UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO/UFRJ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA-PPGE

INFLUÊNCIA DE FATORES LOCAIS E REGIONAIS NA ESTRUTURAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM MICROCOSMOS NATURAIS

Fernanda Dall'Ara Azevedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Ecologia).

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Fortes Farjalla
Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rosado

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
ABRIL DE 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO/UFRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA-PPGE

CX. POSTAL 68.020 – ILHA DO FUNDÃO
CEP: 21941-590 – RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
TEL./FAX: (21) 2290-3308 TEL.: (21) 2562-6320

Influência de fatores locais e regionais na estruturação das comunidades bacterianas em microcosmos naturais

FERNANDA DALL'ARA AZEVEDO

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ciências biológicas (ecologia).

Defendida em 27 de Abril de 2009

APROVADA POR:

_____

Prof. Vincius F. Farjalla, Dr.

_____

Prof. Sidinei M. Thomaz, Ph.D.

_____

Prof. Ulysses Lins, PH.D.

Ficha catalográfica

AZEVEDO, FERNANDA DALL'ARA
Influência dos fatores locais e regionais na estruturação das comunidades bacterianas em microcosmos naturais. [Rio de Janeiro] 2007
50 p. 29,7 cm (Instituto de Biologia/UFRJ, M.Sc., Ecologia, 2009)
Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, PPGE
1. Composição da comunidade Bacteriana, 2. Fatores locais e Regionais, 3. Relação Taxa - área
I. IB/UFRJ II. Título (série)

Agradecimentos

Ao Vinícius (Prof. Dr. Vinicius F. Farjalla) por me acolher, apoiar e confiar desde o primeiro momento. Obrigada pelo estímulo constante, pelos conselhos, pelo exemplo de profissionalismo além da amizade.

Ao Chico (Prof. Dr. Francisco de Assis Esteves) e Reinaldo (Prof. Dr. Reinaldo L. Bozzeli) pelo apoio e oportunidades, além da minha admiração e respeito.

Ao Alexandre (Prof. Dr. Alexandre Rosado) pela parceria e por ter fornecido excelente estrutura para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Sidinei M. Thomaz e Prof. Dr. Ulysses Lins, por aceitarem participar e contribuir para a finalização deste projeto.

Aos membros da Pré-banca, Prof. Dr, Alex E. Prast e Irene Garay, pelas correções e sugestões na fase final da dissertação.

Ao PPGE/UFRJ, CNPQ pelo suporte e apoio financeiro indispensáveis.

Às secretárias do PPGE, Marcinha e Sueli, pela atenção, paciência e colaboração durante esses 2 anos.

A todos aqueles que participaram da coleta, Albert, Thaís, Chico Brant, Aliny, Camilla, Viviane, Nicholas, Vinicius (Wilsinho), Ellen, Rachel, Daniele, Anderson, Monalisa sem vocês este trabalho seria impossível de se concretizar. A todos meus eternos agradecimentos. Em especial meus agradecimentos ao Nicholas e a Viviane Dib que compartilham este projeto comigo.

À Paloma pela indispensável ajuda na estatística e pela leitura do manuscrito, além das discussões enriquecedoras. Muito obrigada.

Aos integrantes do Laboratório de Limnologia que conviveram comigo ao longo destes 3 anos de laboratório. Todos vocês contribuíram de forma significativa, seja pelos conhecimentos transmitidos seja pela companhia agradável e divertida durante

churrascos, festas juninas, cafezinhos, almoços, barzinhos, etc. Obrigada, Adriana e Gabriel, Adriano, Alessandro, Alexandre, Albert, Alice, Aline, Aliny, Ana Claúdia, André Megali, André "Titi", Anderson Grip, Andresson "Baiano", Aninha, Camilinha, Camilona, Camila, Claudão, Dany, Danielle, Daniel, Ellen, Fabi, Flavinha, Fred, Harry Potter, Jayme, João, Ju, Laísa, Léo, Luciana, Lets, Lúcia, Lucy, Luana, Marcos Paulo "Bolão", Marcos Vinicius, Marcela, Mário, Monalisa, Marcelo, Nicholas, Paloma, Rafael "Jabour", Reinaldo, Paula, Rayanne, Rose, Sandra, Thaís (obrigada por me apresentar às técnicas moleculares, em particular o DGGE), Tássia, Telma, Viviane "Dib", Vinicius "Wilsinho".

Aos membros do laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM): Raquel, Sueli, Adriana, Flavia, Lia, Flavio (chama no Kb), Henrique, Hugo, Luisa, Simoni, Urubu, Ricardo, Edir, Adriana C., Kátia, Erick, Regina, Ana Paula, Carlos, Caren. Em especial, os meus agradecimentos a Flavia, Lia e Adriana pela amizade e pelos indispensáveis cafezinhos durante uma polimerização e outra. E ao Henrique por me auxiliar no preparo dos géis (a dupla atrapalhada!!!!).

A toda equipe do NUPEM/UFRJ, por todo o apoio logístico e acolhimento.

A equipe do IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo), Lauro, Aroldo e Thiago, e ao Rodrigo por me auxiliarem na confecção do mapa e nos cálculos de distâncias.

Às minhas grandes amigas Tassia, Ellen e Paloma as principais responsáveis pela minha adaptação na cidade maravilhosa. Obrigada pelas horas de conversa, do ombro amigo (muito usado), dos momentos de risada, das noites no Mexicano. Muito obrigado amo muito vocês. Além daquelas que não estão por perto, mas que fazem parte de toda a minha caminhada e sei que torcem muito por mim (Carol, Agnes, Tuca, Simonete).

À minha família Ione, Adalberto, Marco e Daniel pelo apoio incondicional em todas as minhas andanças, pelo exemplo de ética e respeito. Amo muito vocês.

Resumo

O acesso cada vez maior à informação genética, através do uso das técnicas moleculares, permitiu o estudo da estrutura e da composição das comunidades microbianas. A distribuição desses organismos é explicada por duas principais correntes. A primeira proposta é que a diversidade dos micro-organismos é prioritariamente determinada pelos fatores ambientais (i.e., fatores locais são mais importantes que os regionais). Por outro lado, outra corrente propõe que micro e macroorganismos seguem os mesmos padrões e leis ecológicas para diferentes escalas espaciais e temporais (i.e. micro-organismos também são limitados pela dispersão). Para avaliar a contribuição relativa do espaço (distância) e do ambiente (características abióticas) na composição da comunidade bacteriana foram utilizadas bromélias-tanque como microcosmos naturais. Neste trabalho, foram formuladas duas hipóteses. 1) Os fatores locais contribuem mais para a composição e riqueza de micro-organismos do que os fatores espaciais; 2) O número de Unidades Taxônomicas Operacionais (UTO) de bactérias aumenta com o aumento do volume das bromélias-tanque. Os resultados sugerem que a composição da comunidade bacteriana foi determinada principalmente por fatores locais tais como nutrientes, temperatura máxima, turbidez, origem do carbono e a heterogeneidade ambiental. Desta forma, o ambiente agiria como um filtro e seria o principal responsável por "selecionar" os organismos que são capazes de se estabelecer em determinadas condições. Além disso, não houve relação significativa entre o número de UTO e o volume das bromélias-tanque, o que pode indicar que micro-organismos não são limitados pela dispersão na escala espacial (< 260 m)deste trabalho. No entanto, a ausência de relação entre UTO e o volume pode estar relacionada a limitações da metodologia aplicada.

Abstract

The increasing access to genetic information through the use of molecular techniques has allowed the study of the structure and composition of microbial communities. The distribution of these organisms may be explained by two major views. The first one proposes that the diversity of microorganisms is primarily determined by environmental factors (i.e., local factors are more important than the regional factors). Conversely, it is also proposed that micro and macroorganismos follow the same rules and environmental laws over different spatial and temporal scales (microorganisms are also limited by the dispersion). To evaluate the relative contribution of space (distance) and environment (abiotic features) on the composition of bacterial community, we used tank-bromeliads as natural microcosms. In this work, two main hypotheses were formulated. The first is that local factors contribute more to the composition and abundance of microorganisms than regional factors. The second is that there would be an increase in the number of bacterial operational taxonomic unities (OTU) with increasing volume of tank-bromeliads. The results suggest that the composition of bacterial community was primarily determined by local factors, such as nutrients, maximum temperature, turbidity, source of organic carbon and environmental heterogeneity. Thus, environment acts as a filter and would be the major responsible for selecting the organisms that are able to be established under certain conditions. We also found that the relationship between the OTU and tank-bromeliad size was not significant, what may indicate that microorganisms are not limited by dispersion within the spatial scale of this work (< 260 m). However, the absence of relationship between OTU and tank volume may be related to limitations of the applied methodology.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1

2. HIPÓTESES 12

3. OBJETIVOS 12

4. ÁREA DE ESTUDO 13

5. METODOLOGIA 17

5.1. Amostragem 17

5.2. Análises laboratoriais 22

5.3. Análises Estatísticas 24

6. RESULTADOS 27

7. DISCUSSÃO 36

8. CONCLUSÃO 44

9. REFERÊNCIAS 45

Introdução

O interesse nos padrões espaciais dos micro-organismos surgiu no início do século XX com a observação de Beijerinck de que diferentes organismos podiam ser cultivados a partir de diferentes ambientes naturais. Mais tarde em 1934, Baas Becking foi o responsável por formular uma das principais correntes existentes nos estudos da diversidade e distribuição de micro-organismos. Ele afirmava que os micro-organismos estariam amplamente distribuídos pelo mundo, mas o ambiente seria o responsável pela seleção desses organismos ("*Everything is everywhere, but, environment selects*").

Desde o inicio do século XX até recentemente a ecologia microbiana era baseada nas técnicas tradicionais que utilizam os seletivos meios de cultura, porém, estas técnicas falham ao tentar mimetizar o ambiente em que os micro-organismos vivem. Muitos destes organismos (aproximadamente 99% de toda a diversidade microbiana) ainda não puderam ser isolados por necessitarem de condições de cultivo extremamente específicas, ou viverem agregados em partículas, dificultando seu isolamento e caracterização (Muyzer 1999; Casamayor *et al.* 2000). Desta forma, apesar de ainda hoje serem extremamente importantes no estudo da ecologia microbiana, estas técnicas não são suficientes para acessar a diversidade bacteriana em ambientes naturais, principalmente daqueles organismos que não podem ser cultivados. Com o advento das técnicas moleculares o estudo da diversidade bacteriana tem mudado consideravelmente. Estas técnicas, que foram importadas de outras áreas da microbiologia, como por exemplo, da microbiologia médica, fizeram com que houvesse uma reavaliação da diversidade microbiana. Este acesso à informação genética cada vez maior permite o estudo da estrutura e da composição das comunidades e populações microbianas independente dos tradicionais meios de cultivo.

A maioria das técnicas moleculares é fundamentada na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O PCR emprega métodos baseados em seqüência de ácidos nucléicos para os estudos da diversidade procariota e possibilita a análise da comunidade microbiana sem o uso das seletivas técnicas de plaqueamentos e cultivos (Casamayor *et al.* 2000). Dentre os principais métodos destacam-se os métodos de "Fingerprint" ou "Impressão Digital", como o DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), o TGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente de Temperatura) e o RFLP (Análise de Restrição de Fragmentos Polimórficos). Tais métodos se baseiam na formação de perfis moleculares da comunidade microbiana, o que possibilita a análise simultânea de várias amostras ambientais, sendo bastante úteis para o monitoramento e compreensão de variações temporais e espaciais de comunidades microbianas.

Para estas metodologias, a extração das amostras é realizada de forma direta (i.e. sem a necessidade de cultivo) e tem como resultado uma mistura do DNA genômico de todos os organismos presentes naquele ambiente. O PCR é o responsável por amplificar o genótipo de interesse em uma quantidade detectável. Neste sentido, um dos iniciadores do PCR deve ser extremamente específico para evitar ambigüidades, ou seja, a amplificação de outros genótipos que não o de interesse. Através de ciclos consecutivos de aumento e diminuição da temperatura, o PCR permite o aumento em abundância na ordem de 10^6 a 10^9 do fragmento de DNA alvo (Brooks, 2004). Os fragmentos de ácidos nucléicos de mesmo tamanho, mas com seqüências diferentes, em seus pares de bases, depois de amplificados pelo PCR, são submetidos a um gel de acrilamida. Este gel de acrilamida possui uma concentração de agente desnaturante ao longo de seu comprimento (principio da técnica do DGGE) que permite que estes fragmentos sejam separados. Esta separação é baseada em propriedades físicas destas

seqüências de DNA em fita dupla, que ao migrar ao longo do gel, sofrem uma desnaturação em pontos específicos, denominados domínios. Estes domínios desnaturados assumem uma estrutura ramificada que causa um significante retardamento na sua migração até um ponto em que o movimento cessa. Assim as posições de determinado fragmento em um ponto específico do gel são determinadas por estes domínios de desnaturação, que são controlados pela seqüência de nucleotídeos que o formam. Como conseqüência as diferentes bandas em um gel representam diferentes seqüências de um gene (Ferris *et al.* 1996). Diferenças de 100% nas seqüências podem ser determinadas quando é adicionado, em uma das extremidades, um fragmento, de 40 pares de base, composto de Citosina e Guanina (Grampo G-C). Esta seqüência é extremamente estável, pois a "ligação" entre a citosina e a guanina é formada por três pontes de hidrogênio, funcionando como um domínio de desnaturação de alta temperatura, dificultando a desnaturação de todos os domínios da fita dupla de DNA em fita simples, assim este grampo permite estudar todos os domínios de desnaturação da molécula (Muyzer *et al.* 1993).

Para o estudo da comunidade bacteriana em amostras naturais o gene alvo é a subunidade 16S do RNA ribossômico (rRNA), que é considerado um bom cronômetro filogenético, já que os RNA ribossomais são funcionalmente constantes, distribuídos de maneira universal, com regiões altamente conservadas mas, simultaneamente, com variabilidade suficiente em outras regiões. Estas moléculas apresentam seqüências moderadamente conservadas ao longo de grandes distâncias filogenéticas e por ser menos vulneráveis a transferência horizontal de genes, podem apresentar a estrutura filogenética da comunidade (Brooks 2004).

Assim como na ecologia de macroorganismos, a unidade alvo em pesquisas que visam os padrões de distribuição dos micro-organismos é a espécie, talvez influenciada

pelos estudos da distribuição e diversidade de animais e plantas. Entretanto, para procariotos o conceito de espécie não está claramente definido, principalmente devido a dificuldades metodológicas (Rossellö-Mora & Amann 2001; Fenchel & Finlay 2006; Ward 2006). O conceito clássico de espécie taxonômica é baseado na observação de características fenotípicas particulares que, em combinação e/ou correlacionadas, ocorrem em um número finito de unidades discretas, não excluindo a possibilidade de alguma população conter alguma característica especial adaptativa (Fenchel & Finlay 2006). Esta definição é de pouca valia para micro-organismos devido à enorme dificuldade de se diferenciarem fenotipicamente células microbianas. Para procariotos, a definição mais utilizada é aquela na qual micro-organismos da mesma espécie apresentam, no mínimo, 97% de similaridade em nível DNA-DNA (às vezes 99%) na seqüência do 16S rRNA e possuem caracterização metabólica semelhante quando isolados em meio de cultura (Cohan 2001; Logue *et al.* 2008), e são expressas como Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO). Os ecólogos microbianos consideram esta definição válida, além de considerarem que o estudo da diversidade pode ser realizado utilizando qualquer tipo de unidade taxonômica, desde que as definições sejam claras e que a mesma unidade seja usada com consistência por todo o sistema estudado (Hughes *et al.* 2001; Bohannan & Hughes 2003; Schloss & Handelsman 2007).

Apesar de serem muito úteis, as técnicas de "Fingerprint" também apresentam limitações. Uma dessas limitações, é que apenas as populações com densidade superior a 1% do total de indivíduos na amostra podem ser detectadas, ou seja, permitem apenas o estudo daquelas espécies que são mais comuns, ou numericamente abundantes (Muyzer *et al.* 1993; Pedros-Alio 2006). Além disso, estes métodos podem gerar erros, como a formação de heteroduplex (anelamento inespecífico de dois produtos de PCR distintos) e a co-migração de seqüências similares de diferentes organismos, que podem

subestimar a diversidade, assim como a presença de diferentes seqüências de rRNA de um mesmo organismo que pode acarretar em uma superestimação da diversidade (Ferris *et al.* 1996; Muyzer 1999). Outra dificuldade encontrada é a análise dos perfis gerados pelo gel, mas que pode ser contornada pela disponibilidade de programas computacionais que auxiliam nesta etapa do processo, sendo capazes de fornecer informações qualitativas e quantitativas.

A partir destas novas ferramentas e dos conceitos expostos acima, o estudo da diversidade microbiana cresceu consideravelmente nas ultimas décadas. O papel dos processos locais (heterogeneidade espacial, interações bióticas, freqüência de distúrbios) e dos processos regionais (e.g. dispersão) na estrutura da comunidade bacteriana tem sido alvo de grande debate atualmente. A distribuição destes organismos é explicada por duas principais correntes. A primeira hipótese é a proposta por Baas Becking, que sugere que a diversidade dos micro-organismos é prioritariamente determinada pelos fatores ambientais (i.e. fatores locais são mais importantes que fatores regionais), e que a ampla distribuição dos micro-organismos resultaria em uma alta diversidade local, porém uma diversidade global relativamente baixa (Finlay & Clarke 1999). Estes padrões seriam resultados do grande tamanho populacional desses organismos, ou seja, altas densidades de uma espécie aumentam a probabilidade de um organismo atingir locais mais distantes (i.e. relação positiva entre abundância e dispersão) (Finlay 2002). Como resultado, os micro-organismos apresentariam uma alta taxa de dispersão e colonização, o que permitiria que houvesse um aumento do fluxo gênico, quer pela reprodução sexual, quer pela transferência horizontal de genes, que impediriam qualquer tendência à diferenciação espacial da comunidade pela mutação, seleção ou deriva gênica (Martiny *et al*. 2006). (Finlay & Esteban 2007)) sugerem ainda, que organismos procariotos apresentam todas as características necessárias para

apresentar uma distribuição primariamente aleatória, ou seja, apresentam grandes tamanhos populacionais, não apresentam comportamento social ou parasítico e apresentam formas de resistência (e.g. cistos).

Por outro lado, outra corrente propõe que micro e macroorganismos seguem os mesmos padrões e leis ecológicas para diferentes escalas espaciais e temporais, e desta forma, os micro-organismos apresentariam padrões semelhantes àqueles encontrado para organismos maiores (Azovsky 2002; Foissner *et al.* 2008). Assim como em organismos maiores, micro-organismos patogênicos apresentam certo grau de endemismo. Um exemplo disso são as espécies introduzidas em ambientes que não os de origem e que podem ter conseqüências desastrosas (doenças introduzidas na América pelos Europeus como a febre tifóide, causada pela *Salmonella typhae*). Evidências como estas levaram ecólogos microbianos a crer que alguns aspectos poderiam ser comuns a todas as formas de vida, inclusive micro-organismos de vida livre (Hedlund & Staley 2004; Weinbauer & Rassoulzadegan 2007). Os estudos pioneiros que observaram o efeito do espaço em procariontes de vida livre foram realizados com cianobactérias, do gênero *Synechococcus* habitando fontes termais (Papke *et al.* 2003). Assim, a distribuição espacial dos ambientes pode estruturar as comunidades bacterianas apesar dos organismos apresentarem alta capacidade de dispersão e populações muito abundantes (Whitaker *et al.* 2003). Outra característica importante é que a grande maioria dos micro-organismos eucariotos (mais que 90% das espécies de protistas) apresenta abundância moderada ou baixa (Foissner 2008), sendo esta uma característica que também pode ocorrer em procariotos. Além disso, nem todas as espécies de micro-organismos possuem formas de resistência, sendo assim, os micro-organismos não necessariamente apresentam altas taxas de dispersão (Horner-Devine & Bohannan 2006; Martiny *et al.* 2006).

No geral, os fatores locais têm uma grande influência na riqueza e composição da comunidade bacteriana. Fatores intrínsecos tais como concentração de nutrientes (Fierer *et al.* 2007), disponibilidade de carbono (Eiler *et al.* 2003; Beisner *et al.* 2006), produção fitoplanctônica (Winter *et al.* 2007), pH, condutividade elétrica (Schauer *et al.* 2005), salinidade e cor da água (Langenheder & Ragnarsson 2007) parecem ser determinantes na comunidade bacteriana. Em ambientes extremos, onde o ambiente atua como um importante filtro existe indícios de que as características locais destes ecossistemas, tais como salinidade e tipo de substrato, ainda são os maiores estruturadores das comunidades (Lozupone & Knight 2007). A heterogeneidade ambiental também pode exercer uma grande influência na diversidade e composição das comunidades, por apresentar uma maior complexidade de recursos e condições. Portanto, ambientes mais heterogêneos apresentam um maior número de nichos disponíveis, e desta forma conseguiriam suportar uma maior riqueza do que ambientes mais homogêneos (Horner-Devine *et al.* 2004b; Reche *et al.* 2005; Shade *et al.* 2008). A importância da heterogeneidade ambiental em promover o aumento da riqueza de espécies é altamente conhecida, entretanto a observação deste padrão em micro-organismos ainda é rara.

Fatores regionais (e.g. distância entre ambientes) também podem estruturar as comunidades bacterianas. A ação do espaço na composição das comunidades pode ser devido a limitação na dispersão e a eventos históricos (Martiny *et al.* 2006). Por exemplo, (Reche *et al.* 2005)) encontrou que lagos mais próximos são mais similares em relação composição bacteriana do que lagos mais distantes. Mesmo em uma escala espacial relativamente pequena (i.e. ambientes distantes em centenas de metros), o espaço foi responsável por em torno de 10% da estruturação da composição da comunidade bacteriana (Langenheder & Ragnarsson 2007). Esta similaridade entre

ambientes mais próximos pode estar relacionada à maior probabilidade de recolonizarão pelos micro-organismos em distâncias menores. No entanto, os fatores espaciais podem estar relacionados a características ambientais não mensuradas nos estudos, isto é, ecossistemas mais próximos tendem a ser mais semelhantes em relação aos fatores locais que ecossistemas mais distantes. Caso essas características ambientais sejam mensuradas de forma adequada, o ambiente será o principal responsável pelos padrões encontrados para a composição bacteriana (Fierer *et al.* 2007). Porém o debate sobre o papel e a contribuição relativa desses componentes, espaciais e ambientais, em estruturar a comunidade bacteriana ainda não está encerrado e mais estudos são necessários, principalmente aqueles nos quais o componente espacial não está diretamente relacionado ao componente local, isto é, ecossistemas mais próximos não são necessariamente mais semelhantes em relação às características locais.

A relação espécie – área, na qual o número de espécies aumenta com o aumento da área, tem sido demonstrada para diversos grupos de animais e plantas (Bennett 1997; Harcourt 1999; Lawton 1999), entretanto ainda existe um debate intenso quanto a sua validade para micro-organismos. Arrhenius (1921) foi o primeiro que formalizou a relação espécie-área, adaptando uma equação alométrica usada para medir processos metabólicos e morfológicos, a fim de descrever esta relação. Essa relação pode ser modelada como $S = cA^Z$, onde S é o número de espécies, C é um parâmetro que depende do táxon, região biogeográfica e unidade de área, A é a área estudada e o expoente *Z* é uma constante que representa a inclinação da curva, ou seja, indica qual é o ganho de novas espécies com o aumento da área (Peters 1993; Azovsky 2002). A relação espécie-área provavelmente é um fenômeno universal, porém difícil de observar em bactérias, pois esses micro-organismos apresentam características como alta taxa de dispersão e alto grau de redundância ecológica o que impediria a observação de tais

padrões (Fenchel & Finlay 2005). Outra dificuldade é que os métodos moleculares empregados atualmente são capazes de revelar apenas aquelas espécies que são mais abundantes (populações com densidades superiores a 1% do total), e, portanto os taxa raros dificilmente seriam detectados (Woodcock *et al.* 2006). Padrões como estes para micro-organismos serão detectáveis pelos métodos moleculares apenas se forças ambientais, evolutivas e demográficas afetarem os organismos mais abundantes (Loisel *et al.* 2006).

Apesar da difícil observação, atualmente a relação espécie-área tem sido evidenciada para micro-organismos (Horner-Devine *et al.* 2004b; Bell *et al.* 2005). A alta disponibilidade de nichos é vista como sendo a explicação mais plausível para os micro-organismos, pois estes organismos conseguem perceber o ambiente em escalas muito menores que organismos maiores (Reche *et al.* 2005) No entanto, em geral, os valores encontrados para o parâmetro Z são menores do que aqueles encontrados para macroorganismos e semelhantes aos encontrados para outros organismos do plâncton. Ou seja, os micro-organismos podem apresentar uma relação positiva entre o número de taxa e a área amostrada seguindo uma relação alométrica, e o grau de inclinação da curva estará relacionada ao tamanho dos organismos (Azovsky 2002; Green *et al.* 2004; Reche *et al.* 2005). Organismos menores apresentam taxas de dispersão maior e os baixos valores de *Z* encontrados para micro-organismos podem ser explicados, em parte, porque é improvável que bactérias sejam limitadas pela dispersão. Outra explicação pode ser o nível de resolução taxonômica aplicada. Assim como ocorre em organismos maiores, o ganho de novas espécies com o aumento da área amostrada depende da resolução taxonômica aplicada, ou seja, quanto menor a resolução taxonômica menor o valor de z (Harcourt 1999; Horner-Devine *et al.* 2004b). Para bactérias esta resolução é muito mais ampla do que a unidade de espécie utilizada para

macroorganismos. Logo, se fosse possível definir UTO como equivalente ecológico de unidade de espécie para organismos maiores, talvez fosse possível encontrar relações espécie-área, com valores do expoente *Z* semelhantes para macro e micro-organismos (Horner-Devine *et al.* 2004b). Porém poucos estudos observam padrões semelhantes a esses (Horner-Devine *et al.* 2004b; Reche *et al.* 2005).

No presente trabalho foram utilizados microcosmos naturais para avaliar o papel e a contribuição do espaço e do ambiente na composição da comunidade bacteriana. Microcosmos naturais têm sido bastante utilizados para diferentes abordagens em ecologia (Kitching 2001; Kiflawi *et al.* 2003; Verdonschot *et al.* 2008) e, mais recentemente, a ecologia microbiana também tem utilizado estes ecossitemas como modelos (Reche *et al.* 2005; Langenheder & Ragnarsson 2007). Por serem sistemas relativamente pequenos, permitem que haja uma alta replicabilidade e versatilidade, além de apresentarem limites bem definidos (Soininen *et al.* 2007). Esses ambientes são colonizados por pequenos organismos e são tão ecologicamente complexos e realistas como outros sistemas naturais (Srivastava *et al.* 2004). Dentre os diferentes sistemas classificados como microcosmos naturais os *phytotelmatas* vêm recebendo bastante atenção. O termo *phytotelmata* é utilizado para definir um grupo de plantas que são capazes de acumular água em determinadas estruturas, como buracos em árvores, inter-nós de bambus e as axilas das folhas de algumas plantas (e.g. bromélias-tanque) (Kitching 2001). Estes ecossistemas são geralmente dispostos de forma hierárquica, com cada ambiente sendo formado por um sistema único (e.g. apresenta sua própria teia trófica). Estas características permitem que diferentes questões sejam abordadas utilizando estes ecossistemas como modelos, como a distribuição da diversidade, a importância relativa de fatores locais e regionais na estruturação da comunidade microbiana e no funcionamento dos ecossistemas (Srivastava *et al.* 2004).

Dentre os *phytotelmata* as bromélias-tanque formam um grupo interessante de microcosmos naturais. Estes ecossistemas conseguem acumular água devido à disposição de suas folhas. Este acúmulo de água permite que inúmeros organismos, como macro e microinvertebrados além de micro-organismos, colonizem estes ambientes. Uma característica importante é que a natureza destes ecossistemas (presença, geralmente, de uma matriz inóspita) faz com que haja uma descontinuidade ambiental resultando em bromélias-tanque isoladas das demais e com limites claros. Esta característica pode ser um fator limitante para a dispersão de alguns organismos que habitam as bromélias-tanque uma vez que entre os ambientes existe uma matriz inóspita. Além disso, estas bromélias-tanque provavelmente apresentam um desacoplamento entre o componente espacial (e.g. distância entre os ecossistemas) e o componente local (e.g. características abióticas dos tanques das bromélias), isto é, bromélias mais próximas não são necessariamente mais semelhantes, quanto suas características abióticas, do que bromélias mais distantes. Isto permite avaliar a contribuição das componentes locais e regionais de forma separada, uma vez que estas componentes não apresentam autocorrelação espacial. Provavelmente outras características, como a quantidade de detritos nos copos, visita de outros organismos (e.g. sapos) entre outros fatores, são mais importantes para as comunidades presentes nestas bromélias-tanque do que a distância existente entre estes ecossistemas.

Hipóteses

- Há um desacoplamento entre os componentes regional e local na estruturação das comunidades aquáticas em bromélias-tanque, isto é, bromélias mais próximas não são necessariamente mais semelhantes que bromélias mais distantes.
- Há um aumento do número de espécies de bactérias (no caso, UTO) com o aumento do volume da bromélia-tanque.
- Fatores locais influenciam mais a composição e a riqueza da comunidade bacteriana do que fatores espaciais, nesta escala de amostragem.

Objetivos

- Verificar se as bromélias-tanque apresentaram um padrão de distribuição agregado segundo suas características limnológicas.
- Verificar se existe uma correlação entre o número de espécies de bactérias (UTO) o volume da bromélia-tanque.
- Verificar se os fatores locais (características ambientais) são mais importantes do que fatores regionais (distância e distribuição dos ambientes estudados) para a estruturação da comunidade bacteriana.
- Avaliar quais fatores locais são responsáveis pela variação na riqueza da comunidade bacteriana em bromélias-tanque.
- Avaliar quais fatores locais são responsáveis pela variação na composição da comunidade bacteriana em bromélias-tanque.

Área de Estudo

Este estudo foi realizado no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA da Restinga de Jurubatiba), localizado no norte do estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22°00’ S a 22°30’ S e longitudes 41°15’ W a 42°00’ W. O parque compreende uma área total de 148,6 km^2 abrangendo os municípios de Quissamã, Carapebus e Macaé. O PARNA da Restinga de Jurubatiba é uma das maiores e mais bem preservadas áreas de formações de restinga do Brasil (Figura 1).

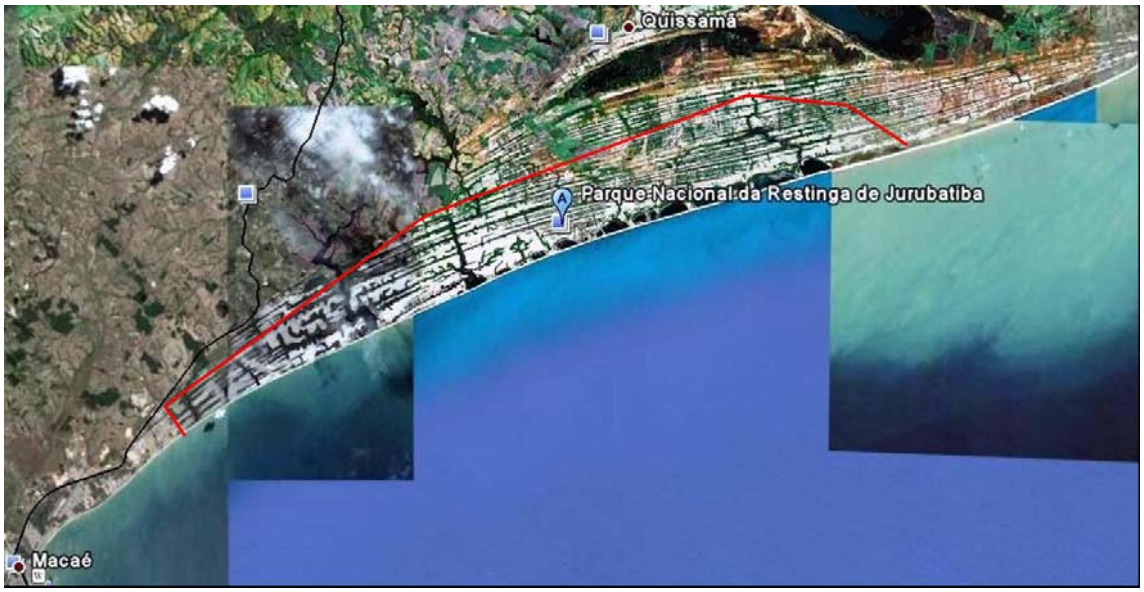

Figura 1. Mapa do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba no Estado do Rio de Janeiro. Em vermelho os limites do PARNA da Restinga de Jurubatiba.

A formação da restinga se deu no período quaternário a partir do recuo do mar, e a justaposição de cordões arenosos paralelos à costa, originando uma planície arenosa e pelo menos dezoito lagoas no interior da área do PARNA da Restinga de Jurubatiba. Os solos são basicamente do tipo regossolo, ocorrendo, no entanto, solos orgânicos e salinos em áreas restritas (Pereira *et al.* 2004).

A região é caracterizada por uma marcada sazonalidade, com precipitação mensal mínima em torno de 40 mm no inverno e máxima de 190 mm no verão, com uma deficiência hídrica entre os meses de junho e setembro (Araujo *et al.* 1998) e com uma preciptação média anual de 1.300 mm (INEMET, 1996). A temperatura média

anual é de 22° C, com a máxima atingindo 29,7° C em janeiro e a mínima de 20,0° C em julho (INEMET, 1996) (Figura 2).

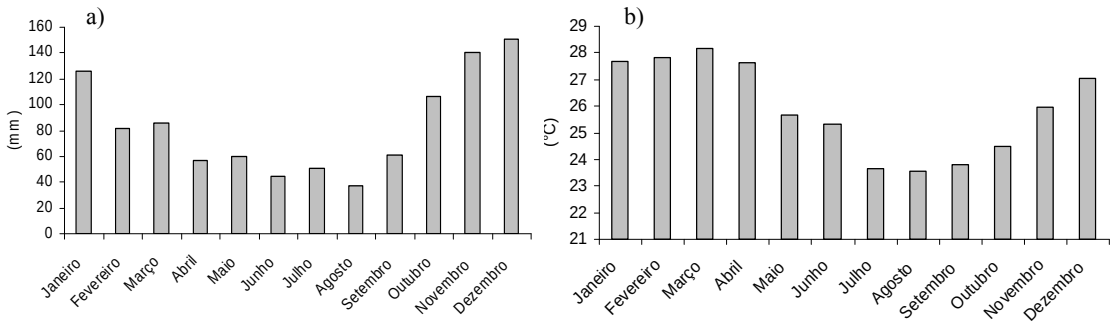

Figura 2: A) Variação média anual entre 1997-2005 na precipitação no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. B) Variação média anual na temperatura entre 1997 e 2005 no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.

Na Restinga existem ao todo 10 formações vegetais, dentre as quais destacam-se a Arbustiva Aberta de Ericácia e a Arbustiva Aberta de Clusia. A Formação Arbustiva Aberta de Clusia é a formação predominate na área, e é caracterizada por apresentar ilhas de vegetação de tamanhos variados (<1 m^2 até >1.000 m^2) intercaladas com areia brancas e nuas, que podem atingir temperaturas elevadas, da ordem de 60° C, em algumas épocas do ano (Araujo *et al.* 1998). Neste contexto, as plantas da família Bromeliaceae apresentam um importante papel, uma vez que muitas delas são encontradas sobre areia nua, contribuindo para a melhoría das condições nutricionais e de umidade no solo (Zaluar & Scarano 2000). Estas plantas, por possuírem a capacidade de armazenar água em seus vasos, são importantes para a manutenção da diversidade neste ambiente, uma vez que diversos organismos utilizam-nas como refúgios, como ambiente para forrageamento, além de algumas plantas utilizarem-na como um ambiente para a germinação. A família das bromeliáceas apresenta grande abundância e diversidade na Formação Arbustiva Aberta de Clusia, estando representadas por oito espécies, *Aechmea bromeliifolia, Aechmea nudicaulis, Aechmea lingulata, Vriesea neoglutinosa, Neoregelia cruenta, Tillandsia gardneri, Tillandsia recurvata, Tillandsia stricta* (Cogliatti-Carvalho *et al.* 2001).

Para o presente estudo, foi selecionada uma área de 12.600 m^2 dentro da Formação Arbustiva Aberta de Clusia, localizada a nordeste da lagoa Cabiúnas, entre a costa e o primeiro braço da lagoa (Figura 3).

Figura 3. Foto do PARNA Restinga e Jurubatiba com seus cordões arenosos característicos e a Lagoa Cabiúnas em destaque. Na área marcada em branco, foram amostradas as bromélias-tanque deste estudo (Google Earth)

A área foi selecionada por ser de fácil acesso e por principalmente apresentar uma alta abundância de espécies de bromélias-tanque. Com base no número de rosetas e na capacidade de captação e acúmulo de água, características necessárias para os objetivos deste trabalho, foram selecionadas as seguintes espécies:

1) *Aechmea lingulata (*Al) - distribui-se na América Central e do Sul. Este gênero (*Aechmea*) apresenta rosetas abertas, fortes e amplas e suas folhas apresentam geralmente espinhos nas bordas. Esta bromélia-tanque possui hábitos tanto terrestres como epífitos (sendo que na restinga é encontrada apenas com o hábito terrestre), tem entre 0,45 a 1,75 m de altura, possui uma abundância relativamente moderada na área estudada, sua biomassa em torno de 800 g (Cogliatti-Carvalho *et al.* 2001) e tem a

capacidade máxima de armazenamento de água aproximadamente de 3.000 ml em suas rosetas (verificado neste estudo).

2) *Aechmea nudicaulis* (An) - ocorre da Venezuela ao sul do Brasil (Rio Grande do Sul). Por ser do mesmo genêro da anterior apresenta algumas características semelhantes. Possui entre 0,5 a 1,0 m de altura, e hábitos terrestres na restinga. É a mais abundante na Formação Arbustiva Aberta de Clusia, onde a sua biomassa varia em torno de 280g (Cogliatti-Carvalho *et al.* 2001) e sua capacidade máxima de armazenamento de água em aproximadamente 500 ml (verificado neste estudo).

3) *Neoregelia cruenta* (Nc) - ocorre no Brasil, mais especificamente no Rio de Janeiro e São Paulo. Vive na areia, rocha, mata pouco densa e próxima a mangues, mas geralmente tem hábitos terrestres. Possui em torno de 20 folhas por roseta, atingindo entre 0,3 e 0,9 m de altura. Possui coloração roxa na parte superior, sendo a segunda espécie mais abundante na Formação Arbustiva Aberta de Clusia. Na restinga, sua biomassa é de aproximadamente 750 g (Cogliatti-Carvalho *et al.* 2001) e sua capacidade maxima de armazenamento de água de aproximadamente 2.000 ml (verificado neste estudo).

4) *Vriesea neoglutinosa* (Vn) - encontra-se no Sudeste e Sul do Brasil. Apresenta rosetas amplas, com cálice central e grande retenção de água. Possui hábito tanto terrestre como epifítico, mas na restinga aparece geralmente com hábitos terrestres. Apresenta baixa abundância relativa na Formação Arbustiva de Clusia, onde alcança 1,0 m de altura. Tem biomassa em torno 615 g (Cogliatti-Carvalho *et al.* 2001) e capacidade máxima de armazenamento de água de aproximadamente 3.000 ml (verificado neste estudo).

Metodologia

Amostragem

Na área selecionada foram marcados aproximadamente dois meses antes do início da amostragem 50 indivíduos de cada espécie de bromélia-tanque, *Aechmea lingulata (*Al), *Aechmea nudicaulis* (An), *Neoregelia cruenta* (Nc), *Vriesea neoglutinosa* (Vn), totalizando 200 indivíduos marcados. Destes indivíduos, foram sorteados 12 de cada espécie, totalizando 48 bromélias-tanque amostradas.

Para avaliar a influência da distância na composição das comunidades bacterianas, foram calculadas as distâncias entre todos os indivíduos. Para isto, quatro indivíduos, um de cada espécie, foram tomados inicialmente como referência e sua posição foi determinada com GPS, coforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Coordenadas geográficas e em UTM dos quatro indivíduos de referência para cálculos das distâncias entre bromélias-tanque.

Espécie	Coordenadas			
	Geográficas		UTM	
	Oeste	Sul	E24k	NUtm
Aechmea lingulata	41° 68' 573"	22° 29' 532"	O223282	7532023
Aechmea nudicaulis	41° 68' 571"	22° 29' 528"	O223284	7532027
Neoregelia cruenta	41° 68' 639"	22° 29' 611"	O223216	7531934
Vriesea neoglutinosa	41° 68' 562"	22° 29' 482"	O223292	7532079

Posteriormente para cada espécie e a partir dos respectivos indivíduos de referência, foram mensurados os azimutes das demais bromélias-tanque e as respectivas distâncias em relação ao indivíduo de referência, com o auxílio de uma bússola e um transferidor de 40 cm de diâmetro, construído especialmente para este fim. A distância de cada um dos indivíduos em relação aos indivíduos de referência foi medida com uma trena. A partir dos dados assim obtidos, ou seja, do azimute e da respectiva distância de cada bromélia em relação à referência (Tabela 1), todas as bromélias selecionadas para

o estudo foram plotadas em um mapa (Figura 4), com auxilio do programa computacional Autocad (versão Autodesk Map 3D 2005). A partir deste mapa foram obtidas as coordenadas UTM de todos os individuos. Para a determinação das distâncias entre todos os pares de plantas amostradas, foi feita a soma dos vetores, com distância d, entre a bromélia de referência e a bromélia 1, e ângulo β com o norte (Figura 5). Os vetores foram decompostos no plano cartesiano e seus vértices calculados pela fórmula:

$$Xi = d*\cos\alpha \text{ e } Yi=d*\text{sen}\alpha \text{ (} \alpha \text{ em radianos),} \qquad (\textit{equação } 1)$$

Onde, i é cada bromélia-tanque amostrada.

Com estas informações, as distâncias (D), par a par, foram calculadas pela seguinte fórmula:

$$D=\sqrt{(Xi+Xi'+Xi'')^2 + (Yi+Yi'+Yi''')^2} \qquad (\textit{equação } 2)$$

O erro foi obtido atraves da equação a seguir:

$$E = \frac{\text{d observada}}{\text{d determinada}} \qquad (\textit{equação } 3)$$

Onde, d observada é a distância observada em campo e d determinada é a distância determinada pela soma de vetores.

O erro encontrado neste método foi de 0,05%, isto é, aproximadamente 0,35 m, o que não é significativo para os objetivos deste trabalho. Assim, apesar das limitações como o erro associado ao transferidor e a utilização da trena, este método foi considerado satisfatório, já que a estrutura hierarquica espacial não foi alterada.

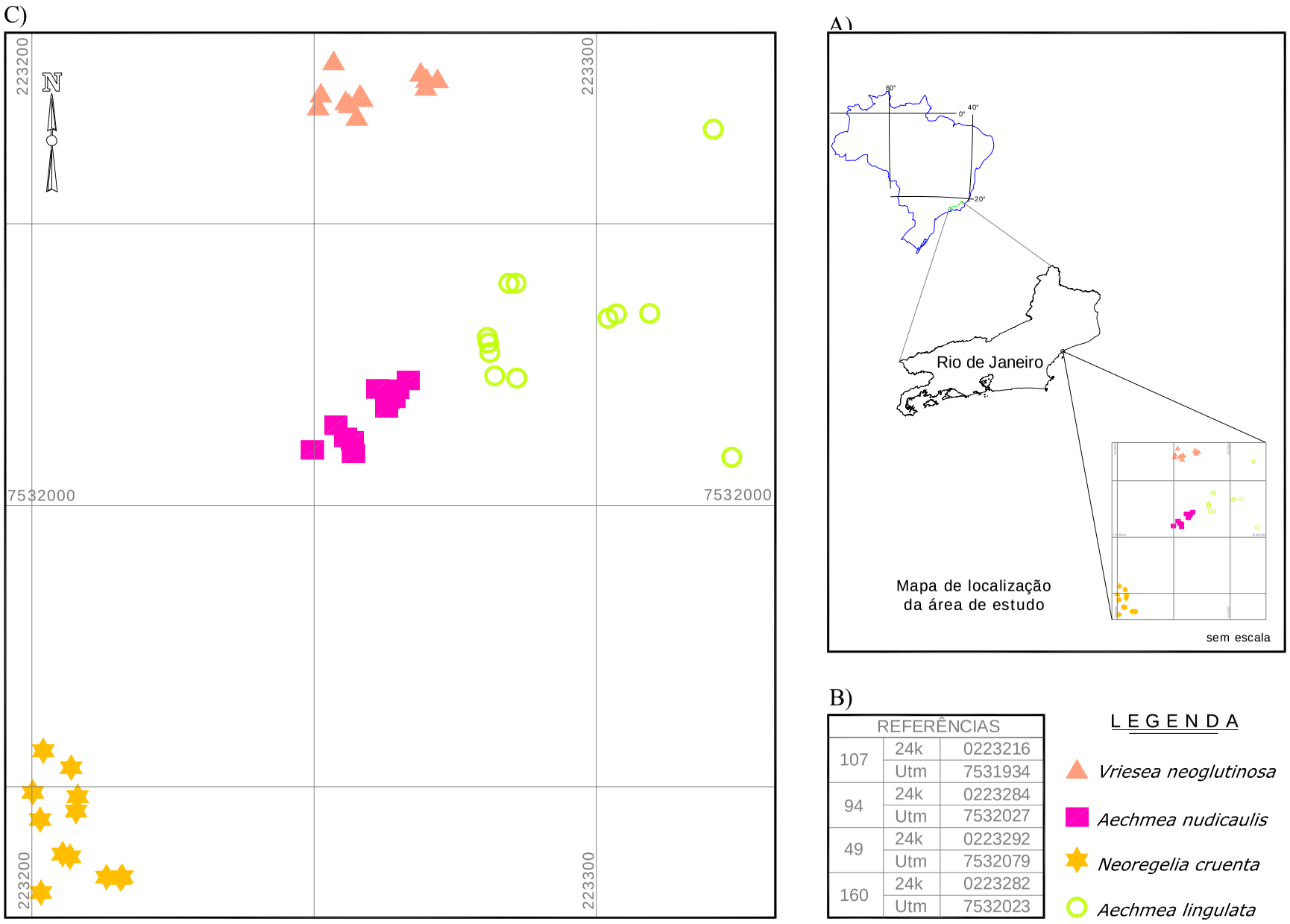

Figura 4. A) localização da área de coleta no Estado do Rio de Janeiro. B) Coordenadas das bromélias de referência em UTM. C) Mapa de distribuição espacial das bromélias-tanque.

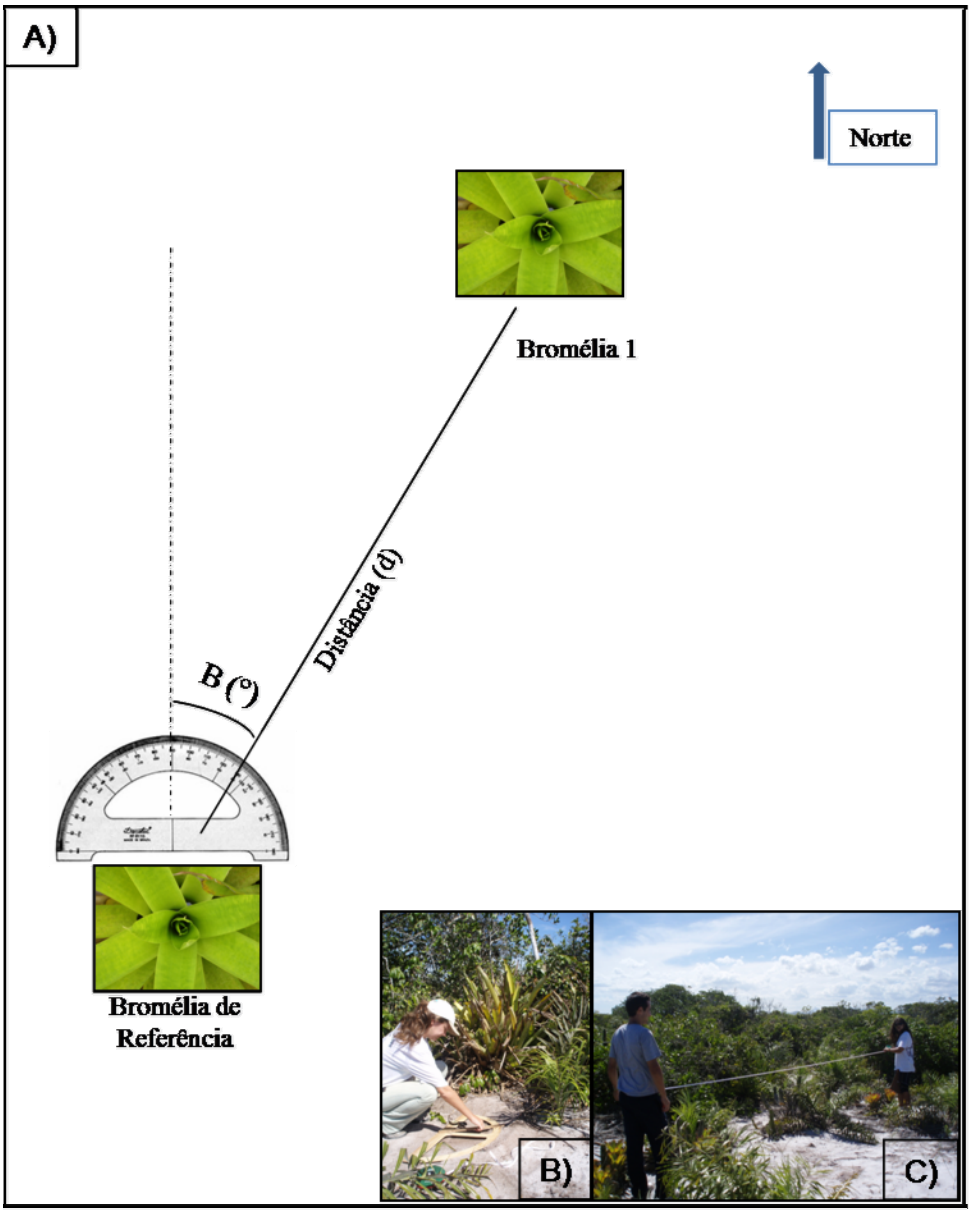

Figura 5. (A) Esquema representativo da medida dos azimutes. (B) Ilustração da medida do ângulo entre a bromélia de referência e a bromélia 1. (C) Ilustração da metragem de distância entre duas bromélias – tanque.

A coleta ocorreu no período de 11 a 17 de janeiro de 2008, período de maior pluviosidade acumulada na região e quando os volumes de água retidos nos copos seriam suficientes para todas as análises abióticas e bióticas. Aproximadamente três dias antes da primeira coleta, uma proveta graduada foi instalada na restinga para mensuração da pluviosidade durante a amostragem. Esta proveta foi mantida na restinga até o final das coletas e a pluviosidade foi avaliada diariamente. As coletas ocorreram

em dias alternados e foram coletadas 3 bromélias-tanque de cada espécie totalizando 12 indivíduos por dia. Desta maneira, foram realizados três blocos de amostragem de modo que possíveis eventos de chuva, que podem alterar a dinâmica dos ecossistemas, pudessem ser considerados nas análises dos resultados. No ínicio das coletas foram sortedas as bromélias que seriam coletadas em cada dia, para que os indivíduos fossem coletados da forma aleatória.

Antes da coleta de água, foram mensurados o diâmetro da planta (a partir da distância entre duas folhas opostas), a temperatura da água no momento da coleta (com um termômetro de bulbo) e o número de copos com água em cada bromélia-tanque. Também foi avaliada a temperatura máxima que a água acumulada em cada bromélia-tanque pode alcançar, através de medição da temperatura ao meio dia em um dia de céu aberto e ensolarado, com um termômetro de bulbo. A água dos copos das bromélias-tanque foi coletada utilizando um aparato de filtragem formado por um pote de plastico e duas mangueiras, que se mostrou eficiente para este tipo de coleta (Figura 6). A água retida em cada copo da bromélia foi misturada formando uma amostra única para cada indivíduo, seu volume foi medido com auxílio de uma proveta graduada e amostra foi mantida em temperatura constante até a chegada ao laboratório. Todos as bromélias-tanque foram coletadas e levadas ao laboratório para medição do volume máximo de água que pode ser armazenada por cada indivíduo.

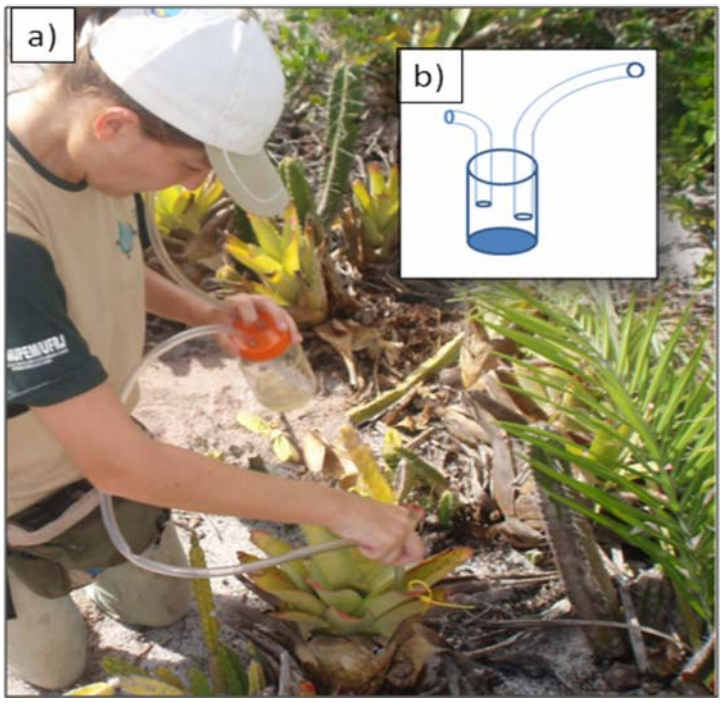

Figura 6. (A) Coleta da água presente nas bromélias-tanque com aparato de filtragem. (B) Desenho esquemático do coletor utilizado para sugar a água presente nas bromélias-tanque.

Análises Laboratoriais

No laboratório, foi realizada a medida de volume máximo (Vol Máx.), colocando água nos copos das bromélias com auxilio de uma proveta, até esta começar a transbordar. Da amostra de água coletada das bromélias-tanque, foram determinados o potencial hidrogeniônico (pHmetro modelo Analion PM608), a turbidez e a concentração de clorofila-*a* (Turbidímetro/Fluorímetro de campo – Turner, previamente calibrado). Uma alíquota de 60 ml foi filtrada em filtro de 45 µm (GF Advantec) para análise dos nutrientes orto-fosfato (PO_4^{3-}), nitrogênio amoniacal (NH_4^+) e nitrato (NO_3^- [2]), esses dois últimos sendo considerados em conjunto como formas de nitrogênio inorgânico dissolvido (NID). Outra alíquota de 20 ml de água foi filtrada em filtros de nitrocelulose com 0,2 µm de porosidade (Millipore). Estes filtros foram separados e congelados para extração do DNA. A água, proveniente desta filtragem em 0,2 µm foi separada para posterior análise de carbono orgânico dissolvido (COD) e cor.

As concentrações do nitrogênio amoniacal foram estimadas segundo (Bower & Holm-Hansen 1980), e as de nitrato foram determinadas através do analisador de nutrientes (FIA – Asia Ismatec), através do qual o nitrato foi reduzido a nitrito em coluna de cádmio (Cd-Cu) (Golterman *et al.* 1978). O orto-fosfato foi estimado segundo (Golterman *et al.* 1978) e para estimar as concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) utilizou-se o analisador de carbono orgânico total (TOC-5000 Shimadzu.). A cor foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 430 nm. Por fim, foi calculada a relação entre carbono autóctone e carbono alóctone (C_{aut}/ $C_{aloc,}$ sendo C_{aut} carbono autóctone e C_{aloc} carbono alóctone), através da razão entre clorofila e cor da água (Carpenter *et al.* 2005). Também foi calculada a razão entre as concentrações de nitrogênio e fósforo (razão N:P) dividindo a concentração de NID, em mol, pela concentração de orto-fosfato em mol.

A composição da comunidade bacteriana foi avaliada atráves da eletroforese em gel de gradiente de desnaturante (DGGE). A extração das amostras foi realizada de forma direta utilizando o "Kit" de extração de DNA para solo (FastDNA Spin kit for soil), e metade do filtro de nitrocelulose de poro 0,2 µm contendo as células bacterianas.

Após a extração os fragmentos foram amplificados utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos U968f – GC1 (grampo GC + 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3'), que é homologo à região 968-984 do gene rRNA 16S de *Escherichia coli,* e L1401r (5'GCG TGT GTA CAA GAC cg 3') que é homologo à região 1385-1401 do mesmo gene (Nubel *et al.* 1996). A solução do "Mix" de PCR é formada por 5 µl de tampão da enzima *Taq*-polimeraze, 5 µl de MgCl2, 1 µl de dNTP (constituída pelas quatro bases nitrogenadas, guanina, citosina, timina e adenina), 0,5 µl de BSA, 0,5 µl de formamida, e 0,5 µl da enzima *Taq*-polimeraze e 33,5 µl de água Mili-Q estéril, e 2 µl de amostra extraída totalizando 50

µl. Esta solução foi submetida ao programa de PCR constituido de 1 ciclo de desnaturação das fitas de DNA por 3 min a 94° C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C e 1 min a 72° C, e 10 min a 72° C para a extensão. A amplificação foi confirmada através de uma eletroforese em gel de agarose 1,2%, aplicando 5 µl de amostra e 3 µl de corante, sob uma corrente de 75V embebido em tampão TBE 1X, e corado com brometo de etídio por 15 min e visualizado em um transluminador (Fisher Scientific).

As amostras com DNA amplificado foram submetidas a eletroforese no gel de acrilamida, contendo o gradiente linear de desnaturante de 45% a 65%, formado a partir das soluções 0% e 70%. Para este procedimento utilizou-se 30 µl do produto de PCR com 15 µl de corante específico. O gel polimerizou em aproximadamente 2 h e em seguida este foi acoplado ao aparelho de DGGE com tampão TAE diluido em água deionizada (0,5) e pré-aquecido a 60° C. A eletroforese foi realizada sob uma corrente de a 75V, 60° C por 16 h. Após a corrida, o gel foi corado com uma solução de SYBER Green, que cora apenas DNA e foi revelado e digitalizado pelo sistema de captura de imagem STORM. Os géis foram analisados pelo programa BIOnumériс. As bandas, posicionadas em diferentes pontos do gel, foram consideradas estirpes diferentes e desta forma, representativas da riqueza/ou diversidade genética bacteriana. A partir destas bandas foi criada uma matriz de presença e ausência que foi utilizada nas análises estatísticas.

Análises Estatísticas

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov, utilizando o programa computacional GraphPad Prism 4.0. Em seguida os dados foram normalizados através da ferramenta Box-Cox, exceto o pH (que já é apresentado na base logarítmica), a temperatura máxima e a riqueza (que já

apresentavam distribuição normal). Para a transformação dos dados foi utilizado o pacote estatístico Statistica 8.0. Os dados normalizados foram padronizados segundo o desvio padrão utilizando o pacote estatístico Pcord 5.0.

Para avaliar se bromélias-tanque mais próximas apresentavam características físico-químicas mais similares do que bromélias-tanque mais distantes foi realizado um Teste de Mantel utilizando o pacote estatístico Pcord 5.0, com 15.999 aleatorizações, número máximo de aleatorizações permitida pelo programa. Este teste foi realizado com as matrizes de distância e abiótica, sendo esta última formada pelas variáveis: diâmetro, número de folhas, número de copos, pH, temperatura, temperatura máxima, volume, volume máximo, PO_4^{3-}, NID, COD, C_{aut}/ C_{aloc}, razão N:P, turbidez, clorofila-*a*, e produção bacteriana. Uma Análise dos Componentes Principais (ACP) baseada em uma matriz de covariância, associada ao teste de Monte Carlo com 15.999 aleatorizações, foi realizada para verificar quais variáveis estavam mais relacionados às diferentes espécies de bromélias-tanque. Para esta análise foram utilizadas as variáveis pH, temperatura, volume, turbidez, PO_4^{3-}, NID, COD, C_{aut}/ C_{aloc} e razão N:P. A ACP foi seguida de uma ANOVA unifatorial dos escores das bromélias-tanque para avaliar se havia grupos estatisticamente diferentes segundo as características físico-químicas. Diferente do Teste de Mantel acima descrito, as variáveis volume máximo, temperatura máxima, clorofila-*a* não foram incluídas na ACP, pois se correlacionaram de forma significativa com outras variáveis já incluídas no modelo, evitando assim resultados tendenciosos.

Para avaliar quais variáveis limnológicas melhor explicam a variação na riqueza de UTO foi realizado o Critério de Seleção de Modelos Akaike com temperatura máxima, número de copos, PO_4^{3-}, clorofila, COD, NID, C_{auto}/ C_{aloc}, utilizando o programa computacional SAM 3.0(Rangel *et al.* 2006). Foram retiradas desta análise aquelas variáveis que não apresentaram nenhum poder explicativo em análises de

Critério de Seleção de Modelos Akaike realizadas anteriormente. Foram considerados modelos representativos aqueles que apresentaram o $\Delta Ci < 2$. Para aqueles modelos que apresentaram alto grau de incerteza foi realizado o Model Averaging. Esta ferramenta permite avaliar a importância relativa das variáveis preditoras entre os modelos selecionados.

A influência do espaço e do ambiente, além da interação desses dois fatores sobre a composição da comunidade bacteriana foi avaliada através da Análise de Redundância (RDA). Para minimizar a autocorrelação espacial nesta análise foram utilizados filtros espaciais (evitando análises tendenciosas) a partir dos dados de distância entre as bromélias-tanque, calculado com o programa NTSY. A matriz abiótica foi formada por diâmetro, número de copos, temperatura máxima, turbidez, volume, COD, NID, PO_4^{3-}, razão N:P, razão C_{auto}/ C_{aloc} e espécies de bromélia-tanque. Foram excluídas da matriz abiótica as variáveis que apresentaram correlações significativas (r- Pearson). A significância das frações (espacial e ambiental) foi testada através do teste de permutações com 999 aleatorizações. Uma Análise de Redundância Parcial, pRDA, com 10.000 aleatorizações, foi realizada para estimar a contribuição relativa de cada variável ambiental na variação da composição de UTO, utilizando o programa estatístico VarCan V.1 para Matlab.

Finalmente, para avaliar se há relação entre o numero de UTO e o volume de água presente em cada bromélia, medida tomada como área, uma vez que os ambientes aquáticos são tridimensionais, foi feita uma análise de regressão linear simples com os dados logaritmizados de riqueza e volume, utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism 5.0.

Resultados

As características fisico-químicas apresentaram grande variação tanto entre os indivíduos da mesma espécie de bromélia-tanque (Tabela 2), quanto entre as diferentes espécies estudadas. O volume coletado variou entre as bromélias, sendo que *A. lingulata* e *V. neoglutinosa* apresentaram os maiores valores (em torno de 330 ml) e *A. nudicaulis* apresentou os menores valores (110 ml). *A. nudicaulis* também comporta um menor volume máximo de água (325 ml) e apresenta o menor número de copos com água (5 copos por bromélia). Já *V. neoglutinosa* apresentou o maior número de copos com água (22 copos por bromélia). Um padrão similar ao volume coletado também foi observado para diâmetro (*A. lingulata* e *V. neoglutinosa* apresentaram os maiores valores, 71 cm e 45 cm respectivamente e *A. nudicaulis* apresentou os menores valores, 20 cm). *A. nudicaulis*, *N. cruenta e V. neoglutinosa* apresentaram altos valores para temperatura e temperatura máxima, 35 °C e 37 °C. Já *A. Lingulata*, que ocorre geralmente dentro das moitas de Clusia, apresentou menores valores de temperatura e temperatura máxima (28 °C para os dois parâmetros). Todas as bromélias-tanques geralmente apresentaram um pH ácido, entre 4,5 e 5,5. As maiores concentrações de orto-fosfato foram encontradas em *A. lingulata* e *N. cruenta* (1,97 μM e 1,39 μM para orto-fosfato respectivamente), sendo estes valores o dobro das concentrações encontradas em para *A. nudicaulis* e *V. neoglutinosa* (0,5 μM e 0,67 μM, respectivamente). Já em relação às concentrações de NID, *A. lingulata* (14,63 μM) e *A. nudicaulis* (11,09 μM) apresentaram valores semelhantes e maiores do que as concentrações encontradas em *V. neoglutinosa* (6,68 μM) e *N. cruenta* (7,31 μM). A razão N:P foi maior para *A. nudicaulis* e as menores razões N:P foram encontradas *A. lingulata.* Para as concentrações de COD *A. lingulata* apresentou os maiores valores, alem de apresentar, também, altos valores para cor. Já *N. cruenta* apresentou os menores valores para COD e cor e geralmente apresenta os

maiores valores de clorofila. Estes resultados indicam que em *N. cruenta* a principal fonte de carbono é de origem autóctone que é confirmado pela alta razão entre Clorofila-a e cor (razão chlorofila-a/cor = 715,54). Para *A. nudicaulis* esta razão também se mostrou relativamente alta (razão chlorofila-a/cor = 100,9) indicando que neste grupo também existe uma alta concentração de carbono de origem autóctone, o que não ocorre nem com *A. lingulata* (razão chlorofila-a/cor = 24,35) e nem *V. neoglutinosa* (razão chlorofila-a/cor = 17,97), que provavelmente apresentam maiores fontes de carbono de origem alóctone. As espécies do gênero *Aechmea* (*A. lingulata A. nudicaulis*) apresentaram os menores valores de turbidez, em torno de 130 UTN, enquanto que *N. cruenta* apresentou em geral águas mais túrbidas (mediana de 221,36 UTN) (Tabela 2).

As espécies de bromélias-tanque selecionadas para este estudo ocorreram de forma espacialmente agregada, isto é, bromélias da mesma espécie estão localizadas mais próximas entre si do que bromélias de espécies diferentes. Neste caso, a menor distância observada foi entre dois indivíduos de *V. neoglutinosa* (0,62 m), e a maior distância entre um indivíduo de *A. lingulata* e um indivíduo de *N. cruenta* (189,26 m). O teste de Mantel realizado entre as matrizes de variáveis abióticas e a distância entre as bromélias-tanque não apresentou resultado significativo ($r = 0,02$, $p = 0,19$) Assim, a falta de correlação entre as matrizes de variáveis abióticas e a distância evidencia que bromélias mais póximas não são mais similares quanto as suas características físico-químicas do que aquelas que estão mais distantes.

Tabela 2. Mediana, coeficiente de variação (CV), mínimo (Mín) e máximo (máx) dos parâmentros Temperatura máxima (Temp. Máx.), Volume máximo (Vol. Máx.), Diâmetro, pH, Número de Copos (N° de copos), Volume, Clorofila-*a*, Turbidez, Cor, Orto-fosfato (PO_4^{3-}), N-amôniacal (NH_4^+), Nitrogênio Inorgânico Dissolvido (NID), Razão entre Nitrogênio e Fósforo (Razão N:P), Carbono Orgânico Dissolvido (COD), Razão entre Carbono Autóctone e Carbono Alóctone (C_{aut}/ C_{aloc}) e Riqueza das espécies estudadas.

	Aechmea nudicaulis	*Aechmea lingulata*	*Vriesea neoglutinosa*	*Neoregelia cruenta*
Temperatura Máxima (°C)	35,50 (6,85) (30,0 – 40,0)	28,5 (8,26) (26,0 – 33,0)	32,0 (9,0) (28,0 – 38,0)	35,0 (8,97) (32 – 42)
Volume Máximo (ml)	325 (42,71) (125,0 – 560,0)	1100,0(56,85) (450,0 – 3000,0)	1295 (51,5) (550 – 3000)	975,0 (46,61) (320,0 – 2000,0)
Diâmetro (cm)	20,0 (6,04) (13,0 – 35,0)	71 (33,42) (44,0 – 140,0)	45,5 (18,7) (32 – 65)	28,5 (22,0) (18,0 – 44,0)
Temperatura (°C)	37,0 (19,01) (28,0 – 54,9)	28,0 (14,7) (24,0 – 37,0)	29 (17,13) (25,8 – 45)	31,6 (8,78) (25,0 – 34,0)
pH	4,72 (3,01) (3,82 – 5,90)	5,6 (11,28) (4,24 – 6,3)	4,95 (9,9) (4,3 – 6,0)	5,11 (12,57) (3,97 – 6,43)
N° copos	5,0 (29,42) (3,0 – 8,0)	9,5 (27,34) (6,0 – 15,0)	22,5 (26,6) (15,0 – 33,0)	12 (27,93) (8,0 – 20,0)
Volume (ml)	108,5 (63,7) (62,0 – 370,0)	335 (67,47) (75 – 800)	337,5 (71,6) (80,0 -1015,0)	322,0 (53,0) (145,0 – 771,0)
Clorofila-*a* ($\mu g\ l^{-1}$)	2,03 (110,1) (0,03 – 10,00)	3,87 (119) (0,27 – 39,47)	1,67 (171,25) (0,026 – 27,1)	13,36 (45,85) (5,78 – 27,45)
Turbidez (UTM)	133,3 (103,9) (15,14 – 606,60)	130,65 (85,30) (69,8 – 794,5)	185,3 (86,88) (33,36 – 616)	221,36 (89,42) (19,59 – 658,4)
Coloração da água	0,01 (141,05) (0,00 – 0,20)	0,18 (53,4) (0,02 0,31)	0,034 (91,04) (0,01 – 0,175)	0,018 (89,7) (0,00 – 0,096)
PO_4^{3-} (μM)	0,5 (162,4) (0,01 – 6,20)	1,98 (287,42) (0,07 – 200)	0,670 (203,94) (0,02 – 26,06)	1,39 (90,44) (0,23 – 6,5)
NH_4^+ (μM)	5,8 (76,6) (0,34 – 16,70)	9,52 (197,9) (0,34 – 158,58)	4,24 (88,17) (0,34 – 17,27)	4,96 (74,86) (0,67 – 13,88)
NO_3^- (μM)	3,7 (83,7) (2,20 – 17,4)	5,26 (61,6) (2,06 – 14,56)	3,0 (64,44) (1,04 – 7,34)	3,51 (131,6) (1,48 – 28,45)
NID (μM)	11,09 (61,66) (3,67 – 25,00)	14,63 (151) (2,4 – 161,65)	6,67 (68,0) (2,63 ± 23,7)	7,31 (79,64) (4,0 – 34,45)
Razão N:P	22,9 (192,7) (1,3 – 1184,2)	6,19 (178,64) (0,8 – 202)	8,54 (253,6) (0,37 – 668,8)	10,28 (100,3) (0,61 – 37,92)
COD ($mg\ l^{-1}$)	57,36 (89,8) (14,40 – 221,10)	118,4 (72,6) (47,9 – 378)	47,1 (68,02) (2,63 ± 23,7)	35,48 (99,19) (10,84 – 239,83)
C_{aut}/ C_{aloc}	101 (113,1) (1,56 – 527,00)	24,35 (205,14) (1,2 – 1233,46)	17,97 (175,6) (0,91 – 590,56)	715,53 (96,42) (88,0 – 3206,2)
Riqueza	27,5 (13,7) (21-35)	28,0 (19,52) (19 – 32)	30,5 (8,7) (25 – 33)	26,5 (17,01) (22 – 37)

A ACP foi formada por uma matriz com 9 variáveis ambientais: pH, temperatura, volume, turbidez, PO_4^{3-}, COD, NID, razão N:P, e razão C_{aut}/ C_{aloc} (Figura 7), e 48 bromélias-tanque (Figura 8). O potencial hidrogeniônico e as concentrações de orto-fosfato e COD estiveram mais relacionados com o componente 1, enquanto que temperatura, volume, turbidez e a concentração de NID apresentaram-se mais relacionados com o componente 2 (Tabela 3). A razão N:P mostrou-se relacionada a ambos componentes. Esta análise gerou dois componentes principais significativos, explicando 46,5% da variação ambiental (Tabela 4). Apesar das espécies de bromélias-tanque ocorrerem de forma espacialmente agregada, a ANOVA dos scores das bromélias-tanque evidenciou apenas que *A. Nudicaulis* é estatísticamente diferente de *A. Lingulata* (p< 0,00), enquanto que as outras espécies não apresentaram diferenças significativas (Figura 8). Este agrupamento diferente entre estas duas espécies, não havendo nenhuma variável limnólogica determinante pela distribuição das espécies, *A. Nudicaulis* e *A. Lingulata*, ocorreu principalmente a grande diferença existente entre o volume e a temperatura destes dois ambientes, que podem ser considerados dois extremos de um gradiente ambiental. Assim, as bromélias-tanque foram consideradas como ecossitemas diferentes e representaram unidades amostrais diferentes.

Tabela 3. Resultado sumarizado da ACP com as variáveis limnológicas. Em negrito as variáveis mais correlacionadas com a componente 1 ou 2.

Variáveis	Componente 1	Componente 2
pH	**-0,32**	0,08
Temperatura	0,36	**-0,43**
Volume	-0,20	**-0,31**
Turbidez	-0,23	**0,45**
PO_4^{3-}	**-0,50**	-0,27
COD	**-0,45**	0,19
NID	-0,07	**0,41**
Razão N: P	**0,47**	**0,44**
C_{aut}/ C_{aloc}	0,02	-0,20

Tabela 4. Componentes significativas da ACP segundo o teste de Mantel. Porcentagem de explicação de cada componente e da soma dos componentes.

	Componente 1	Componente 2
Teste de Mantel	$p < 0,00$	$p < 0,00$
Percentual de Variação Explicada	27,4	19,1
Percentual Total da Variação Explicada	46,5	

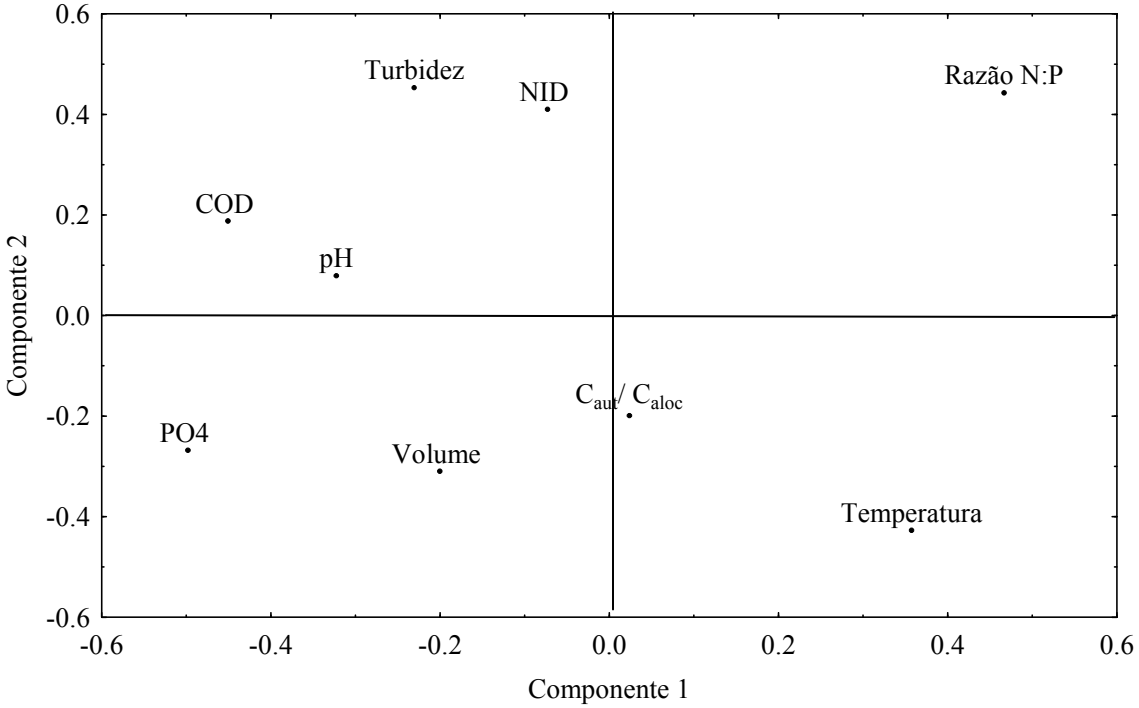

Figura 7. Ordenação da análise de Componentes Principais das variáveis limnológicas.

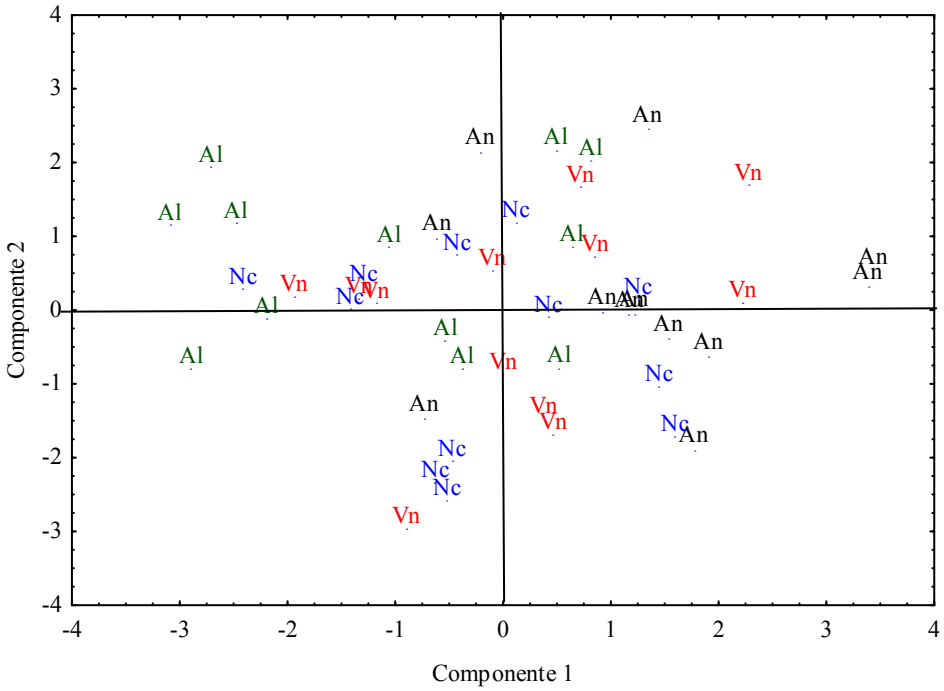

Figura 8. Ordenação da ACP das bromélias-tanque. *V. neoglutinosa* (Vn), *N. cruenta* (Nc), *A. nudicaulis* (An) e *A. lingulata* (Al).

A riqueza da comunidade bacteriana variou entre 19 e 37 UTO, sendo que os menores valores de riqueza foram encontrados em *A. lingulata*, e as maiores riquezas foram encontradas em *N. cruenta*. *A. lingulata* (média 25,83 ± 5,04 bandas) apresentou maior variação intra-específica quanto à riqueza de bandas revelada pelo perfil gerado pelo DGGE (Tabela 2).

A análise de regressão linear simples entre a riqueza de UTO e o volume resultou em uma relação não significativa ($r = 0,00$, $p = 0,97$), ou seja, não existe para este estudo, uma relação que corrobore a hipótese de que a riqueza de espécies bacterianas seja afetada pelo o volume da bromélia-tanque (Figura 9).

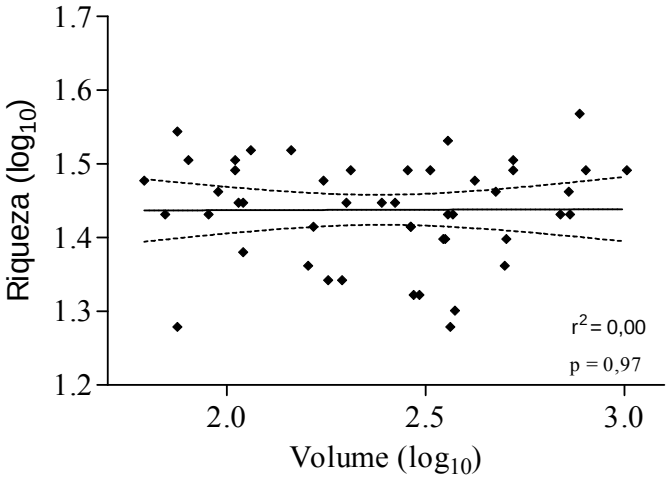

Figura 9. Regressão linear entre riqueza (número de OTU) e o volume total de água presente em cada bromélia-tanque.

A seleção de modelos a *priori* segundo o critério de segunda ordem Akaike (AICc) selecionou 8 modelos que melhor explicam a variação na riqueza da comunidade bacteriana. Vale ressaltar que foram considerados modelos com boa explicabilidade aqueles com variação no critério de Akaike menor do que 2. O melhor modelo para os ambientes estudados inclui número de copos com água, PO_4^{3-}, e a origem do carbono expressa pela razão clorofila/cor, explicando no total 26% da variação da riqueza. Entretanto, há um alto grau de incerteza evidenciado pela razão entre os pesos dos modelos em relação ao melhor modelo (*W1/Wi*) (Tabela 5), dificultando a seleção de um único modelo. Este resultado indica que todas as variáveis selecionadas (temperatura máxima, número de copos, PO_4^{3-}, clorofila, COD, NID, C_{auto}/C_{aloc}) são importantes e podem afetar a riqueza de UTO. Utilizando o critério de importância, fornecido pela estimativa média dos parâmetros, pode-se observar que as variáveis selecionadas pelo melhor modelo, ou seja, número de copos, PO_4^{3-}, e a origem do carbono, são as principais variáveis que afetam a riqueza da comunidade bacteriana (Tabela 6). O PO_4^{3-} esteve presente em todos os modelos selecionados, o número de copos em 77% e a origem do carbono em 67% dos modelos apresentados.

Tabela 5. Resultados da seleção *a priori* de modelos pelo critério de seleção de segunda ordem de Akaike (AICc) sobre as variáveis que melhor explicam a riqueza de UTO nas bromélias-tanque. Apenas os modelos com valores de Δ AICc < 2 são mostrados e indicam boa explicabilidade do modelo sobre a variável resposta.

Variáveis					r²	AICc	Δ AICc	AICc *Wi*	*W1/Wi*
C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}	N° copos			0,26	85,19	0,00	0,05	
Temp Max	C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}	N° copos		0,30	85,52	0,33	0,04	1,18
C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}	NH_4^+	N° copos		0,28	86,41	1,22	0,03	1,86
C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}	COD	N° copos		0,28	86,66	1,48	0,03	2,08
PO_4^{3-}	N° copos				0,20	86,74	1,56	0,02	2,17
Temp Max	C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}			0,23	86,96	1,77	0,02	2,48
Temp Max	C_{auto}/C_{aloc}	PO_4^{3-}	NH_4^+	N° copos	0,31	86,97	1,78	0,02	2,48
Temp Max	PO_4^{3-}	N° copos			0,23	87,01	1,82	0,02	2,48
Temp Max	PO_4^{3-}				0,19	87,31	2,12	0,02	2,89

Tabela 6. Resultados da importância das variáveis limnológicas para os ambientes estudados segundo a seleção de modelos a *priori* de segunda ordem (AICc). Em negrito as variáveis que melhor explicam a riqueza bacteriana.

Variáveis	Importância	Erro Padrão
Constante	-	0,18
Temp Max	0,57	0,09
C_{auto}/C_{aloc}	**0,61**	0,11
Clorofila	0,27	0,05
PO_4^{3-}	**0,73**	0,12
NH_4^+	0,35	0,05
COD	0,28	0,05
Razão N:P	0,28	0,06
N° copos	**0,70**	0,12

O perfil gerado pelo DGGE quanto à composição da comunidade bacteriana não evidenciou nenhuma UTO indígena, ou seja, não houve bandas presentes em apenas uma amostra. Da mesma maneira não houve UTO que estivessem presentes em todas as amostras, mas em torno de 80% das estirpes estiveram presentes em mais de 70% delas, conferindo uma alta similaridade às bromélias. Segundo a Análise de Redundância o espaço não contribuiu com a variação na composição da comunidade bacteriana, ou seja, a distribuição espacial dos ambientes estudados neste trabalho não foi responsável pela variação na composição da comunidade bacteriana. O ambiente, apesar de

influenciar apenas 5% a variação da composição bacteriana, foi significativo. E a maior parte da variação na composição da comunidade bacteriana não pode ser explicada nem pelo espaço, nem pelo ambiente e nem pelos dois em conjunto.

A Análise de Redundância Parcial (pRDA) para variáveis abióticas evidenciou que os principais fatores que afetam a composição da comunidade bacteriana foram temperatura máxima, turbidez e a razão C_{aut}/C_{aloc}, explicando, respectivamente, 3,8, 3,7 e 3,4% da variação total da composição bacteriana. As outras variáveis incluídas na análise não tiveram influência na composição da comunidade bacteriana (tabela 7).

Tabela 7. Resultado da RDA que determina a contribuição relativa (R^2 ajustado) e significância associada (*P*) de cada variável ambiental na variação da composição da comunidade bacteriana (dados de presença e ausência)

Variável	R^2 ajustado	*P*
Bromélia	0,029	0,090
C_{aut}/C_{aloc}	**0,034**	**0,056**
N° de Copos	0,031	0,066
Diâmetro	0,021	0,144
NID	0,004	0,368
Razão N:P	-0,003	0,525
Temp. Max.	**0,038**	**0,042**
Turbidez	**0,037**	**0,045**
Volume	-0,001	0,477
COD	0,005	0,353

Discussão

Os ecossistemas aqui estudados apresentaram ampla variação em suas características limnológicas em uma escala espacial relativamente pequena (i.e. a distância entre as plantas foi sempre menor que 250m). Observou-se que cada planta constituiu um ecossistema diferente e que, apesar das bromélias da mesma espécie ocorrerem de forma agregada, inclusive por causa de seu crescimento clonal, esta distribuição aparentemente não teve influência nas características fisico-químicas da água presente nos tanques das bromélias. O agrupamento diferente entre *A. lingulata e A. nudicaulis*, pode ser principalmente porque estas duas espécies representam um gradiente ambiental pro exemplo quando consideramos temperatura e volume de agua em cada bromélias-tanque. Além disso, a localização dos indivíduos desta duas espécies ocorre principalmente em lugares opostos, ou seja, a maioria das *A. nudicaulis* estão expostas ao sol, enquanto que *A. lingulata* ocorre principalmente na borda e interior das moitas de Cluisa. Provavelmente, são estas diferentes posições dos indivíduos das quatro espécies de bromélias-tanque, que resulte na grande variação em relação às características limnológicas destes sistemas. Por exemplo, plantas que estão localizadas dentro das moitas de Clusia recebem um aporte de matéria orgânica alóctone maior (e.g. folhas) do que aquelas que se localizam exposta ao sol e longe de fontes deste tipo de material. Outro fator que pode contribuir é a visita de organismos como sapos, que não ocorre com a mesma frequência em todas as plantas. Como resultado, as características limnológicas dos ambientes estudados apresentam uma grande variação sendo possível o agrupamento apenas daqueles ambientes que são os extremos do gradiente ambiental como é o caso de *A. nudicaulis* e *A. lingulata*.

A hipótese de que volumes maiores suportam maior riqueza de UTO foi rejeitada. Esta ausência de relação entre o aumento na riqueza com a área já foi

encontrada para outros grupos do plâncton, como por exemplo, para cladóceros (Cottenie & De Meester 2003). No entanto, esses resultados vão de encontro a alguns recentes trabalhos onde a relação espécies-área, para micro-organismos, se apresentou de forma significativa (Green *et al.* 2004; Horner-Devine *et al.* 2004b; Bell *et al.* 2005), apesar de que na maioria deles, o parâmetro (*Z*) que reflete a contribuição de novas espécies com a área ser menor do que aqueles encontrados por organismos maiores como plantas e animais (Horner-Devine *et al.* 2004b). Uma das possiveis explicações pode estar relacionada à proximidade dos ambientes. Organismos procariotos, geralmente, apresentam altas abundâncias, curto tempo de geração e se dispersam facilmente (Fenchel & Finlay 2004). Estas características aliadas à distância entre os ambientes, permitiria uma constante recolonização e substituição das espécies extintas, o que impediria essa relação entre riqueza de espécies e volume. É essa dispersão constante que seria responsável em homogeneizar os ambientes aumentando a similaridade entre eles, e independente do volume as mesmas espécies seriam encontradas. Além disso, as altas taxas de dispersão podem resultar em taxas de colonização bem maiores do que a as taxas de extinção e competição, o que impediria que tanto o volume, como a arquitetura do habitat ou a estrutura espacial destes ambientes tivessem um forte impacto na riqueza dos micro-organismos (Harrison *et al.* 2006). A presença de formas de resistência nestes organismos, como cistos também podem contribuir para a ausência na relação especies-área, pois estas formas podem servir de fonte de espécies disponíveis para todos os ambientes. Assim esses ambientes podem compartilhar do mesmo pool de espécies e a riqueza é ditada por fatores prioritariamente locais como as condições ambientais (Cottenie & De Meester 2003). Outros fatores como, por exemplo, a presença de distúrbios podem ser mais importantes

em determinar a riqueza do que a área propriamente dita, como pro exemplo a ocorrência de chuvas (Dunn & Loehle 1988).

Um expoente Z positivo e significativo indica um ganho de espécies com o aumento da área amostrada. Presume-se que com o aumento da área, o número de taxa raros é encontrado com uma frequência maior. Entretanto, para ecologia microbiana a revelação de taxa raros dificilmente será possível com as técnicas empregadas atualmente (Woodcock *et al.* 2007). Os métodos de fingerprint, como o DGGE, têm um limite de detcção de 1% , ou seja, só aqueles taxa mais abundantes serão evidenciados nos perfís das comunidades gerados (Pedros-Alio 2006). Assim, a quantidade de seqüências formada a partir de uma amostra com 10^{12} a 10^{15} indivíduos é de aproximadamente 1000 clones. Isto implica em examinar um clone ou seqüência a cada 10^{9} a 10^{12} indivíduos. Se os mesmos táxons são os mais abundantes, tanto em amostras de volume pequeno quanto em volume grande, então a diversidade parecerá ser a mesma simplesmente porque pequenas proporções do ambiente são amostradas e a probabilidade das mesmas espécies serem detectadas é grande (Curtis *et al.* 2006). Neste sentido, os taxa raros só seriam evidentes se houvesse uma alteração na estrutura da comunidade onde houvesse uma mudança daqueles organismos mais abundantes, para isso essas alterações, provavelmente, estariam correlacionadas a alterações nas condições ambientais que permitiria uma alteração da comunidade e que os taxa raros se tornassem mais abundantes. Caso isso ocorra, poderia ser possível observar uma significativa relação entre o número de UTO e a área como observado por (Bell *et al.* 2005).

Outro fator que pode impedir a observação da relação espécies–área é a distribuição dos organismos, ou seja, quando a distribuição destes organismos ocorre de forma agregada, um aumento no volume não significará, necessariamente, uma

alteração na diversidade, principalmente se os organismos mais abundantes não são alterados (Woodcock *et al.* 2007). Além disso, a resolução taxônomica é importante. O nível de resolução taxonômica observada para bactérias é muito mais amplo do que a unidade de espécie utilizada para macroorganismos. Desta forma, os baixos valores ou a ausência de significância dos expoentes *Z* para micro-organismos podem ser reflexos da resolução taxonômica. Logo, se fosse possível definir UTO como equivalente ecológico de unidade de espécie para organismos maiores, talvez fosse possível encontrar relações espécies-área com valores do expoente *Z* semelhantes para macro e micro-organismos (Horner-Devine *et al.* 2004b).

O padrão de distribuição espacial dos organismos fornece informações importantes sobre os mecanismos que regulam a diversidade nos ecossistemas. Apesar dos micro-organismos fazerem parte de importantes processos como ciclos biogeoquímicos e apresentarem grande diversidade, estudos que têm como objetivo entender os processos que regulam a distribuição destes organismos são incipientes. Os resultados sugerem que a composição da comunidade bacteriana foi determinada principalmente por fatores locais, sendo estes responsáveis por cerca de 5% da variação na composição da comunidade bacteriana. Fatores como disponibilidade e qualidade dos nutrientes e número de copos também foram os principais responsáveis pela variação na riqueza, contribuindo com aproximadamente 26% da sua variação. Assim, fatores locais como nutrientes, principalmente Fósforo, temperatura máxima, turbidez, origem do carbono e a heterogeneidade espacial seriam os principais responsáveis por estruturar a comunidade bacteriana. Estes resultados vêm ao encontro de estudos recentes nos quais os fatores ambientais foram os principais determiantes da composição bacteriana (Schauer *et al.* 2005; Fierer *et al.* 2007; Winter *et al.* 2007). Para estes organismos, os fatores ambientais são mais importantes do que os fatores

espaciais, e como conseqüência as condições ambientais poderiam se sobrepor aos fatores espaciais, pois o ambiente agiria como um filtro. Portanto o ambiente seria responsável por selecionar aqueles organismos que são capazes de se estabelecer e reproduzir em determinadas condições (Beisner *et al.* 2006).

A ausência de relação entre os fatores espaciais e a composição da comunidade bacteriana pode indicar que neste conjunto de ambientes a dispersão não seria um fator limitante, já que a dispersão entre estes organismos é considerada relativamente alta (dispersam de forma passiva e apresentam altas abundâncias) (Finlay & Esteban 2007). Entretanto, (Langenheder & Ragnarsson 2007) observaram o efeito dos fatores espaciais em uma escala menor que 500 m, em ambientes distribuídos de forma agrupada em cinco diferentes localidades. Assim, ambientes mais próximos compartilharam de um maior número de UTO do que ambientes mais distantes. A natureza discreta das bromélias tanques não permite que estas comunidades compartilhem de eventos de colonização em comum entre bromélias mais próximas, como acontece nos ambientes estudados por (Langenheder & Ragnarsson 2007) (e.g. ação de sprays marinhos, ou troca direta de indivíduos por transbordamento das poças). A ausência destes eventos pode permitir que a dispersão ocorra de forma aleatória e o ambiente tenha uma ação mais efetiva na composição das comunidades "selecionando" os organismos, uma vez que as altas taxas de crescimento dos micro-organismos permitem que eles respondam rapidamente às condições ambientais (Van der Gucht *et al.* 2007). Outro ponto importante é que a metodologia aplicada neste estudo, o DGGE, é menos sensível que O T-RFLP (Nocker *et al.* 2007). Esta resolução mais refinada pode permitir a detecção de um maior número de UTO raras e evidenciar o efeito dos fatores espaciais na estruturação da comunidade bacteriana.

Os fatores ambientais tais como disponibilidade e qualidade de nutrientes, temperatura máxima, número de copos e turbidez, foram importantes na determinação da riqueza e da composição da comunidade bacteriana e confirmam resultados encontrados por estudos anteriores (Yannarell & Triplett 2004; Beisner *et al.* 2006; Van der Gucht *et al.* 2007; Winter *et al.* 2007). A disponibilidade de nutrientes já é conhecida como um importante fator limitador de processos bacterianos como, por exemplo, a produção bacteriana. Recentemente, tem sido evidenciada a importância dos nutrientes tanto quantitativamente como qualitativamente (Sipura *et al.* 2005). A presença do fósforo, no modelo, pode indicar uma possível limitação do bacterioplâncton por este nutriente. É possível que em ambientes onde as concentrações de fósforo são limitantes, organismos que possuem um aparato mais eficiente em absorvê-los sejam competitivamente superiores e assim mais abundantes (Yu *et al.* 2008). À medida que a disponibilidade deste nutriente aumenta um grupo maior de organismos conseguem absorvê-lo e, portanto podem contribuir com o aumento da riqueza (Winter *et al.* 2007).

Da mesma maneira, o COD já foi evidenciado como importante estruturador da comunidade microbiana (Beisner *et al.* 2006). Entretanto, em nosso sistema a principal influência foi em relação à qualidade do carbono (evidênciada pela razão entre clorofila-a e cor), e não quanto à concentração deste nutriente. Nos microcosmos pode-se observar que existem ambientes com altas concentrações de carbono orgânico dissolvido proveniente tanto de fontes autóctones quanto de fontes alóctones. A utilização do carbono orgânico dissolvido está relacionado à quantidade, disponibilidade e a presença de fontes de carbono mais ou menos labil (Moran & Hodson 1994). Resultados semelhantes foram encontrados quando fontes de carbono

com complexidades diferentes eram disponibilizadas (Van Hannen *et al.* 1999), ou quando os substratos apresentavam diferentes níveis de oxidação (Haack *et al.* 1995).

Além das características químicas, as características físicas dos ambientes podem ter um papel estruturador nas comunidades que vivem em microcosmos naturais, sendo a temperatura um desses fatores (Therriault & Kolasa 1999). Nos microcosmos estudados, a temperatura máxima teve efeito na composição da comunidade bacteriana, sendo responsável por 3% da variação nesta comunidade. A temperatura máxima pode ter um efeito na sobrevivência e taxas de crescimento dos micro-organismos. Ambientes com temperaturas elevadas podem não permitir o estabelecimento de alguns grupos de micro-organismos. *Nitrosospira*, por exemplo, desaparecem completamente quando a temperatura chega a 30°C (Avrahami *et al.* 2003).

A heterogeneidade espacial é um dos mecanismos que podem explicar o aumento do número de espécies em determinada área e pode ser um dos principais mecanismos para o aumento na riqueza das comunidades bacterianas uma vez que as distribuições destes organismos geralmente não são limitadas pela dispersão (Horner-Devine *et al.* 2004a). A heterogeneidade espacial pode ter influenciado a riqueza bacteriana pelo aumento no número de habitats disponíveis para a colonização. Entretanto, o efeito do número de copos na composição da comunidade bacteriana pode ter tido um efeito indireto, uma vez que esta variável está correlacionada negativamente e significativamente com a temperatura máxima. O aumento do número de copos permitirá que a água não chegue a temperaturas tão altas, principalmente os copos mais centrais, este ambiente mais ameno, em relação à temperatura, permitiria que um maior número UTO conseguissem se estabelecer. Outro fator que pode ter um efeito indireto na comunidade bacteriana é a turbidez. Ambientes com maior turbidez podem indicar a existência de um maior número de partículas que servem como substrato para diferentes

espécies de organismos. Além disso, pode representar um outro nível de heterogeneidade espacial, já que estes micro-organismos percebem o ambiente em uma escala espacial bem mais fina do que orgânismos maiores

Apenas 5% da variação da composição bacteriana pode ser explicada pelos fatores ambientais. Da mesma maneira outros estudos que investigam a influência dos fatores locais e regionais na composição bacteriana utilizando métodos de fingerprint, associados a análises multivariada também encontraram baixo grau de explicação (Yannarell & Triplett 2004; Beisner *et al.* 2006; Langenheder & Ragnarsson 2007). Este baixo grau de explicação encontrado pode estar relacionado ao curto tempo de geração, pois esta característica permite que estes organismos respondam de forma rápida às alterações ambientais. Em conjunto com o curto tempo de geração, a grande variação nas características limnológicas dos ambientes estudados pode contribuir para a baixa explicabilidade encontrada. Além disso, existe um conjunto de fatores que não foram contemplados por este estudo. Dentre esses, os fatores bióticos, como predação e competição têm sido importantes estruturadores da comunidade bacteriana. Tem sido evidênciado, por exemplo, que os protozoários tem um papel importante sobre a composição da comunidade bacteriana (Zhang *et al.* 2007). Outro componente biótico que tem um forte impacto sobre a composição da comunidade bacteriana é a lise viral. A lise viral, provavelmente tem um efeito específico e por isso estes organismos teriam um efeito maior na composição da comunidade bacteriana do que na densidade deste organismos (Zhang 2007). Além disso, a composição das comunidades bacterianas pode ser regulada por eventos estocásticos e como resultado apresentar uma distribuição aleatória (Sloan *et al.* 2006).

É importante ressaltar que os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que as técnicas utilizadas possuem algumas limitações e desta forma podem

gerar erros como a formação de heteroduplex e co-migração. Entretanto, a padronização dos parâmetros ligados ao processamento das amostras permite o monitoramento das comunidades microbianas e que estes perfis sejam comparáveis, tornando-os bem representativos destas comunidades (Muyzer *et al.* 1993; Casamayor *et al.* 2000; Loisel *et al.* 2006). Uma premissa importante é a de que as bandas formadas na mesma posição do gel realmente representam o mesmo taxon. Esta premissa foi tomada como verdadeira porque quando bandas formadas na mesma posição do gel são seqüenciadas elas apresentam entre 96 e 97% de similaridade entre as seqüências (Lindstrom 2000). Outra característica importante e que deve ser levada em consideração é a escolha dos iniciadores utilizados na reação de PCR que pode gerar resultados tendenciosos e deve haver cautela na comparação com outros resultados. Neste sentido, a técnica empregada foi considerada válida para o objetivo do estudo.

Conclusões

No presente trabalho foi observado que a distribuição agregada das espécies de bromélias influenciou principalmente as características limnólogicas de *A. lingulata* e *A. nudicaulis*, que representam os extremos de um gradiente ambiental tanto para volume quanto para temperatura. Entretanto, para as outras duas espécies, esta distribuição parece não ter influência nas características limnológicas da água retida nos tanques das bromélias. Estes resultados confirmam, em parte, a hipótese de que existe um desacoplamento entre as componentes regional e local quando se utilizam bromélias-tanque como microcosmos naturais. Outra conclusão encontrada neste estudo foi que a composição da comunidade bacteriana foi influenciada principalmente por fatores locais, sendo que os fatores regionais, avaliados pela distância e padrão de distribuição das bromélias, não afetou a estrutura da comunidade bacteriana. Dentre os fatores locais analisados neste trabalho, destacam-se a origem do carbono, temperatura máxima, turbidez, orto-fosfato e número de copos como as principais variáveis abióticas responsáveis pela variação tanto na riqueza quanto na composição da comunidade bacteriana. Outra conclusão encontrada neste trabalho é que a metodologia aplicada não permitiu avaliar se existe uma relação entre o número de UTO e o volume dos ambientes estudados. Indicando que a técnica empregada pode não permitir este tipo de abordagem quando se utiliza microorganismo procarioto como objeto de estudo.

Referências Bibliográficas

Araujo D.S.D., Scarano F.R., de Sá C.F.C., Kurtz B.C., Zaluar H.L.T., Montezuma R.C.M. & Oliveira R.C. (1998). Comunidade Vegetais do Parque Nacional da Restingá de Jurubatiba. In: *Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ).* (ed. Esteves FdA) Rio de Janeiro, pp. 39-62.

Arrhenius O. (1921). Species and area. *Journal of Ecology*, 9, 95-99.

Avrahami S., Liesack W. & Conrad R. (2003). Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. *Environmental Microbiology*, 5, 691-705.

Azovsky A.I. (2002). Size-dependent species-area relationships in benthos: is the world more diverse for microbes? *Ecography*, 25, 273-282.

Beisner B.E., Peres P.R., Lindstrom E.S., Barnett A. & Longhi M.L. (2006). The role of environmental and spatial processes in structuring lake communities from bacteria to fish. *Ecology*, 87, 2985-2991.

Bell T., Ager D., Song J.I., Newman J.A., Thompson I.P., Lilley A.K. & van der Gast C.J. (2005). Larger islands house more bacterial taxa. *Science*, 308, 1884-1884.

Bennett J.P. (1997). Nested taxa–area curves for eastern United States floras. *Rhodora*, 99, 241-251.

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

Bower C.E. & Holm-Hansen T. (1980). A salicylate-hipoclorite method for determining ammonia in seawater. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Science*, 37, 794-798.

Carpenter S.R., Cole J.J., Pace M.L., Van de Bogert M., Bade D.L., Bastviken D., Gille C.M., Hodgson J.R., Kitchell J.F. & Kritzberg E.S. (2005). Ecosystem subsidies: Terrestrial support of aquatic food webs from C-13 addition to contrasting lakes. *Ecology*, 86, 2737-2750.

Casamayor E.O., Schafer H., Baneras L., Pedros-Alio C. & Muyzer G. (2000). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: Comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 499-508.

Cogliatti-Carvalho L., Freitas A.F.N., Rocha C.F.D. & Sluys M.V. (2001). Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Revista Brasileira de Botânica*, 24, 1-9.

Cohan F.M. (2001). Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*, 50, 513-524.

Cottenie K. & De Meester L. (2003). Connectivity and cladoceran species richness in a metacommunity of shallow lakes. *Freshwater Biology*, 48, 823-832.

Curtis T.P., Head I.M., Lunn M., Woodcock S., Schloss P.D. & Sloan W.T. (2006). What is the extent of prokaryotic diversity? *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 361, 2023-2037.

Dunn C.P. & Loehle C. (1988). Species-area parameter estimation: testing the null modelof lack os relationship. *Journal of Biogeography*, 15, 721-728.

Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S. & Tranvik L.J. (2003). Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3701-3709.

Fenchel T. & Finlay B.J. (2004). The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *Bioscience*, 54, 777-784.

Fenchel T. & Finlay B.J. (2005). Bacteria and island biogeography. *Science*, 309, 1997-1997.

Fenchel T. & Finlay B.J. (2006). The diversity of microbes: resurgence of the phenotype. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 361, 1965-1973.

Ferris M.J., Muyzer G. & Ward D.M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 340-346.

Fierer N., Morse J.L., Berthrong S.T., Bernhardt E.S. & Jackson R.B. (2007). Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology*, 88, 2162-2173.

Finlay B.J. (2002). Global Dispersal of Free-Living Microbial Eukaryote Species. *Science*, 296, 1061-1063.

Finlay B.J. & Clarke K.J. (1999). Apparent global ubiquity of species in the protist genus Paraphysomonas. *Protist*, 150, 419-430.

Finlay B.J. & Esteban G.F. (2007). Body syze and Biogeography. In, pp. 167-185.

Foissner W. (2008). Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation*, 17, 235-242.

Foissner W., Chao A. & Katz L.A. (2008). Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista : Ciliophora). *Biodiversity and Conservation*, 17, 345-363.

Golterman H.L., Climo R.S. & Ohnstad M.A.M. (1978). Methods for Physical and Chemical Analysis of Freshwaters In: *I. B. P. Handbook no 8* Blackwell Scientific Publications Oxford

Green J.L., Holmes A.J., Westoby M., Oliver I., Briscoe D., Dangerfield M., Gillings M. & Beattie A.J. (2004). Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*, 432, 747-750.

Haack S.K., Garchow H., Klug M.J. & Forney L.J. (1995). Analysis of Factors Affecting the Accuracy, Reproducibility, and Interpretation of Microbial Community Carbon Source Utilization Patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1458-1468.

Harcourt A.H. (1999). Biogeographic relationships of primates on South-East Asian islands. *Global Ecology and Biogeography*, 8, 55-61.

Harrison S., Safford H.D., Grace J.B., Viers J.H. & Davies K.F. (2006). Regional and local species richness in an insular environment: Serpentine plants in California. *Ecological Monographs*, 76, 41-56.

Hedlund B.P. & Staley J.T. (2004). Microbial Endemism and Biogeography. In: *Microbial Diversity and Bioprospecting* (ed. Bali AT) Washington DC pp. 225-231.

Horner-Devine M.C. & Bohannan B.J.M. (2006). Unifying ecology to include all creatures great and small. *Trends in Ecology & Evolution*, 21, 473-473.

Horner-Devine M.C., Carney K.M. & Bohannan B.J.M. (2004a). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, 113-122.

Horner-Devine M.C., Lage M., Hughes J.B. & Bohannan B.J.M. (2004b). A taxa-area relationship for bacteria. *Nature*, 432, 750-753.

Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H. & Bohannan B.J.M. (2001). Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4399-4406.

Kiflawi M., Eitam A. & Blaustein L. (2003). The relative impact of local and regional processes on macro-invertebrate species richness in temporary pools. *Journal of Animal Ecology*, 72, 447-452.

Kitching R.L. (2001). Food webs in phytotelmata: "Bottom-up" and "top-down" explanations for community structure. *Annual Review of Entomology*, 46, 729-760.

Langenheder S. & Ragnarsson H. (2007). The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology*, 88, 2154-2161.

Lawton J.H. (1999). Are there general laws in ecology? *Oikos*, 84, 177-192.

Lindstrom E.S. (2000). Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microbial Ecology*, 40, 104-113.

Logue J.B., Burgmann H. & Robinson C.T. (2008). Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria. *Bioscience*, 58, 103-113.

Loisel P., Harmand J., Zemb O., Latrille E., Lobry C., Delgenes J.P. & Godon J.J. (2006). Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 720-731.

Lozupone C.A. & Knight R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11436-11440.

Martiny J.B.H., Bohannan B.J.M., Brown J.H., Colwell R.K., Fuhrman J.A., Green J.L., Horner-Devine M.C., Kane M., Krumins J.A., Kuske C.R., Morin P.J., Naeem S., Ovreas L., Reysenbach A.L., Smith V.H. & Staley J.T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 102-112.

Moran M.A. & Hodson R.E. (1994). Support of Bacterioplankton Production by Dissolved Humic Substances from 3 Marine Environments. *Marine Ecology-Progress Series*, 110, 241-247.

Muyzer G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 317-322.

Muyzer G., Dewaal E.C. & Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Nocker A., Burr M. & Camper A.K. (2007). Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289.

Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M. & Ward D.M. (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 5, 650-659.

Pedros-Alio C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14, 257-263.

Pereira M.C.A., Cordeiro S.Z. & Araujo D.S.D. (2004). Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de Clusia do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil1. *Acta Botanica Brasiliense*, 18, 677-687.

Peters R.H. (1993). *The Ecological Implications of Body Size.* Cambridge University Press, New York.

Rangel T.F.L.V.B., Diniz-Filho J.A.F. & Bini L.M. (2006). Towards an Integrated Computational Tool for Spatial Analysis in Marcoecology and Biogeography. *Global Ecology and Biogeography*, 15, 321-327.

Reche I., Pulido-Villena E., Morales-Baquero R. & Casamayor E.O. (2005). Does ecosystem size determine aquatic bacterial richness? (vol 86, pg 1715, 2005). *Ecology*, 86, 2845-2845.

Rossellö-Mora R. & Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39-67.

Schauer M., Kamenik C. & Hahn M.W. (2005). Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5900-5907.

Schloss P.D. & Handelsman J. (2007). The last word: Books as a statistical metaphor for microbial communities. *Annual Review of Microbiology*, 61, 23-34.

Shade A., Jones S.E. & McMahon K.D. (2008). The influence of habitat heterogeneity on freshwater bacterial community composition and dynamics. *Environmental Microbiology*, 10, 1057-1067.

Sipura J., Haukka K., Helminen H., Lagus A., Suomela J. & Sivonen K. (2005). Effect of nutrient enrichment on bacterioplankton biomass and community composition in mesocosms in the Archipelago Sea, northern Baltic. *Journal of Plankton Research*, 27, 1261-1272.

Sloan W.T., Lunn M., Woodcock S., Head I.M., Nee S. & Curtis T.P. (2006). Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environmental Microbiology*, 8, 732-740.

Soininen J., Kokocinski M., Estlander S., Kotanen J. & Heino J. (2007). Neutrality, niches, and determinants of plankton metacommunity structure across boreal wetland ponds. *Ecoscience*, 14, 146-154.

Srivastava D.S., Kolasa J., Bengtsson J., Gonzalez A., Lawler S.P., Miller T.E., Munguia P., Romanuk T., Schneider D.C. & Trzcinski M.K. (2004). Are natural microcosms useful model systems for ecology? *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 379-384.

Therriault T.W. & Kolasa J. (1999). Physical determinants of richness, diversity, evenness and abundance in natural aquatic microcosms. *Hydrobiologia*, 412, 123-130.

Van der Gucht K., Cottenie K., Muylaert K., Vloemans N., Cousin S., Declerck S., Jeppesen E., Conde-Porcuna J.M., 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20404-20409.

Van Hannen E.J., Zwart G., van Agterveld M.P., Gons H.J., Ebert J. & Laanbroek H.J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 795-801.

Verdonschot R.C.M., Febria C.M. & Williams D.D. (2008). Fluxes of dissolved organic carbon, other nutrients and microbial communities in a water-filled treehole ecosystem. *Hydrobiologia*, 596, 17-30.

Ward D.M. (2006). Microbial diversity in natural environments: focusing on fundamental questions. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 90, 309–324.

Weinbauer M.G. & Rassoulzadegan F. (2007). Extinction of microbes: evidence and potential consequences. *Endagered Species Research*, 3, 205-215.

Whitaker R.J., Grogan D.W. & Taylor J.W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 301, 976-978.

Winter C., Hein T., Kavka G., Mach R.L. & Farnleitner A.H. (2007). Longitudinal changes in the bacterial community composition of the Danube River: a whole-river approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 421-431.

Woodcock S., Curtis T.P., Head I.M., Lunn M. & Sloan W.T. (2006). Taxa-area relationships for microbes: the unsampled and the unseen. *Ecology Letters*, 9, 805-812.

Woodcock S., van der Gast C.J., Bell T., Lunn M., Curtis T.P., Head I.M. & Sloan W.T. (2007). Neutral assembly of bacterial communities. *Fems Microbiology Ecology*, 62, 171-180.

Yannarell A.C. & Triplett E.W. (2004). Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: Investigations using multiple spatial scales. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 214-223.

Yu Y.H., Yan Q.Y. & Feng W.S. (2008). Spatiotemporal heterogeneity of plankton communities in Lake Donghu, China, as revealed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and its relation to biotic and abiotic factors. *Fems Microbiology Ecology*, 63, 328-337.

Zaluar H.L.T. & Scarano F.R. (2000). Facilitação em Restingas de Moitas: Um século de Buscas por Espécies Focais. In: *Ecologia de Restinga e Lagoas Costeiras* (eds. Francisco AE & Lacerda LD) Rio de Janeiro, pp. 3-23.

Zhang H.M. (2007). Inferences on the number of unseen species and the number of abundant/rare species. *Journal of Applied Statistics*, 34, 725-740.

Zhang R., Weinbauer M.G. & Qian P.Y. (2007). Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters. *Environmental Microbiology*, 9, 3008-3018.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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