary producer dominance. Alk, pH, Turb, HS ratio and TS increased, while Col and N:P ratio decreased (Fig. 4).



**Fig. 4** Gradient for main limnological variables in the transect from a littoral dominated by macrophytes to a pelagic zone dominated by phytoplankton in a large subtropical coastal shallow lake. Bars represent standard deviations (n =3). HS ratio – humic substances ratio (250:365nm); TS – total solids; N:P ratio (total nitrogen : total phosphorus ratio)

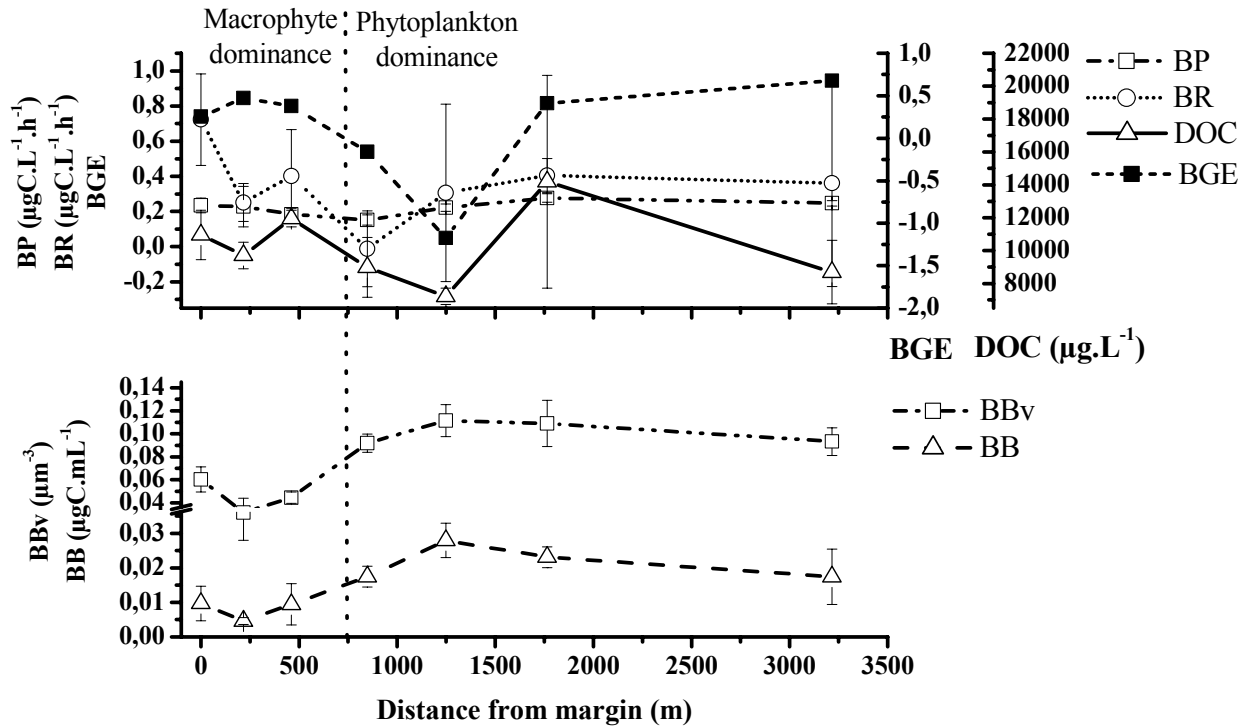
Along with the chemical and physical gradient observed, biological responses were detected to behave according to this gradient. Planktonic organisms presented a marked increase in their densities in the pelagic area, except for ciliates, that decreased slightly (Fig.5).



**Fig. 5** Density of major planktonic organisms along the transect of a macrophyte dominated littoral to a phytoplankton dominated pelagic zone in a large subtropical coastal shallow lake Bars represent standard deviations (n =3)

Bacterial metabolic variables also showed response to the gradient. Bacterial production ranged from 0,12 to 0,36  $\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  and tended to be slightly lower in littoral zone, while respiration was more erratic (range: 0,004 to 1,04  $\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), first decreasing in margin area, and then increasing and assuming a constant behavior along with bacterial production towards the pelagic zone. BGE was higher in both areas, reaching its lowest value right after the interface zone and resembling DOC. Bacterial biovolume and biomass were noticeably higher in phytoplankton dominated area (Fig. 6).

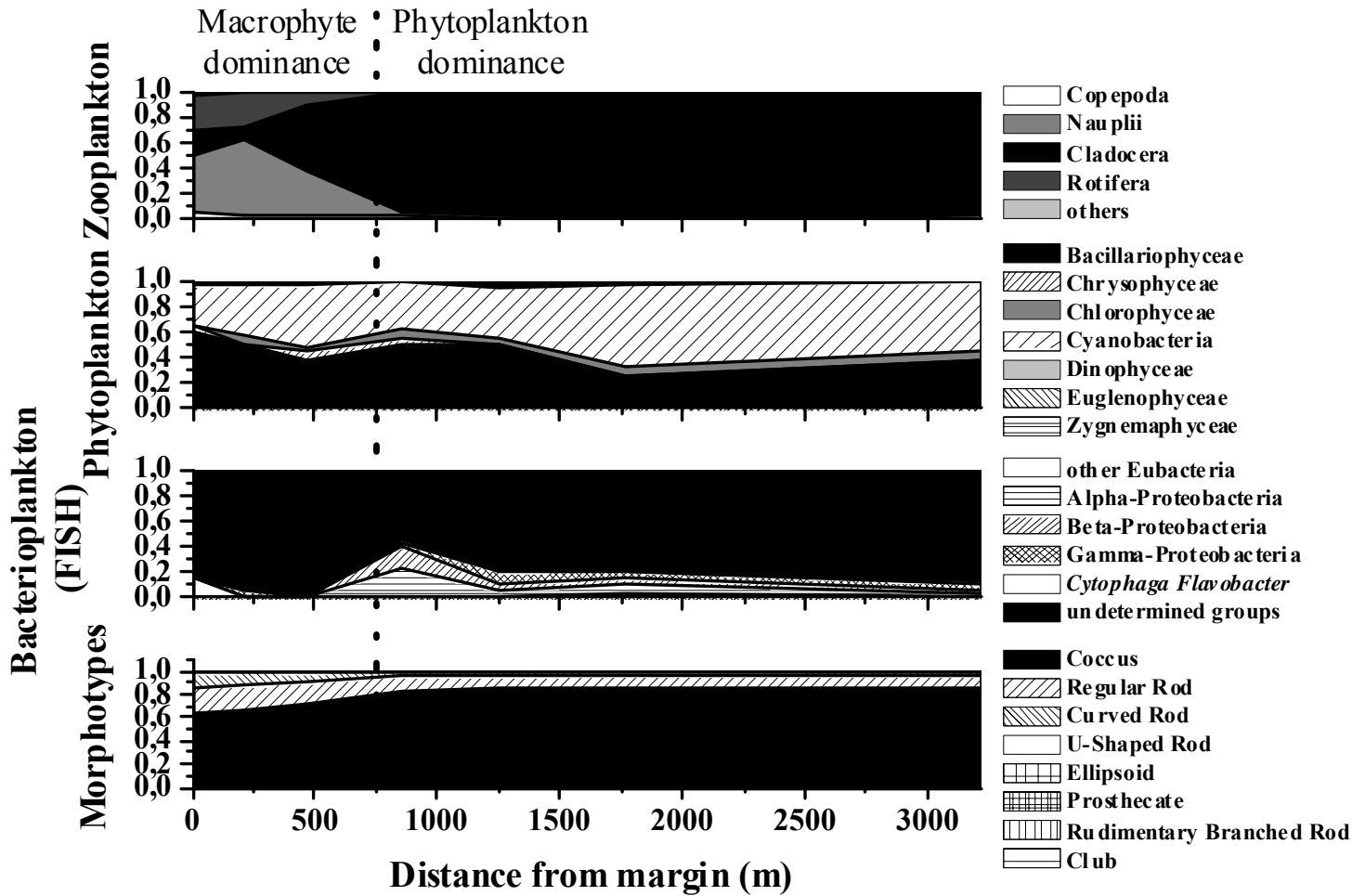
From the figures in Fig. 6 it can be drawn that an outstanding pool of carbon not utilized by bacteria accumulates in the system. There is in average approximately 18.000 times more carbon available than bacterial can consume (production + respiration) in a per hour basis.



**Fig. 6** Bacterial variables along the transect of a macrophyte dominated littoral to a phytoplankton dominated pelagic zone in a large subtropical coastal shallow lake. Bars represent standard deviations ( $n=3$ ). BP – bacterial production; BR – bacterial respiration; DOC – dissolved organic carbon; BGE – bacterial growth efficiency; BBv – bacterial biovolume; BB – bacterial biomass

Not only metabolic variations were found to behave as a function of this gradient, but also the relative distribution of major planktonic groups responded to this shift of primary producer dominance. Zooplankton becomes dominated by cladocerans while phytoplankton by Cyanobacteria and diatoms along the gradient. For bacterioplankton there are an increase in bacterial cells percentage and cocci forms, that dominates the samples in the pelagic zone (>80%) (Fig.7).

When tested for their predictive power against limnological, zooplankton and bacterioplankton variables, MC was a better predictor for these sets when compared to phytoplankton biomass. Among main limnological variables, TP, pH and Alk were confirmed to significantly decrease with macrophyte coverage. Total zooplankton and cladocerans density were strongly negatively affected, while rotifers and nauplii density were strongly positively associated with macrophyte coverage. When significantly associated with both MC and phytoplankton biomass, in almost all the cases the association was higher with MC. Bacterial density, biovolume, biomass and percentage of coccus decreased significantly with MC, while B:P ratio increased with phytoplankton biomass (Table 2).



**Fig. 7** Major groups percentual distribution of Zooplankton, Phytoplankton and Bacteria (phylotypes and morphotypes) along the transect of a macrophyte dominated littoral to a phytoplankton dominated pelagic zone in a large subtropical coastal shallow lake. Standard deviations (n=3) omitted

PCA plots of the sampling points separated by limnological, primary producers, zooplankton and bacterioplankton variables were good explanatory tools as they accounted for always >70% of the cumulative variance for first and second principal components. Outputs showed moderate agreement with the clustering of littoral and pelagic sampling points, and also confirmed the trends of the variables formerly stated (Fig. 8).

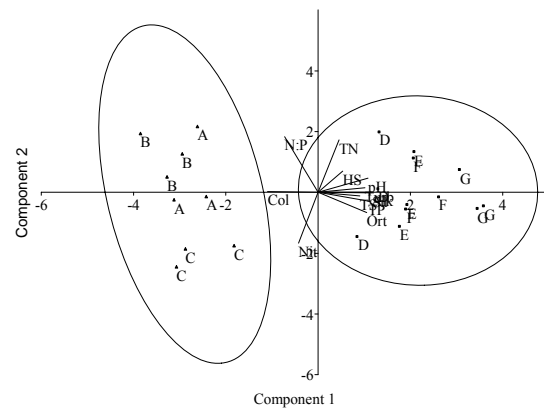


**Table 2** Replicated linear models (7 samplig points, 3 replicates per point) of limnological, planktological and bacterial variables predicted by macrophyte coverage and phytoplankton biomass

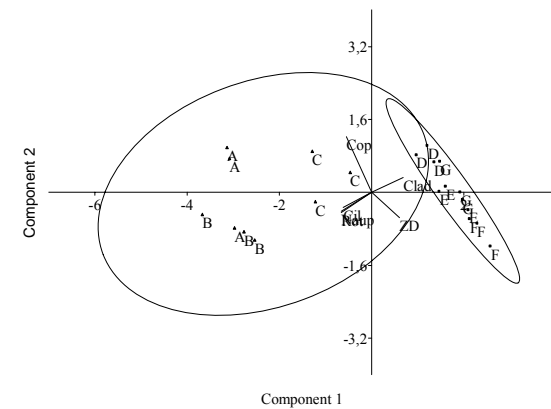
Response variables	Predictor variables					
	Macrophyte Coverage			Phytoplankton Biomass		
Limnological	R <sup>2</sup>	p	Significance	R <sup>2</sup>	p	Significance
<b>TN</b>	0,079	0,216	†	0,059	0,029	*
<b>TP</b>	-0,674	5,06×10 <sup>-6</sup>	***	0,400	0,002	*
<b>N:P</b>	0,337	0,005	*	-0,177	0,057	†
<b>pH</b>	-0,737	6,46×10 <sup>-7</sup>	***	0,895	0,002	*
<b>Alk</b>	-0,876	4,71×10 <sup>-10</sup>	***	0,461	0,0007	**
<b>TS</b>	-0,368	0,0036	*	0,577	0,014	*
<b>Col</b>	0,782	1,07×10 <sup>-7</sup>	***	-0,331	0,006	*
<b>Turb</b>	-0,628	1,86×10 <sup>-5</sup>	***	0,843	4,44×10 <sup>-9</sup>	***
<b>HS ratio</b>	-0,109	0,143	†	0,113	0,136	†
<b>DOC</b>	0,008	0,701	†	0,095	0,174	†
<b>DOC:PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	0,777	1,32×10 <sup>-10</sup>	***	-0,175	0,059	‡
<b>DOC:NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0,003	0,808	†	0,176	0,059	†
<b>Zooplankton</b>						
<b>Total density</b>	-0,723	1,05×10 <sup>-6</sup>	***	0,580	6,07×10 <sup>-5</sup>	***
<b>Nauplii</b>	0,886 <sup>log(x+1)</sup>	2,13×10 <sup>-10</sup>	***	-0,411	0,0017	*
<b>Cladocera</b>	-0,901	5,22×10 <sup>-11</sup>	***	0,415	0,0016	*
<b>Rotifera</b>	0,865	1,03×10 <sup>-9</sup>	***	-0,451 <sup>log(x+1)</sup>	0,0008	**
<b>Ciliates</b>	0,688	3,31×10 <sup>-6</sup>	***	-0,335	0,006	*
<b>Bacterial</b>						
<b>Density</b>	-0,365	0,0043	*	0,230	0,027	*
<b>Biovolume</b>	-0,560	3,96×10 <sup>-5</sup>	***	0,369	0,003	*
<b>Biomass</b>	-0,450	0,0003	**	0,269	0,016	*
<b>Production</b>	-0,011	0,656	†	0,035	0,418	†
<b>Respiration</b>	0,079	0,218	†	0,0005	0,924	†
<b>BGE</b>	0,012	0,640	†	0,0006	0,916	†
<b>B:P ratio</b>	0,370	0,0035	*	-0,430	0,0012	*
<b>Coccus (%)</b>	-0,843	4,58×10 <sup>-9</sup>	***	0,478	0,0003	**

1- (TN) total nitrogen; (TP) total phosphorus; (N:P) total nitrogen: total phosphorus; (Alk) Alkalinity; (TS) total solids; (Col) water colour; (Turb) Turbidity; (HS ratio) humic substances ratio; (DOC) dissolved organic carbon; (PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>) reactive phosphorus; (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nitrate; (BGE) bacterial growth efficiency; (B:P ratio) bacterial biomass:phytoplankton biomass ratio; (Coccus %) percentage of the morphotype coccus in the sample.

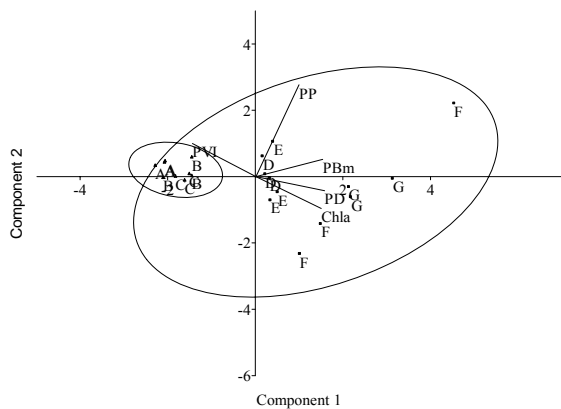
2- Significance adopted at  $\alpha = 0,05$ ; (\*) - significative ( $\alpha < 0,05$ ); (\*\*) - highly significative ( $\alpha < 0,001$ ); (\*\*\*) – strongly significative ( $\alpha < 0,0001$ ); (†) - non significative; (‡) - invalid regression model; (<sup>log(x+1)</sup>) model valid after transformation. Each regression with 1 and 19 degrees of freedom



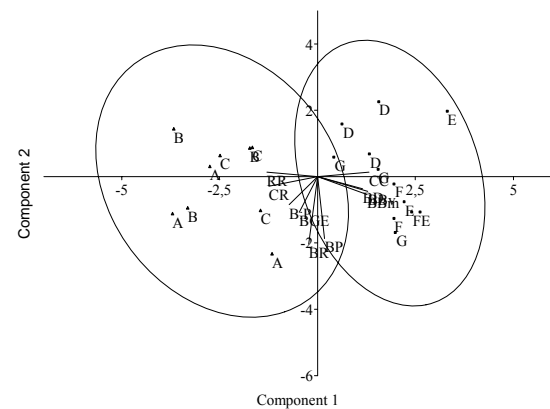
**Limnological**



**Primary Producers**



**Zooplankton**



**Bacterioplankton**

**Fig. 8** PCA biplots of the 7 sampling points (for clarity represented ordered as A-G , in triplicates). (Limnological): Sil - silicate, TN – total nitrogen, TP – total phosphorus, Ort - reactive phosphorus, Nit - nitrate, N:P – total nitrogen:total phosphorus ratio, pH, Alk - Alkalinity, Col – water colour, Turb - turbidity, HS – HS ratio, TS – total solids. PC1 – 59,34% and PC2 – 14,5%. (Primary producers): PVI – macrophyte coverage, PP – primary production; PBm – phytoplankton biomass; PD – phytoplankton density; Chla – chlorophyll a. PC1 – 74,72% and PC2 – 15,89%. (Zooplankton): ZD – zooplankton density; Cop – copepods; Naup – nauplii; Clad – cladocerans; Rot – rotifers; Cil – ciliates. PC1 – 82,43% and PC2 – 8,54%. (Bacterioplankton): BD – bacterial density; BBv – bacterial biovolume; BBm – bacterial biomass; BP – bacterial production; BR – bacterial respiration; BGE – bacterial growth efficiency; CC – coccus percentage; RR – regular rod percentage; CR – curved rod percentage. PC1 – 54,57% and PC2 – 16,17%

## 4 Discussion

As expected for our first hypothesis, a consistent gradient of alternance of macrophyte to phytoplankton dominance was found along the transect sampled. This was consistent with the former proposal of the presence of multi-scale gradients of primary production in shallow lakes (Wetzel 1992) and spatial patchiness (Fragoso et al., in press).

The main importance of the formation of these biological gradients is that chemical, physical and metabolical gradients are generated (Wetzel 1992). Macrophytes are good competitors for nutrients, (Huss and Wehr 2004; Rooney and Kalff 2003), specially phosphorus (Barko and James 1998). This element has received a lot of attention giving its common association with macrophyte presence (Wetzel 1992). Still, it is yet a poorly understood subject (Rooney and Kalff 2003).

Our results showed a consistent negative effect of macrophytes on most of nutrients concentrations along the transect. As far as phosphorus is concerned, one first attempt to associate lower metabolic responses of bacteria with area margins could be assuming phosphorus deprivation. This pattern of phosphorus limitation caused by macrophytes has been reported elsewhere (Huss and Wehr 2004).

Nonetheless, nutrient deprivation does not seem to be the case. A survey in seven brazilian lakes presented total phosphorus concentration quite similar and dissolved organic carbon concentration all lower to that found for Mangueira lake. Though, they supported much higher primary production (range for superficial samples:  $3,0 - 523,5 \text{ mgC.m}^{-3}.\text{L}^{-1}$ ) and a fivefold higher bacterial production (range for superficial samples:  $0,5 \times 10^{-3}$  to  $1,84 \text{ }\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) (Petrucio et al. 2006) than what we found in the present study. Further supporting evidence comes from another recent report on 10 lakes in Winsconsin (USA). Also similar values of total phosphorus and DOC were associated with a range of bacterial production from 0,05 to  $1,01 \text{ }\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (recalculated from Kritzberg et al. 2005), a threefold figure compared to our maximal bacterial production estimate. When compared with a broader data set, bacterial production was confirmed to be far below minimal values reported for other warm, shallow lake ( $9,0 \text{ }\mu\text{gC.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  in Chrzanowski and Hubbard, 1989).

Bacterial production is better interpreted in terms of BGE, since production itself says little about the amount of bacterial carbon that enters the trophic web and at the other side that is lost through respiration. Moreover, it is known that BGE increases with productivity, and low values of BGE are related to high maintenance costs of low concentrations of DOC and nutrients (del Giorgio and Cole 1998). If one assumes that productivity increases in direction of increasing algal biomass and also towards increasing macrophyte coverage (Wetzel 1992), BGE pattern found was consistent

with the hypothesis that BGE increases with productivity. Furthermore, in our data set, BGE resembled DOC behavior along the gradient, what is consistent with the previous assumption.

Stanley et al. (2003) found little influence of macrophytes on bacterial productivity zonation, but in contrast estimated that macrophytes could provide numbers as high as 96% of total carbon supply for bacterial production. This apparently contradiction with our findings arises from the fact that their study site constitutes a pond, below 1ha, and a very small pelagic zone which prevents phytoplankton growth. This suggests higher horizontal homogeneity and consequently unlikely detectable zonation.

Putting all together, even tough substrates (nutrients and carbon) are not limiting for bacterial and algal primary production, a macrophyte mediated inhibition can operate trough release of allelopathic and by humic substances, which was found to be two times higher in the macrophyte dominance area. Nevertheless, the fact that BGE in littoral zones is as high as in pelagic areas is apparently in contradiction with the early supposition that bacteria would be inhibited by macrophyte presence, since a higher BGE in pelagic zones was expected, once BGE high reliance upon algal derived DOC has been shown by Kritzberg et al. (2005). This could be derived by the fact that BR is also very low for all data records, what could be by itself further evidence of bacterial inhibition.

Organic acids originated by macrophyte leachates (Farjalla et al. 2001) can be one of the explanations for the pH and Alkalinity consistently lower in macrophyte areas. Since this lake is from marine origin and has depositions of carbonated shells, pH values have been recorded in this lake as high as 9 in pelagic areas (unshown results). Only high loadings of organic acids could explain such an effect on pH.

Two possible ways of negative effects of macrophytes need to be discriminated here, since type of macrophyte (emergent, floating or submersed) can play a different role in biological inhibition. Submersed macrophytes have been linked to the production of allelopathic compounds (Leu et al. 2002; Gross et al. 2007; Körner and Nicklisch 2002; van Donk and van de Bund 2002; Leu et al. 2002; Mulderij et al. 2007), while emergent macrophytes, for their structural tissues, possess relative amounts of lignified and cellulosic tissues that resemble more terrestrial plants, specially emergent macrophytes. As a consequence, organic leachates from these macrophytes are rich in humic substances (Wetzel 1992).

Another further evidence that humic substances can be an important factor in Mangueira Lake is the fact that even tough one of the largest lakes in Brazil, which determines a lower ratio of littoral to pelagic zone compared to smaller lakes, the massive presence of wetlands dominated by emergent macrophytes determine at least four times more humic substances concentrations, as assessed by HS ratio, when compared to other lakes already surveyed also in Rio Grande do Sul

state (Haig-They et al. in preparation) or other systems in Brazil (Amado et al. 2006). Effectively, the combined indication of low bacterial production and respiration values with the large pool of carbon available shows that inhibition of bacteria can be larger than at first view may seem, because even in the pelagic zone, bacterial utilization of primary production algal- derived carbon never exceeded 4%. This weak coupling between bacterial and algal production have been reported and among the explanations are allochthonous sources of carbon to bacteria, but macrophytes have been considered as important non algal autochthonous source of carbon also (Findlay et al. 1991).

We were expecting to find a higher carbon concentration in the littoral zone, driven by the hypothesis that macrophytes are more productive than phytoplankton (Wetzel 1992). Indeed, carbon concentration showed an abrupt drop in concentration after the transition zone, what indicates that dissolved carbon production is higher in well defined dominance area. Since this is a wind-governed system (Fragoso Jr. et al., in press), and additionally the water masses move northwards, as the only point where the water leaves the system is in the northern part of the lake, it is expected that part of the carbon derived by macrophytes enters the pelagic zone. This is also in accordance with an extended chemical effect of macrophytes on bacterioplankton, since the pelagic zone sampled is in the dispersion direction of the water masses that come from the wetland in the south.

Important structural changes in planktonic organisms were observed along the transect. For rotifers and nauplii, there seemed to be either a neutral or a positive effect of the humic substances, for they practically only occur at margin sites. They either probably not depend strictly on bacterial biomass, because they do not respond to increasing in bacterial abundance along the gradient or they do control bacterial numbers in margin areas, but do not increase in numbers in pelagic areas because of increasing predation. Other possible explanation would be that this are spawning areas or refugia for them. For daphnids, however, active avoidance of macrophytes seems to occur in subtropical lakes (Meerhoff et al. 2006). Cladocerans did increase along the transect, primarily by macrophyte inhibition, since their density is more associated with macrophyte coverage, but also as a function of algal biomass increase. This can be viewed by the fact that zooplankton and phytoplankton densities are tightly coupled and most of zooplankton density is a function of cladocerans dominance in pelagic area.

Experimental evidence support that macrophytes cascading effects ultimately affect microbial organisms first structuring metazooplankton, specially daphnids and rotifers (Jürgens and Jeppesen 2000). Macrophyte chemicals can reduce reproductive success of *Daphnia* (Burks et al. 2000), but previous report on a minor role of macrophytes in horizontal distribution of cladocerans exists (Lauridsen et al. 2001), what is inconsistent with our data. This needs to be further investigate, since this study was done in arctic lakes, and latitudinal differences arise as an important factor to be taken into account.

For phytoplankton, Cyanobacteria dominance in the pelagic zone is in accordance with the expectation with increasing phosphorus concentration, since under permanent turbulence (wind governed, like Mangueira), like in shallow, unstratified lakes, this group can be a normally dominant r-strategist, specially in high pH values and low N:P ratios, that is the case in the pelagic area (Steinberg and Hartmann 1988). Dominance by Cyanobacteria have been already reported for Mangueira Lake (Crossetti et al., 2007).

Like zooplankton and phytoplankton patterns, instead of a gradual behave of the bacterial assembly along the transect, what was observed is that probably two distinct assemblies live apart in this very short scale. This can be visualized by the phylotype distribution. There are very low countings of Bacteria in margin area, and this proportion is first hampered in the interface zone, and then reaches a relative stability of the groups in the pelagic zone. Report on responses of taxon richness for  $\alpha$ - ,  $\beta$ -proteobacteria and *Cytophaga Flavobacter* along a primary productivity gradient predicts that  $\alpha$ -proteobacteria has U-shaped pattern,  $\beta$ - proteobacteria exhibits no patterns, and *Cytophaga Flavobacter* presents unimodal response (Horner-Devine et al. 2003). We have not assessed such a low taxonomic resolution, but in our results showed a unimodal behavior of  $\alpha$ - ,  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria, with higher abundance around the interface zone. It is not possible to distinguish between taxon richness or simply abundance effect, given the low resolution of the probes employed, but we rather hypothesize these interface zone as an important spot to be also looked at when addressing microbial diversity questions.

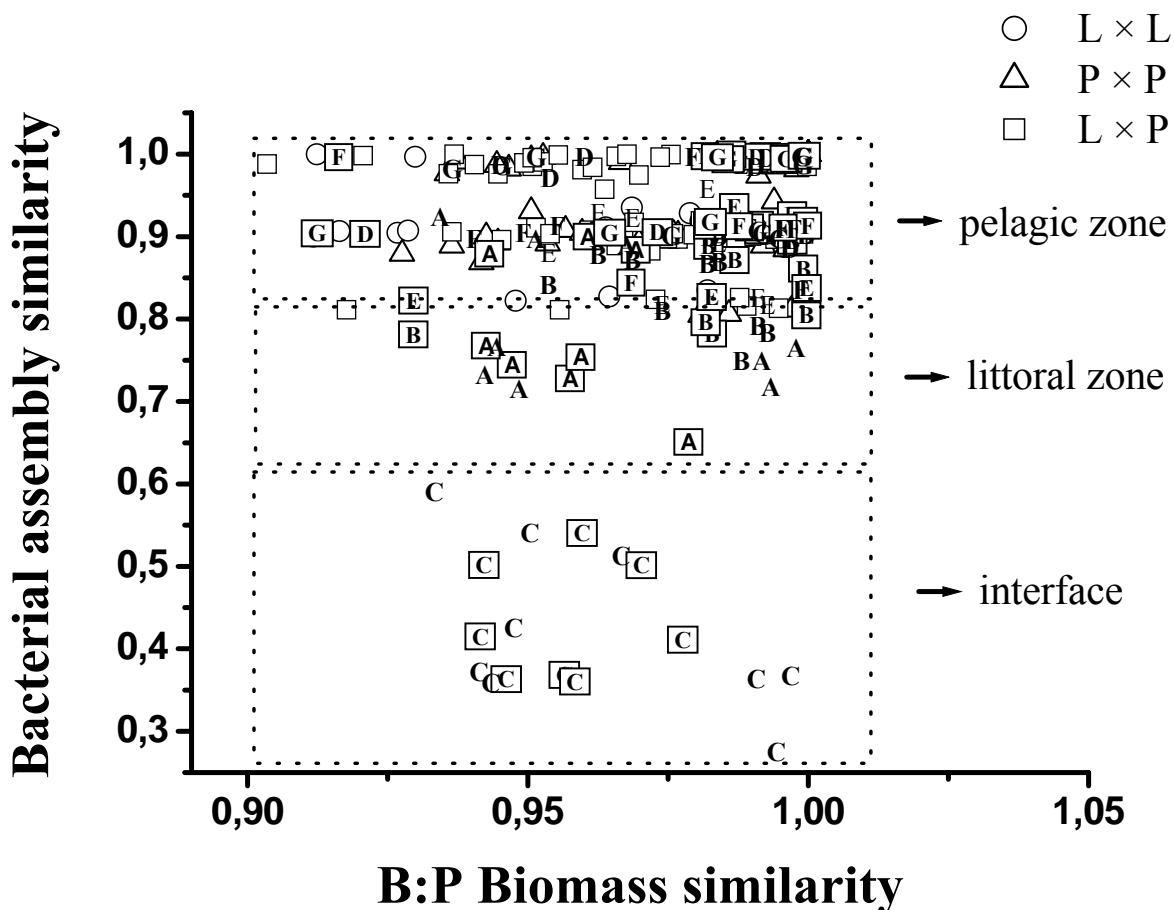
Bacterial morphotypes also show a consistent shift to an increase in coccus forms in pelagic area, what can be predicted from a competition with phytoplankton model (Cotner and Biddanda 2002; Danger et al. 2007). Increasing in coccus forms have been found to be associated with more eutrophic areas, given the higher ratio of surface:volume, which enhances competition for nutrients capability of bacteria (Racy 2004).

Higher ciliate density can be another explanation for lower bacterial density and biovolume in margin areas (Pace and Cole 1994), but low metabolism matches better with chemical inhibition and with competition with phytoplankton, because peak of bacterial abundance does not coincide with peak of phytoplankton abundance. Nonetheless, a higher cascading effect of zooplankton on microbial organisms and phytoplankton in littoral zone has been hypothesized to occur in highly vegetated lakes (Jeppesen et al. 2002), since there are reports on influence of cladocerans on bacterioplankton, either directly through bacterivory (Kamjunke et al. 1997) or indirectly through grazing on bacterivorous flagellates (Sanders and Porter 1990), especially for *Daphnia*, genus that occurs in the Mangueira Lake.

Since macrophyte coverage turned to be a better predictor for many limnological and biological variables than phytoplankton biomass, and there is consistent evidence that macrophyte

covered littoral areas and phytoplankton dominated pelagic areas may constitute niches apart from rather ubiquitous plankters, it is reasonable to state that the general assumptions of horizontal homogeneity made in previous sampling designs can lead to important bias when working with metabolism or even diversity of organisms. This was further confirmed by PCA plots, that separated better limnological variables and showed a trend to separate bacterioplankton and phytoplankton variables, according to these zones.

Another important way that aquatic macrophytes can structure bacterioplankton is through influence on the ratio of bacterial to phytoplankton biomass (B:P Biomass), since at low values of this ratio competition with phytoplankton (Cotner and Biddanda 2002) can determine inadequate conditions of bacterial metabolism. In a previous work, bacterial assembly similarity assessed by FISH with the same phylotypes employed in the present data for Mangueira Lake were carried in nine lakes (13-222 ha) of the coastal plain of Rio Grande do Sul state. This technique has been argued to be linked also to physiological status of the cells, rather than diversity itself (Bouvier and del Giorgio 2003), what was corroborated by this work for these lakes (Haig-They et al., in preparation). Increasing in B:P Biomass ratio similarity increased significantly bacterial assembly diversity assessed by FISH in comparisons between littoral zones ( $R^2 = 0,59$   $n = 45$   $p < 0,0001$ ) and in comparisons between littoral and pelagic zones ( $R^2 = 0,34$   $n = 81$   $p = 0,0016$ ), but not between pelagic zones only ( $R^2 = 0,20$   $n = 45$   $p = 0,18$ ). These results may be explained on the basis that in pelagic zones the influence of macrophytes on phytoplankton biomass is lower and therefore pelagic zones tend to be relatively homogeneous across the lakes for this variable. When the similarity between littoral and pelagic zone of each lake was compared to our sampling stations, an interesting pattern was found (Fig. 9). All littoral and pelagic zones had striking little resemblance of assembly composition with station C, that is near the interface of the transect. A number of littoral and pelagic areas resembled our littoral zones stations (A and B) and most of them were similar to our pelagic stations (D-G) (Fig. 9).



**Fig. 9** Bacterial assembly similarity × B:P Biomass similarity in 9 lakes of the coastal plain of Rio Grande do Sul State (Brazil). Symbols refer to comparisons among the lakes only: between littoral zones (L×L), between pelagic zones (P×P) and between littoral and pelagic zones(L×P) in the coastal plain of Rio Grande do Sul state (Haig-They et al., unpublished data). Letters refer to similarity between littoral (inside boxes) and pelagic zones (not surrounded by boxes) of each of these lakes and each sampling point of the Mangueira lake transect. Sampling points A – G.

These patterns indicate that interface zones between well defined macrophyte and phytoplankton dominance zones in smaller lakes can be quite weak, or even inexistent, even though littoral and pelagic zones do differ for some of these lakes, otherwise there would not be a significant gradient of low to high similarities following the patterns of the sampling points transect.

One recent branch of research has been dealing with bacterial biogeographic questions, and particularly the debate is if local factors are better predictors than biogeographical ones (see Methé and Zehr 1999; Lindström and Leskinen 2002; Horner-Devine et al. 2004; Bell et al. 2005; Lindström et al. 2005; Reche et al. 2005; Yannarell and Triplett, 2005; Green and Bohannan 2006; Martiny et al. 2006; Crump et al., 2007; van der Gucht et al. 2007). Our findings support that local factors (small scale) have important implications for bacterial variability and this need to be taken into account in sampling designs concerning such subjects when addressing functionality and community dynamics. The strong synchrony between phyto- and bacterioplankton reported by



(Kent et al. 2007) seems not to apply to our data, since macrophyte influence was stronger and competition with phytoplankton arised as an important factor in this complex interaction.

## **5 Conclusions**

Our data supported the hypothesis of formation of biological gradients mediated by primary producer dominance type in a large, coastal shallow lake largely influenced by macrophytic vegetation. This gradient presented changes in nutrients concentrations and important limnological variables. For organisms, rather than a continuous change, there was found the presence of two distinct habitats to plankton organisms, that varied in composition and abundance in the two sites, associated rather with macrophyte coverage. Zooplankton and phytoplankton abundances increased markedly along the gradient and showed also assembly structural changes. Cladocerans became the dominant organisms in the pelagic area, being tightly coupled to phytoplankton, that at its turn shifted to a dominance by Cyanobacteria and Bacillariophyceae. Bacteria showed higher abundance, biovolume and biomass in pelagic areas, being inhibited by humic substances and ciliate predation in margin areas. Phylotypic and morphotypic diversity indicate that different bacterial assemblies live apart in these two zones. This could be visualized also by Bacterial Growth Efficiency, that increased in the two zones away from the interface. These data underlie the importance of small scale habitat heterogeneity in local structuring potentially widespread planktonic organisms and cast some light into the bacterial biogeographic current debate.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the brazilian agency CNPq/MCT (Taim Hydrological System, Site 7, part of the brazilian network of Long Term Ecological Research (PELD)). Special thanks to the Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Ufrgs. The authors also gratefully thank to Luciane Crossetti for phytoplankton analyses and Laura Utz for inestimable help with ciliates handling.

## 6 References

- Amado AM, Farjalla VF, Esteves FA, Bozelli RL, Roland F, Enrich-Prast A (2006) Complementary pathways of dissolved organic carbon removal pathways in clear-water Amazonian ecosystems: photochemical degradation and bacterial uptake. *FEMS Microbiol Ecol* 56:8-17
- American Public Health Association (APHA) (1999) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association Inc Washington D. C.
- Anesio AM, Theil-Nielsen J, Granéli W (2000) Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microb Ecol* 40:200-208
- Barko JW, James WF (1998) Effects of submerged aquatic macrophytes on nutrient dynamics, sedimentation and resuspension. *Ecol Stud* 131:197–214
- Bell T, Ager D, Song J-I, Newmann JA, Thompson IP, Lilley AK, van der Gast CJ (2005) Larger islands house more bacterial taxa. *Science*. 308:188
- Bouvier T, del Giorgio PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microb Ecol* 44:3-15
- Braun-Blanquet J (1964) *Pflanzensoziologie*, 3rd edn. Vienna, New York. 865p
- Burks RL, Jeppesen E, Lodge DM (2000) Macrophyte and fish chemicals suppress *Daphnia* growth and alter life-story traits. *Oikos* 88:139-147
- Canfield DE, Shireman Jr JV, Colle DE, Haller WT, Watkins II CE, Maceina MJ (1984) Prediction of chlorophyll *a* concentrations in Florida lakes: importance of aquatic macrophytes. *Can. J. Aquat. Sci* 41: 497–501
- Chrzanowski TH, Hubbard JG (1989) Bacterial utilization of algal extracellular products in a southwestern reservoir. *Hydrobiologia* 179:61-71
- Cole JJ (1999) Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems* 2:215-225
- Cotner JB, Biddanda BA (2002) Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105-121
- Cottingham KL, Lennon JT, Brown BL (2005) Knowing when to draw the line: designing more informative ecological experiments. *Front Ecol Environ* 3(3):145-152
- Crossetti LO, Cardoso LS, Callegaro VLM, Alves-da-Silva SM, Werner VR, Rosa ZM, Motta-Marques D (2007) Influence of the hydrological changes on the phytoplankton structure and dynamics in a subtropical wetland-lake system. *Acta Limnol Bras* 19(3):315-329
- Crump BC, Adams HE, Hobbie JE, Kling GW (2007) Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an arctic tundra catchment. *Ecology* 88(6):1365-1378
- Danger M, Leflaive J, Oumarou C, Ten-Hage L, Lacroix G (2007) Control of phytoplankton-bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos* 116:1079-1086

- Daniel C, Granéli W, Kritzberg ES, Anesio AM (2006) Stimulation of metazooplankton by photochemically modified dissolved organic matter. *Limnol Oceanogr* 51(1):101-108
- del Giorgio PA, Cole JJ, Cimleris A (1997) Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385:148-151
- del Giorgio PA, Cole J (1998) Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu Rev Ecol Syst* 29:503-541
- Duarte CM, Agusti S (1998) The CO<sub>2</sub> balance of unproductive aquatic ecosystems. *Science* 281:234-236
- Farjalla VF, Anesio AM, Bertilsson S, Granéli W (2001) Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: abiotic transformations and bacterial response. *Aquat Microb Ecol* 24:187-195
- Findlay S, Pace ML, Lints D, Cole JJ, Caraco NF, Peierls B (1991) Weak coupling between bacterial and algal production in a heterotrophic system: The Hudson River estuary. *Limnol Oceanogr* 36(2):268-278
- Fischer H, Pusch M (2001) Comparison of bacterial production in sediments, epiphyton and the pelagic zone of a lowland river. *Freshw Biol* 46:1335-1348
- Fragoso Jr CRC, Motta-Marques DM, Collischonn WW, van Nes EV Modelling spatial heterogeneity of phytoplankton in Lake Mangueira, a large shallow subtropical lake in south Brazil. *Ecol Model* (in press)
- Garnier J, Benest D (1990) Seasonal coupling between phyto- and bacterioplankton in a sand pit lake (Créteil lake, France). *Hydrobiologia* 207:71-77
- Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65(8):3721-3726
- Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MAM (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*, 2nd edn. Billing & Sons Limited Guildford, Great Britain, 214p.
- Gotelli NJ, Ellison AM (2004) The analysis of multivariate data. In: *A primer of ecological statistics*. Sinauer, USA, pp383-445, 510p.
- Green J, Bohannan BJM (2006) Spatial scaling of microbial diversity. *Trends Ecol Evol* 21(9):501-507
- Gross EM, Hilt (nee Körner) S, Lombardo P, Mulderij G (2007) Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton – state of the art and open questions. *Hydrobiologia* 584:77-88
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Palaentological statistics software package for education and data analysis. *Palaentol Electron* 4(1), 9pp
- Hillebrand H, Dürseken D, Kirschiel D, Pollingher U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol* 35:403-424

- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH, Bohannon BJM (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecol Lett* 6:613-622
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannon BJM (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432:750-753
- Huss AA, Wehr JD (2004) Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria spiralis*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake. *Microb Ecol* 45:305-315
- Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, Christoffersen K, Theil-Nielsen J, Jürgens K (2002) Cascading trophic interactions in the littoral zone: an enclosure experiment in shallow lake Stigsholm, Denmark. *Arch für Hydrobiol* 153(4):533-555
- Jespersen A-M, Christoffersen K (1987) Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. *Arch für Hydrobiol* 109(3):445-454
- Jürgens K, Jeppesen E (2000) The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *J Plankton Res* 22(6):1047-1070
- Kamjunke N, Böing W, Voigt H (1997) Bacterial and primary production under hypertrophic conditions. *Aquat Microb Ecol* 13:29-35
- Karlsson J, Jansson M, Jonsson A (2002) Similar relationships between pelagic primary and bacterial production in clearwater and humic lakes. *Ecology* 83(10):2902-2910
- Kent AD, Yannarell AC, Rusak JA, Triplett EW, McMahon KD (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *Int Soc Microb Ecol* 1:38-47
- Kepner RLJR, Pratt JR (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev* 58(4):603-615
- Kirchman D (2001) Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: Paul JH (ed) *Methods in microbiology* v.30. Academic Press, USA, pp 227-237
- Körner S, Nicklisch A (2002) Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *J Phycol* 38:862-871
- Kritzberg ES, Cole JJ, Pace MM, Granéli W (2005) Does autochthonous primary production drive variability in bacterial metabolism and growth efficiency in lakes dominated by terrestrial C inputs? *Aquat Microb Ecol* 38:103-111
- Lange HJ, Morris DP, Williamson CE (2003) Short ultraviolet photodegradation of DOC may stimulate freshwater food webs. *J Plankton Res* 25(1):111-117
- Lauridsen T, Jeppesen E, Landkildehus F, Søndergaard M (2001) Horizontal distribution of cladocerans in arctic Greenland lakes – impact of macrophytes and fish. *Hydrobiologia* 442:107-116
- Lauster GH, Hanson PC, Kratz TK (2006) Gross primary production and respiration differences among littoral and pelagic habitats in northern Wisconsin lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 63:1130-1141

- Leu A, Krieger-Liszkay A, Goussias C, Gross EM (2002) Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* inhibit photosystem II. *Plant Physiol* 130:2011-2018
- Lindström ES, Leskinen E (2002) Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of the 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microb Ecol* 44:1-9
- Lindström ES, Kamst-Van A, Zwart G (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl Environ Microbiol* 71(12):8201-8206
- Liu J, Dazzo FB, Glagoleva O, Yu B, Jain AK (2001) CMEIAS: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microb Ecol* 41:173-194
- Mackereth FJH, Heron J, Talling JF (1989) *Water analysis: some revised methods for limnologists*. 2nd edn. Freshwater Biological Association, Ambleside
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Furhman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR, Morin PJ, Naeem S, Øvreås L, Reysenbach A-L, Smith VH, Staley JT (2006) Microbial Biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature* 4:102-112
- Massana R, Gasol JM, Bjørnsen PK, Black-Burn N, Hagström Å, Hietanen S, Hygum BH, Kuparinen J, Pedrós-Alió C (1997) Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Scia Mar* 61(3):397-407
- Meerhoff M; Fosalba C, Bruzzone C, Mazzeo N, Noordoven W, Jeppesen E (2006) An experimental study of habitat choice by *Daphnia*: plants signal danger more than refuge in subtropical lakes. *Freshwater Biology* (51):1320-1330
- Méthé BA, Zehr JB (1999) Diversity of bacterial communities in Adirondack lakes: do species assemblages reflect lake water chemistry? *Hydrobiologia* 401:77-96
- Mulderij G, Van Nes EH, Donk EV (2007) Macrophyte-phytoplankton interactions: the relative importance of allelopathy versus other factors. *Ecol Model* 204:85-92
- Münster U, Chróst RJ (1990) Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter. In: Overbeck J, Chróst RJ (eds.) *Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches*. Springer-Verlag New York Inc., New York, pp8, 190p
- Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, USA, pp339-345, 777p
- Pace ML, Cole JJ (1994) Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *FEMS Microb Ecol* 28:181-193
- Pernthaler J, Frank-Oliver G, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Paul JH (ed) *Methods in microbiology*. v.30, USA, Academic Press, pp 207-226

- Petrucio MM, Barbosa FAR, Furtado ALS (2006) Bacterioplankton and phytoplankton production in seven lakes in the Middle Rio Doce basin, south-east Brazil. *Limnologica* 36:192-203
- Racy FPP (2004) Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios. Master Thesis (Universidade Federal de São Carlos). pp65
- Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microb Ecol* 62:142-160
- Reche I, Pulido-Villena E, Morales-Baquero R, Casamayor EO (2005) Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? *Ecology* 86(7):1715–1722
- Robarts RD, Zohary T, Waiser MJ, Yacobi YZ (1996) Bacterial abundance, biomass, and production in relation to phytoplankton biomass in the Levantine Basin of the southeastern Mediterranean sea. *Mar Ecol Prog Ser* 137:273-281
- Roland F, Caraco NF, Cole JJ, del Giorgio PA (1999) Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: evaluation of interference from color and turbidity *Limnol Oceanogr* 44(4):1148-1154
- Rooney N, Kalff J (2003) Submerged macrophyte-bed effects on water-column phosphorus, chlorophyll a, and bacterial production. *Ecosystems* 6:797-807
- Sanders RW, Porter KG (1990) Bacterivorous flagellates as food resources for the freshwater crustacean zooplankter *Daphnia ambigua*. *Limnol Oceanogr* 35(1):188-191
- Scheffer M, Jeppesen E (1997) Alternative stable states. In: Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, Christoffersen K (eds) *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer-Verlag Inc, New York, pp397-406
- Scheffer M, Hosper SH, ML, Moss Meijer B, Jeppesen E (1993) Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol Evol* 8(8):275–279
- Smith DC, Azam F (1992) A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in sea water using 3H-leucine. *Mar Microb Food Webs* 6: 107-109
- Simon M, Cho BC, Azam F (1992) Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar Ecol Prog Ser* 86:103-110
- Søndergaard M, Moss B (1997) Impact of submerged macrophytes on phytoplankton in shallow freshwater lakes. In: Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M, Christoffersen K (eds) *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer-Verlag Inc, New York, pp115-132
- Stanley EH, Johnson MD, Ward AK (2003) Evaluating the influence of macrophytes on algal and bacterial production in multiple habitats of a freshwater wetland. *Limnol Oceanogr* 48(3):1101-1111
- Steinberger CEW, Hartmann HM (1988) Planktonic bloom-forming Cyanobacteria and the eutrophication of lakes and rivers. *Freshw Biol* 20(2):279-287

- Sun J, Liu D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 25:1331-1346
- Strome DJ, Miller MC (1978) Photolytic changes in dissolved humic substances. *Ver Int Ver Theoret Angew Limnol* 20:1248-1254
- Vadeboncoeur Y, Zanden MJV, Lodge DM (2002) Putting the lake back together: reintegrating benthic pathways into lake food web models. *Bioscience* 52(1):44-54
- van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM (1998) *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, London. 627p.
- van Donk E, van de Bund WJ (2002) Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Bot* 72:261-274
- van der Gucht K, Cottenie K, Muylaert K, Vloemans N, Cousin S, Declerck S, Jeppesen E, Conde-Porcuna JM, Schwenk K, Zwart G, Degans H, Vyverman W, De Meester L (2007) The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *PNAS* 104(51):20404-20409
- Wetzel RG (1992) Gradient-dominated ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwaters ecosystems. *Hydrobiologia* 229:181-198
- Wetzel RG, Likens GE (2000) *Limnological Analyses*. 3rd edn. Springer-Verlag Inc, New York, 429p
- Yannarell AC, Triplett EW (2004) Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl Environ Microbiol* 70(1):214-223

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conjunto de lagos amostrados na planície costeira do Rio Grande do Sul apresentou-se como uma interessante situação experimental natural, onde mosaicos de habitat intrínsecos a cada lago apresentaram respostas marcantes de diversidade e metabolismo do bacterioplâncton. Estes fatores locais estiveram relacionados ao antagonismo entre a dominância de macrófitas e fitoplâncton, gerando padrões de heterogeneidade ambiental que refletiram em diferentes situações metabólicas para as bactérias. Os resultados indicaram que as macrófitas são os principais responsáveis por este padrão através de influência direta, pela inibição química mediada por compostos alelopáticos e húmicos e por ação indireta, através da inibição direta do fitoplâncton. Isto tem importantes implicações para argumentos que colocam a sincronia de dinâmica temporal e espacial do bacterioplâncton como fortemente associada ao fitoplâncton. Outro argumento importante contra a generalização desta assertiva é que o próprio fitoplâncton termina por estabelecer situações de metabolismo bacteriano inadequado sob condições de competição extrema por nutrientes.

Quando a transição entre a dominância das macrófitas e o fitoplâncton foi analisada em detalhe, um padrão de inibição das macrófitas direta sobre o fitoplâncton e direta e indireta sobre o bacterioplâncton foi encontrado, o que, associado à mudança na estrutura do plâncton em geral indica que diferentes assembléias podem ser encontradas em pequenas escalas, mesmo sob um regime forçante de vento importante, em função da existência destes dois habitats principais. Para as bactérias, estes habitats apresentam importantes implicações ecológicas, pois as duas situações metabólicas distintas em ambientes de dominância bem definida criam ótimos de eficiência de crescimento bacteriano, o que pode refletir no controle de estoques de carbono dissolvido e ciclagem de nutrientes, havendo efeitos sobre toda a teia trófica e o metabolismo do lago.





## **Agradecimentos Especiais**

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do Projeto Sistema Hidrológico do Taim, Sítio 7, parte da rede Brasileira de Pesquisa Ecológica de Longa Duração (PELD), financiada pelo CNPq/MCT, sendo realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul através do Programa de Pós-Graduação em Ecologia, em parceria com o Instituto de Pesquisas Hidráulicas.

O autor agradece a todos os órgãos e instituições pelo apoio e oportunidades oferecidas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABE, D. S.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O.; TUNDISI, J. G. Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. **Hydrobiologia**. v.504, p.67-76, 2003.
- ABREU, P. C.; RÖRIG, L. R.; GARCIA, V.; ODEBRECHT, C.; BIDDANDA, B. Decoupling between bacteria and the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* at Cassino beach, Brazil. **Aquatic Microbial Ecology**. v.32, p.219-228, 2003.
- AMADO, A. M.; FARJALLA, V.F.; ESTEVES, F. A.; BOZELLI, R. L.; ROLAND, F.; ENRICH-PRAST, A. Complementary pathways of dissolved organic carbon removal pathways in clear-water Amazonian ecosystems: photochemical degradation and bacterial uptake. **FEMS Microbiology Ecology**. v.56, p.8-17, 2006.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Eaton, A. D.; Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E. (orgs.). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, Inc. 1999.
- ANDRADE, L.; GONZALEZ, A. M.; ARAUJO, F. V.; PARANHOS, R. Flow cytometry assessment of bacterioplankton in tropical marine environments. **Journal of Microbiological Methods**. v.55, p.841-850, 2003.
- ANDRADE, L.; GONZALEZ, A. M.; REZENDE, C. E.; SUZUKI, M.; VALENTIN, J. L.; PARANHOS, R. Distribution of HNA and LNA bacterial groups in the southwest Atlantic ocean. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.330-336, 2007.
- ANESIO, A. M.; ABREU, P. C.; BIDDANDA, B. A. The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. **Estuarine Coastal and Shelf Science**. v.56, p.197-201, 2003.
- ARAÚJO, M. F. F.; GODINHO, M. J. L. Seasonal and spatial distribution of bacterioplankton in a fluvial-lagunar system of a tropical region: density, biomass, cellular volume and morphological variation. **Brazilian Archive of Biology and Technology**. v.51, n.1, p.203-212. 2008.
- AZAM, F.; HODSON, R. E. Size distribution and activity of marine microheterotrophs. **Limnology and Oceanography**. v.22, n.3, p.492-501, 1977.
- AZAM, F.; FENCHEL, J. G.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology – Progress Series**. v.10, p.257-263, 1983.
- AZOVSKI, A. I. Size-dependent species-area relationships in benthos: is the world more diverse for microbes? **Ecography**. v.25, p.273-282, 2002.
- BELL, T.; AGER, D.; SONG, J.-I.; NEWMANN, J. A.; THOMPSON, I. P.; LILLEY, A. K.; VAN DER GAST, C. J. Larger islands house more bacterial taxa. **Science**. v.308, p.1884, 2005.
- BENT, S. J.; PIERSON, J. D.; FORNEY, L. J. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, n.7, p.2399-2401, 2007.

- BILLEN, G.; SERVAIS, P.; BECQUEVORT, S. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? **Hydrobiologia**. v.207, p.37-42, 1990.
- BOHANNAN, B. J. M; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p.282-287, 2003.
- BONECKER, C. C.; AOYAGUI, A. S. M. Relationships between rotifers, phytoplankton, bacterioplankton and bacterioplankton in the Corumbá reservoir, Goiás State, Brazil. **Hydrobiologia**. v.546, p.415-421, 2005.
- BOUVIER, T.; DEL GIORGIO, P. A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. **FEMS Microbiology Ecology**. v.44, p.3-15, 2003.
- CARDOSO, L. S.; MOTTA-MARQUES, D. Rate of change of the phytoplankton community in Itapeva Lake (North Coast of Rio Grande do Sul, Brazil), based on the wind driven hydrodynamic regime. **Hydrobiologia**. v.497, p.1-12, 2003.
- CARDOSO, L. S.; MOTTA-MARQUES, D. Structure of the zooplankton community in a subtropical shallow lake (Itapeva Lake-South of Brazil) and its relationship to hydrodynamic aspects. **Hydrobiologia**. v.518, p.123-134, 2004.
- CARDOSO, L. S.; MOTTA-MARQUES, D. (2007) Hydrodynamics-driven plankton community in a shallow lake. **Aquatic Ecology**. DOI: 10.1007/s10452-007-9151-x.
- CARVALHO, P.; THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a subtropical floodplain (Paraná River, Brazil). **Hydrobiologia**. v.510, n.1-3, p.67-74, 2003.
- CESAR, D. E.; ABREU, P. C. Ecology of aquatic microorganisms in southern Brazil: state of art. In: Faria, B. M.; Farjalla, V. F.; Esteves, F. A. (eds.). *Aquatic Microbial Ecology in Brazil*. **Seies Oecologia Brasiliensis**. v.9, p.153-172, 2001.
- CESAR, D. E. **Estrutura e dinâmica do bacterioplâncton e suas relações com nutrientes inorgânicos e predação no estuário da Lagoa dos Patos/RS**. Tese de doutorado (Fundação Universidade Federal de Rio Grande). 150f. 2002.
- CESAR, D.; DEL'DUCA, A.; PANOSSO, R.; ROLAND, F. Atalhos entre a limnologia, a microbiologia e a biologia molecular: diversidade de microrganismos planctônicos. In: Roland, F.; Cesar, D.; Marinho, M. (eds.). **Lições de Limnologia**. São Carlos: Rima. p.273-298. 532p.2005.
- COATES, J. D.; COLE, K. A.; CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S. M.; ACHENBACH, L. A. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.5, p.2445-2452, 2002.
- COLE, J. J. Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. **Ecosystems** v.2, p.215-225, 1999.

- COTNER, J. B.; BIDDANDA, B. A. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. **Ecosystems**. v.5, p.105-121, 2002.
- COTTRELL, M. Hibridização *in situ* Fluorescente - FISH. Disponível em: <[www.ocean.udel.edu/csn/dkirchman/kirchmanlabmethods.htm](http://www.ocean.udel.edu/csn/dkirchman/kirchmanlabmethods.htm)> Acesso em 15 set. 2005.
- CRUMP, B. C.; ADAMS, H. E.; HOBBIE, J. E.; KLING, G. W. Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an arctic tundra catchment. **Ecology**. v.88, n.6, p.1365-1378, 2007.
- CURRIE, D. J. Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorus. **Limnology and Oceanography**. v.35, n.7, p.1437-1455, 1990.
- DALEY, R. J.; HOBBIE, J. E. Direct counts of aquatic bacteria by a modified epifluorescent technique. **Limnology and Oceanography**. v.20, p.875-882, 1975.
- DE CARVALHO, W. F.; RODRIGUEZ, E. G. Development of primary and bacterial productivity in upwelling waters of Arraial do Cabo region, RJ (Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. v.52, n.2, p.34-45, 2004.
- DEL'DUCA, A. T. **Bacterioplâncton em reservatórios tropicais de geração de energia: variação no espaço e no tempo da estrutura da comunidade bacteriana em sete reservatórios de Furnas Centrais Elétricas S. A.** 130f. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de Juiz de Fora). 2007.
- DEL GIORGIO, P. A.; GASOL, J. M.; VAQUE, D.; MURA, P.; AGUSTI, S. & DUARTE, C. M. Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. **Limnology and Oceanography**. v.41, p.1169-1179, 1996.
- DEL GIORGIO, P. A.; COLE, J. J.; CIMBLERIS, A. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. **Nature**. v.385, p.148-151, 1997.
- DEL GIORGIO, P.A.; COLE, J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v.29, p.503-541, 1998.
- FARIA, B. M.; ESTEVES, F. A. Dissolved organic carbon in two Brazilian coastal lagoons: sources and utilization for heterotrophic bacteria. In: Faria, B. M.; Farjalla, V. F.; Esteves, F. A. (eds.). Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series **Oecologia Brasiliensis**. v.9, p.57-64, 2001.
- FARJALLA, V. F.; ANESIO, A. M.; BERTILSSON, S.; GRANÉLI, W. Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: abiotic transformations and bacterial response. **Aquatic Microbial Ecology**. v.24, p.187-195, 2001.
- FARJALLA, V. F.; ESTEVES, F. A.; BOZELLI, R. L.; ROLAND, F. Nutrient limitation of bacterial production in clear water Amazonian ecosystems. **Hydrobiologia**. v.489, p.197-205, 2002.
- FENCHEL T, FINLAY BJ. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. **Bioscience**, 54, 777-784, 2004.
- FURTADO, A. L. S.; CASPER, P.; ESTEVES, F. A. Bacterioplankton abundance, biomass and production in a Brazilian coastal lagoon and in two German lakes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.73, n.1, p.39-49, 2001.

- GIUSTI, C. L. L., GOMES, Z. M. F., OLIVEIRA, A. A. **MANUAL PARA NORMALIZAÇÃO DE TRABALHOS MONOGRÁFICOS (NBR 2002)**. Universidade Federal de Pelotas. 2003.
- GLÖCKNER, F. O.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on Fluorescence In Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.8, p.3721-3726, 1999.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical & chemical analysis of fresh waters**. 2<sup>a</sup> ed. Grã-Bretanha: Billing & Sons Limited Guildford. 1978. 214p.
- GOMES, E. A. T.; GODINHO, M. J. L. Structure of the protozooplankton community in a tropical shallow and eutrophic lake in Brazil. **Acta Oecologica**. v.24, p.153-161, 2003.
- GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; ANDRADE, L.; VALENTIN, J. L. Bacterial production in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil) evaluated by <sup>3</sup>H-leucine incorporation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.43, n.5, p.493-500, 2000.
- GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R.; LUTTERBACH, M. S. Heterotrophic bacteria abundances in Rodrigo de Freitas lagoon (Rio de Janeiro, Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.428-433, 2006.
- GRAY, J. S. Eutrophication in the sea. In: **Marine Eutrophication and Population Dynamics**: Olsen & Olsen, 1992. p.13-15.
- GREEN, J.; BOHANNAN, B. J. M. Spatial scaling of microbial diversity. **Trends in ecology and evolution**. v.21, n.9, p.501-507, 2006.
- GRELL, K. G. **Protozoology**. Berlin: Springer Verlag. 1973. 554p.
- HEDGES, J. I.; EGLINTON, G.; HATCHER, P. G.; KIRCHMAN, D. L.; ARNOSTI, C.; DERENNE, S.; EVERSLED, R. P.; KÖGEL-KNABNER, I.; LEEUW, J. W. DE, LITKE, R.; MICHAELIS, W.; RULLKÖTTER, J. The molecularly uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. **Organic Geochemistry**. v.31, p.945-958, 2000.
- HILDA, S. L. M. Planktonic microbial community oxygen consumption rate in Cananéia waters (25°S 48°W), Brazil. **Aquatic Ecology**. v.28, n.3-4, p.441-451, 1994.
- HILLEBRAND H., DÜRSEKEN D., KIRSCHIEL D., POLLINGHER, U.; ZOHARY, T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal of Phycology**, 35, 403-424, 1999.
- HOBBIE, J. E.; HOLM-HANSEN, O.; PACKARD, T. T.; POMEROY, L. R.; SHELDON, R. W.; THOMAS, J. P.; WIEBE, W. J. A study of the distribution and activity of microorganisms in ocean water. **Limnology and Oceanography**. v.17, n.4, p.544-555, 1972.
- HOBBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**. v.33, n.5, p.1225-1228, 1977.
- HOLZ, M. **Do mar ao deserto. A Evolução do Rio Grande do Sul no Tempo Geológico**. 2<sup>o</sup>ed. Porto Alegre: Ufrgs. p.131-144, 1999. 144p.
- HORNER-DEVINE, M. C.; LEIBOLD, SMITH, V. H.; BOHANNAN, B. J. M. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. **Ecology Letters**. v.6, p.613-622, 2003.

- HORNER-DEVINE, M. C.; LAGE, M.; HUGHES, J. B.; BOHANNAN, B. J. M. A taxa-area relationship for bacteria. **Nature**. v.432, p.750-753, 2004.
- HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.10, p.4399-4406, 2001.
- HULOT, F. D.; MORIN, P. J.; LOREAU, M. Interactions between algae and the microbial loop in experimental microcosms. **Oikos**. v.95, p.231-238, 2001.
- HUSS, A. A.; WEHR, J. D. Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria americana*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake. **Microbial Ecology**. v.45, p.305-315, 2004.
- JAHNKE, R. A.; CRAVEN, D. B. Quantifying the role of heterotrophic bacteria in the carbon cycle: A need for respiration rate measurements. **Limnology and Oceanography**. v.40, n.2, p. 436-441, 1995.
- JESPERSEN, A.-M.; CHRISTOFFERSEN, K. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. **Archiv für Hydrobiologie**. v.109, n.3, p.445-454, 1987.
- Kamjunke, N.; Böing, W. & Voigt, H. Bacterial and primary production under hypertrophic conditions. **Aquatic Microbial Ecology**. v.13, p.29-35, 1997.
- KENT, A. D.; YANNARELL, A. C.; RUSAK, J. A.; Triplett, E. W. & McMahon, K. D. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. **International Society for Microbial Ecology**. v.1, p.38-47, 2007.
- KEPNER, R. L. JR.; PRATT, J. R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. **Microbiological Reviews**. v.58, n.4, p.603-615, 1994.
- KIRCHMAN, D. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: *Methods in microbiology*, v. 30, Paul, J. H. (Ed), Academic Press, USA,. p. 227-237. 2001
- KOLM, H. E.; ANDRETTA, L. Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal do Sul, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, n.2, p.97-103, 2003.
- KÖRNER, S.; NICKLISCH, A. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. **Journal of Phycology**. v.38, p.862-871, 2002.
- KUDO, R. R. **Protozoología**. México: Compañía Editorial Continental, S. A. 1969. 905p.
- LEGENDRE, L.; RASSOULZADEGAN, F. Plankton and nutrient dynamics in marine waters. **Ophelia**. v.41, p.153-172, 1995.
- LINDELL, M. J.; GRANÉLI, W.; TRANVIK, L. J. Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**. v.40, n.1, p.195-199, 1995.

- LINDSTRÖM, E. S.; LESKINEN, E. Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of the 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions. **Microbial Ecology**. v.44, p.1-9, 2002.
- LIU, J.; DAZZO, F. B.; GLAGOLEVA, O.; YU, B.; JAIN, A. K. CMEIAS: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. **Microbial Ecology**. v.41, p.173-194, 2001.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. In: Sapp, J. **Microbial Phylogeny and Evolution – concepts and controversies**. New York: Oxford. p.70-98. 2005. 325pp.
- MACKERETH, F. J. H.; HERON, J. ; TALLING, J. F. **Water analysis: some revised methods for limnologists**. Freshwater Biological Association. 2<sup>a</sup> ed. 1989.
- MAGNÓLIA, F. F. A. **Ecologia do protozooplâncton, bacterioplâncton e virioplâncton em um sistema fluvial-lagunar do nordeste brasileiro**. 107f. Tese de Doutorado (Universidade Federal de São Carlos. 2004.
- MARTINY, J. B. H.; BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FURHMAN, J. A.; GREEN, J. L.; HORNER-DEVINE, M. C.; KANE, M.; KRUMINS, J. A.; KUSKE, C. R.; MORIN, P. J.; NAEEM, S.; ØVREÅS, L.; REYSENBACH, A.-L.; SMITH, V. H.; STALEY, J. T. Microbial Biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature**. v.4, p.102-112, 2006.
- MASSANA, R.; GASOL, J. M.; BJØRNSSEN, P. K.; BLACK-BURN, N.; HAGSTRÖM, Å.; HIETANEN, S.; HYGUM, B. H.; KUPARINEN, J.; PEDRÓS-ALIÓ, C. Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. **Scientia Marina**. v.61, n.3, p.397-407, 1997.
- METZLER, P. M.; GLIBERT, P. M.; GAETA, S. A.; LUDLAM, J. M. Contrasting effect of substrate and grazer manipulations on picoplankton in oceanic and coastal waters off Brazil. **Journal of Plankton Research**. v.22, n.1, p.77-90, 2000.
- MÜNSTER, U.; CHRÓST, R. J. Origin, Composition and Microbial Utilization of Dissolved Organic Matter. In: **Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches**. Overbeck, J.; Chróst, R. J. (Eds.). New York: Springer-Verlag New York Inc. 1990. p.8. 190p.
- NORLAND, S. The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp, P. F.; Sherr, B. F.; Sherr, E. B. & Cole, J. J. **Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology**. USA: Lewis Publishers. p.339-345. 1993. 777p
- PACE, M. L.; FUNKE, E. Regulation of planktonic microbial communities by nutrients and herbivores. **Ecology**. v.72, n.3, p.904-914,1991.
- PACE, M. L. AND COLE, J. J. Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. **FEMS Microbial Ecology**. v.28, p.181-193, 1994.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**. v.276, p.734-740, 1997.

- PANHOTA, R. S.; BIANCHINI JR., I.; VIEIRA, A. A. H. Glucose uptake and extracellular polysaccharides (EPS) produced by bacterioplankton from an eutrophic tropical reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). **Hydrobiologia**. v.583, p.223-230, 2007.
- PERNTHALER, J.; FRANK-OLIVER, G.; SCHÖNHUBER, W.; AMANN, R. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Methods in microbiology, v. 30, Paul, J. H. (Ed), Academic Press, USA,. p. 207-226. 2001
- PETRUCIO, M. M. **Produtividade bacterioplanctônica e fitoplanctônica nos ecossistemas aquáticos do trecho médio da bacia do Rio Doce - MG**. São Carlos, 2003. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de São Carlos.
- PETRUCIO, M. M.; BARBOSA, F. A. R. Diel variations of phytoplankton and bacterioplankton production rates in four tropical lakes in the middle Rio Doce basin (southeastern Brazil). **Hydrobiologia**. v.513, p.71-76, 2004.
- PETRUCIO, M. M.; BARBOSA, F. A. R.; FURTADO, A. L.S. Bacterioplankton and phytoplankton production in seven lakes in the middle Rio Doce basin, south-east Brazil. **Limnologia**. v.36, p.192-203, 2006.
- POMEROY, L. R. The ocean's food web: a changing paradigm. **Science**. v.24, n.9, p.499-504, 1974.
- PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnology and Oceanography**. v. 25, n.5, p. 943-948, 1980.
- RACY, F. P. P. **Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios**. 65f. Dissertação de Mestrado (Universidade Federal de São Carlos). 2004.
- RECHE, I., PULIDO-VILLENA, E., MORALES-BAQUERO, R.; CASAMAYOR, E. O. Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? **Ecology**. n.86, p.1715–1722, 2005.
- ROBARTS, R. D.; ZOHARY, T.; WAISER, M. J.; YACOBI, Y. Z. Bacterial abundance, biomass, and production in relation to phytoplankton biomass in the Levantine Basin of the southeastern Mediterranean sea. **Marine Ecology – Progress Series**. v.137, p.273-281, 1996.
- ROLAND, F.; CARACO, N. F.; COLE, J. J.; DEL GIORGIO. Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: evaluation of interference from color and turbidity. **Limnol. Oceanogr**. v.44, n.4, p. 1148-1154, 1999.
- ROLAND, F.; VIDAL, L. O. Heterotrophic bacterial respiration: a relevant measurement for the understanding of plankton metabolism. In: Faria, B. M.; Farjalla, V. F.; Esteves, F. A. (eds.). Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series **Oecologia Brasiliensis**. v.9, p.97-116, 2001.
- ROONEY, N.; KALFF, J. Submerged macrophyte-bed effects on water-column phosphorus, chlorophyll a, and bacterial production. **Ecosystems**. v.6, p.797-807, 2003.
- ROSENSTOCK, B.; SIMON, M. Consumption of dissolved amino acids and carbohydrates by limnetic bacterioplankton according to molecular weight fractions and proportions bound to humic matter. **Microbial Ecology**. v.45, p.433-443, 2003.



ROSENSTOCK, B.; ZWISLER, W.; SIMON, MEINHARD. Bacterial consumption of humic and non-humic low and high molecular weight DOM and the effect of solar irradiation on the turnover of labile DOM in the southern ocean. **Microbial Ecology**. v.50, p.90-101, 2005.

SCHÄFER, A. Tipificação ecológica das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Limnologica Brasiliense**. v.11, p.29-55, 1988.

SCHEFFER, M.; JEPPESEN, E. Alternative stable states. In: Jeppesen, E.; Søndergaard; M.; Søndergaard; M.; Christoffersen, K. (eds.). **The structuring role of submerged macrophytes in lakes**. Nova Iorque:Springer. p.397-406, 1997.

SCHEFFER, M.; VAN GEEST, J. Small habitat size and isolation can promote species richness: second-order effects on biodiversity in shallow lakes and ponds. **Oikos**. v.112, n.1, 2006.

SCHLICHEISEN, E.; TJETJEN, T. E.; ARSUFFI, T. L.; GROEGER, A. W. Detritus processing and microbial dynamics of an aquatic macrophyte and terrestrial leaf in a thermally constant, spring fed stream. **Microbial Ecology**. v.45, p.411-418, 2003.

SCHÜLZ, K. L. Bacteria and the microbial loop. Disponível em:  
<<http://www.esf.edu/efb/schulz/limnology/microbialloop.jpg>>. Acessado em: 21/06/06.

SHERR, E.; SHERR, B. Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. **Limnology and Oceanography**. v.33, n.5, p.1225-1227, 1988.

SCHWARZBOLD, A.; SCHÄFER, A. Gênese e morfologia das lagoas costeiras do Rio Grande do Sul – Brasil. **Amazoniana**. v.9, n.1, p.87-104, 1984.

SIMON, M.; AZAM, F. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.51, p. 201-213, 1989.

SIQUEIRA, A.; KOLM, H. E.; BRANDINI, F. P. Offshore distribution patterns of the Cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* Ehrenberg and associated phyto- and bacterioplankton in the southern atlantic coast (Paraná, Brazil). **Brazilian Archive of Biology and Technology**. v.49, n.2323-337, 2006.

SØNDERGAARD, M.; JEPPESEN, E.; JENSEN, J. P. Pond or lake: does it make any difference? **Archiv für Hydrobiologie**. v.162, n.2, p.143-165, 2005.

STANLEY, E. H.; JOHNSON, M. D.; WARD, A. K. Evaluating the influence of macrophytes on algal and bacterial production in multiple habitats of a freshwater wetland. **Limnology and Oceanography**. v.48, n.3, p.1101-1111, 2003.

STROME, D. J.; MILLER, M. C. Photolytic changes in dissolved humic substances. **Verh. Int. Vereinigung Theoretische Angew. Limnol.** v.20, p.1248-1254, 1978.

SUHETT, A. L.; AMADO, A. M.; BOZELLI, R. L.; ESTEVES, F. A.; FARJALLA, V. F. O papel da fotodegradação do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v.10, n.2, p.186-204, 2006.

SUN J.; LIU D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, 25: 1331-1346, 2003.

SUZUKI, M. T.; SHERR, E. B.; BARRY, E. B. DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. **Limnology and Oceanography**. v.38, n.7, p.1566-1570, 1993.

STROME, D. J.; MILLER, M. C. Photolytic changes in dissolved humic substances. **Verh. Int. Vereinigung Theoretische Angew. Limnol.** v.20, p.1248-1254, 1978.

TAKETANI, R. G.; ARAUJO, F. V.; VAN WEERELT, M. D. M.; SANCHEZ-NUNES, M. L.; ANISZEWSKI, E.; ROSADO, A. S. Use of molecular approach to verify the influence of a eutrophic lagoon in the nearby ocean's bacterioplankton community. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34,s.1,p.51-52, 2003.

TENENBAUM, D. R.; VILLAC, M. C.; GOMES, E. A. T.; CUPELO, A. C.; SANTOS, V. S. A new "sight" on microbial plankton ecology: coastal x oceanic system in Brazil. In: Faria, B. M.; Farjalla, V. F.; Esteves, F. A. (eds.). Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Seies **Oecologia Brasiliensis**. v.9, p.133-152, 2001.

THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. In:Pompêo, M.L.M. (ed.) **Perspectivas da limnologia no Brasil**. São Luís: União, p.1-18. 1999. 198 pp.

TRANVIK, L. J. Rapid fluorometric assay of bacterial density in lake water and sea water. **Limnol. Oceanogr.** V.42, p.1629-1634, 1997.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press: London. 1998. 627p.

VAN DER GUCHT, K.; COTTENIE, K.; MUYLEAERT, K.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; DECLERCK, S.; JEPPESEN, E.; CONDE-PORCUNA, J. M.; SCHWENK, K.; ZWART, G.; DEGANS, H.; VYVERMAN, W.; DE MEESTER, L. The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. **PNAS**. v.104, n.51, p.20404-20409, 2007.

VIDAL L.; MEDONÇA, R. F.; MARINHO, M. M.; CESAR, D.; ROLAND, F. Caminhos do carbono em ecossistemas aquáticos continentais. In: Roland, F.; Cesar, D.; Marinho, M. (eds.). **Lições de Limnologia**. São Carlos: Rima. p.193-208. 2005. 532p.

WAICHMAN, A. V. Autotrophic carbon sources for heterotrophic bacterioplankton in a floodplain lake of central Amazon. **Hydrobiologia**. v.341, p.27-36, 1996.

WEISSE, T. Biodiversity of freshwater microorganisms – achievements, problems, and perspectives. **Polish Journal of Ecology**. v.54, n.4, p.633-652, 2006.

WETZEL, R. G. Gradient-dominated ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. **Hydrobiologia**. v.229, p.181-198, 1992.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. Primary Productivity of Phytoplankton. In: **Limnological Analyses**. 3ª ed. Nova Iorque: Springer-Verlag. 2000. 429p.

WHITFIELD, J. Biogeography: is everything everywhere? **Science**. v.310, n.5750, p.960-961, 2005.

YANNARELL, A. C.; TRIPLETT, E. W. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, n.1, p.214-223, 2004.

## **ANEXO**

Normas para publicação na revista *Aquatic Ecology*