



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA  
DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

JOSIANE BARROS CHIARAMONTE

**Estrutura e dinâmica sazonal da comunidade de bactérias planctônicas  
em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná**

Maringá  
2013

JOSIANE BARROS CHIARAMONTE

**Estrutura e dinâmica sazonal da comunidade de bactérias planctônicas  
em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro

Maringá  
2013

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"  
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

C532e Chiaramonte, Josiane Barros, 1988-  
Estrutura e dinâmica sazonal da comunidade de bactérias planctônicas em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná / Josiane Barros Chiaramonte. -- Maringá, 2013.  
72 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)-- Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2013.  
Orientador: Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro.

1. Bactérias planctônicas - Comunidade - Estrutura - Diversidade - Planície de inundação - Alto rio Paraná. 2. Bacterioplâncton - Comunidade - Estrutura - Diversidade - Planície de inundação - Alto rio Paraná. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -579.3178209816  
NBR/CIP - 12899 AACR/2

JOSIANE BARROS CHIARAMONTE

**Estrutura e dinâmica sazonal da comunidade de bactérias planctônicas  
em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

**COMISSÃO JULGADORA**

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Presidente)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dionéia Evangelista César  
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho  
DAC/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 1 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: Sala n. 102, 2º andar, Bloco G-90, PEA/UEM.

## AGRADECIMENTOS

*“Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer até onde vai sua influência”. (Henry B. Adams)*

Desde o início da minha formação acadêmica, tive os professores mais competentes em todas as áreas do conhecimento. Seria injusto não lembrá-los neste momento da minha vida, em que mais uma etapa se conclui.

De forma especial gostaria de agradecer o professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho, meu primeiro orientador, pela ajuda e dedicação desde o primeiro ano da graduação. Ao professor Dr. Benedito Prado Dias Filho, meu orientador durante a iniciação científica. Ao professor Dr. Thomaz Aurélio Pagioro, que me acolheu como aluna de mestrado, e apesar de uma grande distância não desistiu de me incentivar e me apoiar nos meus momentos mais difíceis durante essa jornada.

À professora Dra. Dionéia Evangelista César, pela paciência e dedicação com que me acolheu para ensinar a técnica de hibridização fluorescente *in situ*, sem a qual esse trabalho não seria possível.

Ao professor Dr. Luis Felipe Machado Velho pelo auxílio durante as emergências. À Maria do Carmo Roberto, pelo auxílio e suporte durante as análises de laboratório, pela amizade e consolo durante momentos difíceis e pelos incontáveis momentos de alegria e risos durante as coletas em Porto Rico. Por último, mas não menos importante, à professora Dra. Alice Michiyo Takeda, pelo acolhimento em seu laboratório, amizade e conselhos.

*“Um tesouro nem sempre é um amigo; mas um amigo é sempre um tesouro”. (Autor desconhecido)*

Poucas linhas são insuficientes para demonstrar-lhes minha gratidão e apreço. Gisele Daiane Pinha e Flávio Henrique Ragonha (meus irmãozinhos), Eduardo Ribeiro da Cunha, e demais integrantes da turma de mestrado/doutorado PEA, 2010. Daniele Katerine Petsch, Camila Gentilin Bilia, Renata Guglielmetti, Rafael Tramonte, Ana Carolina Aléssio, Gisele Rosin.

Ao pessoal da secretaria, Aldenir e Jocemara, da biblioteca, Salete e João, por estar sempre à disposição. Ao pessoal da base, “Tião”, “Val”, Alfredo e Frora, pelo auxílio durante as coletas.

Enfim, a todos que me ajudaram profissionalmente ou com palavras de amizade, compartilhando bons momentos e os não tão bons momentos.

*“Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada”. (I Cor 13,2)*

Agradeço a Deus e à minha mãe Nossa Senhora que tornaram possível essa conquista pela interseção de São Judas Tadeu, meu patrono.

Aos meus pais, Alcides e Marta, meu irmão, Rodolfo; a toda minha família. De forma especial, ao meu menino, Rafael Rios de Oliveira, pelo apoio, paciência, compreensão e por compartilharmos sempre os bons e maus momentos juntos.

*“Talvez seja este o aprendizado mais difícil: Manter o movimento permanente, a renovação constante, a vida vivida como caminho e mudança”.*  
*(Maria Helena Kuhner)*

# **Estrutura e dinâmica sazonal da comunidade de bactérias planctônicas em ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná**

## **RESUMO**

As diferenças da comunidade bacteriana nos ambientes podem estar relacionadas a diversos fatores como a concentração de nutrientes e a relação com outros microorganismos. A distribuição da comunidade bacteriana entre os ambientes podem influenciar na ciclagem de nutrientes do ecossistema. Nessa perspectiva, foi analisada a distribuição da comunidade bacteriana em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná quanto à existência de diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os ambientes estudados e a sua correlação com as dissimilaridades das condições ambientais. Posteriormente, foi investigado como a comunidade de bactérias planctônicas se altera durante um ciclo hidrológico. Foram realizadas amostragens em 36 ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, distribuídos entre os três principais rios que compõem essa planície e classificados como lagoas com e sem conexão direta com o canal do rio principal, canais e rios. A estrutura da comunidade bacteriana foi analisada considerando a densidade total de bactérias e as abundâncias relativas dos dois domínios *Bacteria* e *Archaea*, das subdivisões do filo Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria) e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*; estimadas através da metodologia de hibridização fluorescente *in situ*. A comunidade bacteriana diferiu, sobretudo de acordo com as características dos rios aos quais os ambientes são conectados. Diferenças nas concentrações de clorofila-*a*, nitrogênio total e amoniacal e ortofosfato foram as principais variáveis limnológicas que determinaram a estrutura da comunidade entre os ambientes. A influência do pulso de inundação sobre a comunidade bacteriana foi analisada em amostragens trimestrais (dezembro/2010 a setembro/2011), em doze ambientes da planície de inundação. Constatou-se que o pulso de inundação altera mais significativamente a estrutura da comunidade bacteriana que as diferenças limnológicas entre os rios que compõem a planície. Além disso, ao contrário do que se observa para outras comunidades planctônicas o pulso de inundação reduz a diversidade de bactérias durante o período de águas altas. Essas diferenças observadas quando se analisa grandes grupos bacterianos, sugere que com um maior refinamento taxonômico, os resultados podem fornecer uma maior compreensão sobre como a estrutura da comunidade bacteriana está influenciando a ciclagem de nutrientes nesses ambientes.

**Palavras-chave:** Bacterioplâncton. Diversidade. Planícies De Inundação. Pulso Hidrológico. Hibridização Fluorescente *In Situ*.

## **Bacterial community structure and seasonal dynamics in upper Paraná River floodplain**

### *ABSTRACT*

Differences in bacterial community might be related to many factors such as nutrients contents and interaction with other microorganisms. Differences in how the bacterial community is distributed among sites might impact the nutrient cycle to the ecosystems. The aim of this study was to analyze the distribution of bacterial community in different sites of the Upper Paraná River floodplain about the existence of differences in bacterial community structure among sites and its correlation with dissimilarities of abiotical conditions. And then, investigate how bacterial community structure changes in a hydrological cycle. The samples were performed in 36 sites of Paraná River floodplain, classified as connected and unconnected lakes and channels, distributed among three main rivers that compound this floodplain. Bacterial community structure was analyzed considering bacterial total density and relative abundances of the main domains *Bacteria* and *Archaea*, and subdivisions of the phyla Proteobacteria (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria) and *Cytophaga-Flavobacterium* group; that were estimated by fluorescent *in situ* hybridization. The structure of bacterial community differed according to the river's characteristics in which the ambient are connected to. Differences in chlorophyll-a, total and ammoniacal nitrogen and orthophosphate were the mainly limnological variables that determines de bacterial community structure among the sites. The influence of the flood pulse in the bacterial community was analyzed in every three months samples (from December/2010 to September/2011), in twelve sites in upper Paraná River floodplain. We concluded that the flood pulse changes more significantly the bacterial community structure than the limnological differences among the rivers that compose the floodplain. Furthermore, in despite to what is observed to other planktonic communities the flood pulse decreases bacterial diversity during high water period. These results observed in a study with large bacterial groups suggest that a greater taxonomic refinement, the results could enlighten even more about how bacterial structure is influencing nutrient cycles in floodplain systems.

**Keywords:** Bacterioplankton. Diversity. Floodplain. Hydrological Pulse. Fluorescent *In Situ* Hybridization.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Locais de amostragem da planície de inundação do alto rio Paraná. 1) Lagoa Peroba; 2) Lagoa Ventura; 3) Lagoa do Zé do Paco; 4) Canal do Ipoitã; 5) Lagoa Boca do Ipoitã; 6) Lagoa dos Patos; 7) Lagoa Capivara; 8) Rio Ivinhema; 9) Lagoa do Finado Raimundo; 10) Lagoa do Jacaré; 11) Lagoa Sumida; 12) Lagoa do Cervo; 13) Canal Cortado; 14) Lagoa das Pombas; 15) Canal Curutuba; 16) Ressaco do Manezinho; 17) Lagoa do Osmar; 18) Lagoa da Traíra; 19) Lagoa do Guaraná; 20) Ressaco do Bilé; 21) Ressaco do Leopoldo; 22) Lagoa Genipapo; 23) Lagoa Clara; 24) Ressaco do Pau Véio; 25) Rio Paraná; 26) Lagoa Pousada; 27) Lagoa das Garças; 28) Rio Baía; 29) Lagoa Fechada; 30) Lagoa Pousada das Garças; 31) Lagoa dos Porcos; 32) Lagoa do Aurélio; 33) Baía Canal; 34) Lagoa Maria Luiza; 35) Lagoa do Gavião; 36) Lagoa da Onça.....21
- Figura 2 - Ordenação dos escores para cada estação de amostragem em relação ao eixo 1 e 2 da Análise de Componentes Principais. Em relação aos subsistemas: ●■▲◆(preenchimento em cinza) = Subsistema Ivinhema ●■▲◆ (preenchimento em preto) = Subsistema Baía e ○□△◇ (sem preenchimento)= Subsistema Paraná. E os diferentes tipos de ambientes amostrados ○ = lagoas com conexão direta com o canal principal, □ = Lagoas sem conexão direta com o canal principal e △ = rios e ◇ = canais.....27
- Figura 3 - Variação da abundância relativa dos dois domínios de procariotos, Eubacteria e *Archaea*. (A) entre os componentes do subsistemas e (B) entre os tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná.●Média ⊥Erro Padrão .....29
- Figura 4 - Variação da abundância relativa das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* em relação aos subsistemas (●Média ⊥Erro Padrão). .....31
- Figura 5 - Variação da abundância relativa das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* em relação aos tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (●Média ⊥Erro Padrão).....32
- Figura 6 - Biomassa bacteriana nos rios que compõem a planície de inundação do alto rio Paraná.....32
- Figura 7 - Diagrama de ordenação para os dois primeiros eixos da Análise de Correspondência Canônica (CCA). Ordenações dos escores gerados pelos eixos 1 e 2 em relação: (A) aos grupos bacterianos e (B) às variáveis abióticas; (C) ordenação das correlações dos dados físicos e químicos e (D) estações de amostragens.....34
- Figura 8 - Locais de amostragem na planície de inundação do alto rio Paraná (1)Lagoa Ventura; (2) Canal do Ipoitã; (3) Lagoa dos Patos; (4) Rio Ivinhema; (5) Canal Curutuba; (6) Lagoa do Guaraná; (7) Rio Baía; (8) Lagoa Fechada, (9) Lagoa do Osmar; (10) Ressaco do Pau Véio; (11) Rio Paraná; (12) Lagoa das Garças.....49
- Figura 9 - Medição diária do nível médio da planície de inundação do alto rio Paraná (dados obtidos da Estação de campo da Universidade Estadual de Maringá). As setas indicam os períodos em que as amostragens foram realizadas.....54
- Figura 10 - Ordenação dos escores para cada estação de amostragem em relação ao eixo 1 e 2 da análise de componentes principais. Em relação aos subsistemas: ○□ △◇ (Sem preenchimento)= Subsistema Paraná, ● ■ ▲◆ (preenchimento em preto) = Subsistema Baía,●■▲◆ (preenchimento em cinza)= Subsistema Ivinhema; e aos períodos de amostragem ○ = dezembro/2010, □ = março/2011 △= junho/2011 e ◇ = setembro/2011.....57
- Figura 11 - Densidade da comunidade bacteriana entre os (A) períodos e (B) locais de amostragens. A linha pontilhada demonstra os ambientes com maiores densidades bacterianas (●Média ⊥Erro padrão)..... 59
- Figura 12 - Abundância relativa (A) dos domínios *Archaea* e Bacteria entre os ambientes amostrados e (B) das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* ●Média ⊥Erro padrão.....60
- Figura 13 - Abundância relativa (A) dos domínios *Archaea* e Bacteria entre períodos amostrados e (B) das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. ●Média ⊥Erro padrão.....61

Figura 14 - Análise de agrupamento destendenciada dos grupos bacterianos estudados em relação aos subsistemas: ○□ △◇ (Sem preenchimento)= Subsistema Paraná, ● ■ ▲◆ (preenchimento em preto) = Subsistema Baía, ●■▲◆ (preenchimento em cinza) = Subsistema Ivinhema; e aos períodos de amostragem ○ = dezembro/2010, □ = março/2011 △= junho/2011 e ◇ = setembro/2011.....62

Dissertação elaborada e formatada  
conforme as normas da publicação  
científica Microbial Ecology.

Disponível em:  
<http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/248>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>13</b>
<b>2 ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS NA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ .....</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>17</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	18
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
2.2.1 Área de Estudo .....	20
2.2.2 Amostragem .....	23
2.2.3 Variáveis físicas e químicas.....	24
2.2.4 Comunidade bacteriana .....	24
2.2.5 Análises Estatísticas .....	25
2.3 RESULTADOS.....	27
2.4 DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS .....	39
<b>3 DINÂMICA SAZONAL DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTERIOPLÂNCTON EM AMBIENTES DA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ .....</b>	<b>45</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>45</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>46</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	47
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
3.2.1 Área de Estudo .....	49
3.2.2 Amostragem .....	51
3.2.3 Variáveis físicas e químicas.....	51
3.2.4 Comunidade bacteriana .....	51
3.2.5 Análises Estatísticas .....	53
3.3 RESULTADOS.....	54
3.4 DISCUSSÃO.....	63
REFERÊNCIAS .....	67
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na ecologia, desde Lindemann (17) já se conhecia a importância da comunidade bacteriana na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Nos meados da década, foi introduzido um novo paradigma sobre o papel das bactérias nas teias alimentares microbianas em regiões pelágicas (6, 21). A ecologia de bactérias continuou avançando, e a partir de 1980, com a utilização de novas técnicas moleculares, foi constatado que a produção secundária das bactérias pode superar a produção fitoplanctônica, que sempre foi considerada a principal comunidade produtora (1, 12, 24). Ainda há muito para se conhecer a respeito da comunidade bacteriana em ambientes aquáticos, a utilização de técnicas modernas que permitam a análise de diversidade biológica está colaborando para o aumento do conhecimento sobre essa comunidade.

A densidade da comunidade bacteriana no plâncton varia em torno de  $10^6$  células x mL<sup>-1</sup> (1, 5, 8, 20). As bactérias planctônicas não são igualmente distribuídas nos ambientes aquáticos. Muitas diferenças na comunidade planctônica já foram descritas em estudos anteriores (26). As diferenças das propriedades físicas e químicas dos lagos (18, 23), a relação com outros micro-organismos (15, 19), as concentrações de nutrientes orgânicos e inorgânicos (7), o estado trófico e a quantidade de compostos húmicos (11) podem influenciar a diversidade e distribuição da comunidade bacteriana entre ambientes aquáticos.

A planície de inundação do alto rio Paraná, por exemplo, é composta por lagoas, rios e canais entre outros tipos de ambientes (25). Além disso, é influenciada por três rios diferentes que aumentam ainda mais a heterogeneidade ambiental quando grandes escalas são analisadas (22).

O regime hidrológico a que os sistemas rio-planície de inundação estão sujeitas é o principal fator direcionador da diversidade faunística desses ambientes (14). Muitos estudos já demonstraram como a densidade bacteriana se altera frente ao pulso de inundação (e.g. 5, 8, 16). Mas poucos estudos abordaram a dinâmica sazonal da estrutura da comunidade bacteriana em sistemas de planície de inundação. Isso porque métodos convencionais de estudos dependentes de cultura de organismos são limitados e podem fornecer uma estimativa equívoca da estrutura da comunidade (4, 10).

A hibridização fluorescente *in situ* permite a identificação filogenética de bactérias de assembleias mistas, sem a necessidade de cultivo prévio (4). A hibridização consiste na ligação específica de uma sonda de ácidos nucleicos contendo um marcador

fluorescente a regiões correspondentes de RNAr das células bacterianas (3). Os marcadores fluorescentes podem ser construídos a partir de oligonucleotídeos de RNAr (2), de polinucleotídeos de DNA (9), de RNAtm de plasmídeos ou de RNAm (27). Com isso, as células bacterianas são preservadas e identificadas. As análises podem ser feitas em números absolutos, o que permite converter os dados em biomassa ou em abundância relativa, levando em consideração a densidade total das bactérias (3).

Nesse sentido, será utilizada a metodologia de hibridização fluorescente *in situ* para realizar uma caracterização da distribuição da comunidade bacteriana em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. Analisando quanto à existência de diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os ambientes estudados e como a dissimilaridade das condições ambientais influencia na estrutura da comunidade bacteriana. Posteriormente, será investigada a comunidade de bactérias planctônicas durante um ciclo hidrológico a fim de determinar como o pulso afeta a comunidade bacteriana entre os ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná.

## REFERÊNCIAS

1. Abreu CA, Biddanda BB, Odebrecht C. 1992. Bacterial dynamics of the Patos lagoon estuary, southern Brazil (32° S, 52° W): relationship with phytoplankton production and suspended material. *Estuar. Coas. Shelf Sci.* 35: 621-635.
2. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925
3. Amann R, Glöckner FO, Neef A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microb. Rev.* 20:191-200.
4. Amann RI, Fuchs BM, Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:231-236.
5. Anésio AM, Abreu PC, Esteves FA. 1996. Influence of the Hydrological Cycle on the Bacterioplankton of an Impacted Clear Water Amazonian Lake. *Microb Ecol.* 34:66-73.
6. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA e Thingstad f. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marin. Ecol. Progr. Ser.* 10:257-263
7. Besemer K, Moeseneder MM, Arrieta JM, Herndl GJ, Peduzzi P. 2005. Complexity of bacterial communities in a River-Floodplain System (Danube, Austria). *Appl. Environ. Microb.* 71:2:609-620.

8. Carvalho P, Thomaz SM, Bini LM. 2003. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia*. 510: 67-74.
9. De Long EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM. 1999. Visualization And Enumeration Of Marine Planktonic Archaea And Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microb.* 65:12:5554-5563.
10. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 345:60-63.
11. Haukka K, Heikkinen E, Kairesalo T, Karjalainen H, Sivonen K. 2005. Effect of humic material on bacterial community composition in boreal lakes and mesocosms. *Environ. Microbiol.* 7:5:620-630.
12. Hessen O. 1985. The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in humic oligotrophic lakes. *FEMS Microbiol Ecology*. 31: 215-223.
13. Hobbie JE, Daley RJ, Jaspas S. 1977. Use of nucleopore filters for counting Bacteria by fluorescent microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1225-1228.
14. Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE. 1989. The floodpluse concept in river-floodplain systems. In: Dodge D.P. (Ed) *Proceedings of the International Large River Symposium, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. 106:110-127.
15. Kent AD, Jones SE. 2006. Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. *Environ. Microbiol.* 8:8:1448-1459.
16. Kobayashi T, Ryder DS, Gordon G, Shannon I, Ingleton T, Carpenter M, Jacobs SJ. 2009. Short-term response of nutrients, carbon and planktonic microbial communities to floodplain wetland inundation. *Aquat. Ecol.* 43:843-858.
17. Lindemann RL. 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23: 399-418.
18. Nelson CE. 2009. Phenology of high-elevation pelagic Bacteria: the roles of meteorologic variability, catchment inputs and thermal stratification in structuring communities. *The ISME Journal*. 3:13-30.
19. Newton RJ, Kent AD, Triplett EW, McMahon KD. 2006. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environ. Microbiol.* 8:6:956-970.
20. Pedros-Alió C, Guerreiro R. 1994. Prokaryotology for the limnologist. In: Margalef R. (ed.). *Limnology Now. A paradigm of planetary problems*. Amsterdam: Elsevier. p. 37-57
21. Pomeroy LR. 1974. The Oceans's food web, a changing paradigm. *Americ. Instit. Biol. Sci.* 24:9:499-504

22. Roberto MC, Santana NF, Thomaz SM. 2009. Limnology in the Upper Paraná River floodplain: large-scale spatial and temporal patterns, and the influence of reservoirs. *Braz. Jour. Biol.* 69:2:717-725.
23. Shade A, Kent AD, Jones SE, Newton RJ, Triplett EW, McMahon KD. 2007. Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 52:2:487-494.
24. Simon M, Cho BC, Azam F. 1992. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86:103-110.
25. Thomaz SM, Bini LM, Bozelli RL. 2007. Floods increase similarity among aquatic habitats in river-floodplain systems. *Hydrobiol.* 579:1-13.
26. Yannarell AC, Triplett EW. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2:227-239.
27. Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridization (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiol Letters.* 246:151-158.



## 2 ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS NA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ

### RESUMO

As bactérias apresentam um papel central na ciclagem de nutrientes de ambientes aquáticos. Nesse sentido, é importante analisar como essa comunidade se distribui entre os ambientes e as variações espaciais da comunidade bacteriana em um sistema de planície de inundação para determinar a influência de fatores ambientais na composição dessa comunidade. A distribuição da comunidade bacteriana foi determinada em amostras subsuperficiais de água em 36 ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, que incluem rios, canais, lagoas com e sem conexão direta com o rio. A estrutura da comunidade bacteriana foi analisada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), baseando-se na abundância relativa dos domínios *Bacteria* e *Archaea*; e das subdivisões do filo Proteobacteria: Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria e do grupo que inclui os gêneros *Cytophaga-Flavobacterium*. Por meio de análises de variâncias não paramétricas foi demonstrado que a comunidade bacteriana diferiu significativamente quanto à densidade e abundância relativa dos grupos, respondendo às características distintas dos rios que compõem a planície, bem como aos diferentes tipos de ambientes que são encontrados nesse ecossistema. Conclui-se que as dissimilaridades da comunidade bacteriana encontram-se estreitamente relacionada com heterogeneidade ambiental. Sendo que as variáveis limnológicas que mais influenciam a estrutura da comunidade bacteriana na planície de inundação do alto rio Paraná são nitrogênio total e amoniacal, ortofosfato e clorofila-*a*. Mais estudos com maior refinamento taxonômico poderá esclarecer ainda mais sobre a influência da comunidade bacteriana na ciclagem de nutrientes da planície de inundação.

Palavras Chave: distribuição do bacterioplâncton, planície de inundação, hibridização fluorescente *in situ*.

**ABSTRACT**

The bacterial community presents a central role in nutrient cycle in aquatic habitats. Then, it's important to analyze how this community is distributed among different places. In this study, we aim to analyze the changes in bacterial community in a floodplain system and to determine the influence of environmental variable in bacterial community composition. The bacterial community was investigating in superficial water from 36 different sites in the upper Paraná River floodplain, these sites contain rivers, channels, and floodplain lakes with different connection degree with the main river channel. The bacterial community structure was analyzed by the methodology of fluorescent *in situ* hybridization (FISH), based on relative abundance of the main domains *Bacteria* and *Archaea*, and subdivisions of the phylum Proteobacteria Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria and the *Cytophaga-Flavobacterium* cluster. Using non parametric variance analyzes it has been demonstrated that the bacterial community differed significantly in density and in the relative abundance of the studied groups. And these differences responded to distinct characteristics of the three main rivers that compose the floodplain as well as the different kinds environments found in this floodplain. We conclude that dissimilarities in the bacterial community structure are related to environmental heterogeneity. And the limnological variables most predictable bacterial community in the upper Paraná River floodplain was total and ammoniacal nitrogen, orthophosphate and chlorophyll-a

**Keywords:** bacterioplankton distribution, floodplain, fluorescent in situ hybridization.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As bactérias planctônicas atuam diferentemente na dinâmica de sistemas aquáticos e não são igualmente abundantes e distribuídas entre os ambientes (36). Estudos demonstraram que lagos distintos podem apresentar diferenças significativas na estrutura da comunidade de bacterioplâncton (74). E muitos estudos tentaram elucidar as possíveis causas da variação espacial dessa comunidade (e. g. 42, 43, 73).

As diferenças na composição da comunidade bacteriana podem estar relacionadas às propriedades físicas e químicas dos lagos (50, 60), à composição da comunidade de outros micro-organismos eucarióticos (35, 51), biomassa de algas, nutrientes orgânicos e inorgânicos (9) estado trófico e quantidade de compostos húmicos (31). Além disso, grande parte dos estudos acerca da comunidade de bactérias também afirma que a diversidade está correlacionada a distâncias geográficas (52, 54, 71).

As bactérias podem ser consideradas a base na cadeia alimentar planctônica em vários ecossistemas aquáticos, e apresentam um importante papel no fluxo de carbono para a atmosfera (7, 20). Em ambientes de planície de inundação, por exemplo, as bactérias heterotróficas representam um importante elo entre o carbono proveniente de macrófitas e os níveis superiores da cadeia alimentar (67).

A planície de inundação do alto rio Paraná compreende uma grande variedade de ambientes, incluindo lagoas, rios, canais e outros tipos de ambientes completamente cobertos por vegetação aquática, áreas de transição, ambientes terrestres e zonas ripárias (65) que diferem em suas propriedades físicas e químicas, respondendo à profundidade da água, velocidade de corrente, grau de conectividade e influência dos tributários locais, entre outras forças direcionadoras (65, 66). Essa planície é composta por três rios diferentes que aumentam ainda mais a heterogeneidade ambiental quando grandes escalas são analisadas (57).

Embora já tenha sido relatada a diferença da comunidade bacteriana em duas lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná (40), poucos estudos foram feitos sobre a estrutura da comunidade bacteriana entre outros tipos de ambientes dessa planície, bem como da influência dos diferentes rios nos ambientes e das possíveis causas da variação dessa comunidade.

Estudos sobre a comunidade de bactérias planctônicas em planícies de inundação demonstraram as diferenças na densidade de bacterioplâncton de acordo com

a concentração de nutrientes e natureza do carbono (64), com a origem (autóctone ou alóctone) do carbono das lagoas (16) e de acordo com o período do pulso hidrológico (6, 37, 53). Mas poucos abordaram a estrutura e a diversidade da comunidade bacteriana em planícies de inundação. Isso porque métodos convencionais de estudos dependentes de cultura de organismos são limitados e podem fornecer uma estimativa equívoca da estrutura da comunidade (4, 28).

Métodos convencionais de estudos dependentes de cultura de organismos são limitados para identificar a distribuição espacial da comunidade bacteriana, pois, além de consumir muito tempo, frequentemente identificam apenas uma pequena parte das bactérias presentes na amostra; fornecendo uma estimativa equivocada da estrutura da comunidade (4, 28). Neste sentido, métodos biológicos moleculares têm se desenvolvido e ampliado o conhecimento científico sobre aqueles organismos que não podem ser cultivados.

Dentre essas técnicas, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) permite a identificação filogenética de bactérias de assembleias mistas, sem a necessidade de cultivo prévio (4). A hibridização consiste na ligação específica de uma sonda de ácidos nucléicos contendo um marcador fluorescente a regiões correspondentes de RNAr das células bacterianas (1). Os marcadores fluorescentes podem ser construídos a partir de oligonucleotídeos de RNAr (2), de polinucleotídeos de DNA (25), de RNAm de plasmídeos ou de RNAm (78). Com isso, as células bacterianas são preservadas e identificadas.

Uma das maiores vantagens da metodologia de FISH é que as análises podem ser feitas em números absolutos, o que permite converter os dados em biomassa ou em abundância relativa, levando em consideração a densidade total das bactérias (1). Além disso, além de permitir a identificação dos grupos, fornece dados de abundância relativa diretamente das amostras analisadas.

Uma caracterização da comunidade de bacterioplâncton quanto à abundância relativa dos principais grupos bacterianos foi feita em 36 ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná visando i) verificar se existem diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os ambientes estudados ii) avaliar como a estrutura da comunidade bacteriana difere entre os ambientes da planície de inundação? iii) observar se a dissimilaridade das condições ambientais promove maior dissimilaridade dos grupos bacterianos iv) e identificar qual é o conjunto de variáveis ambientais determina a dissimilaridade da comunidade bacteriana.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em ecossistemas aquáticos da planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 1), onde se localizam ambientes com uma ampla variedade de características físicas e químicas causadas pelas particularidades dos rios que entram na planície; o que leva a uma grande heterogeneidade quando amplas escalas são consideradas (57). A partir disso, foram considerados três subsistemas baseados nas influências causadas pelos três principais rios da planície de inundação do alto rio Paraná. O trecho de estudo está situado abaixo da foz do rio Paranapanema, até a primeira junção do rio Ivinhema com o rio Paraná.

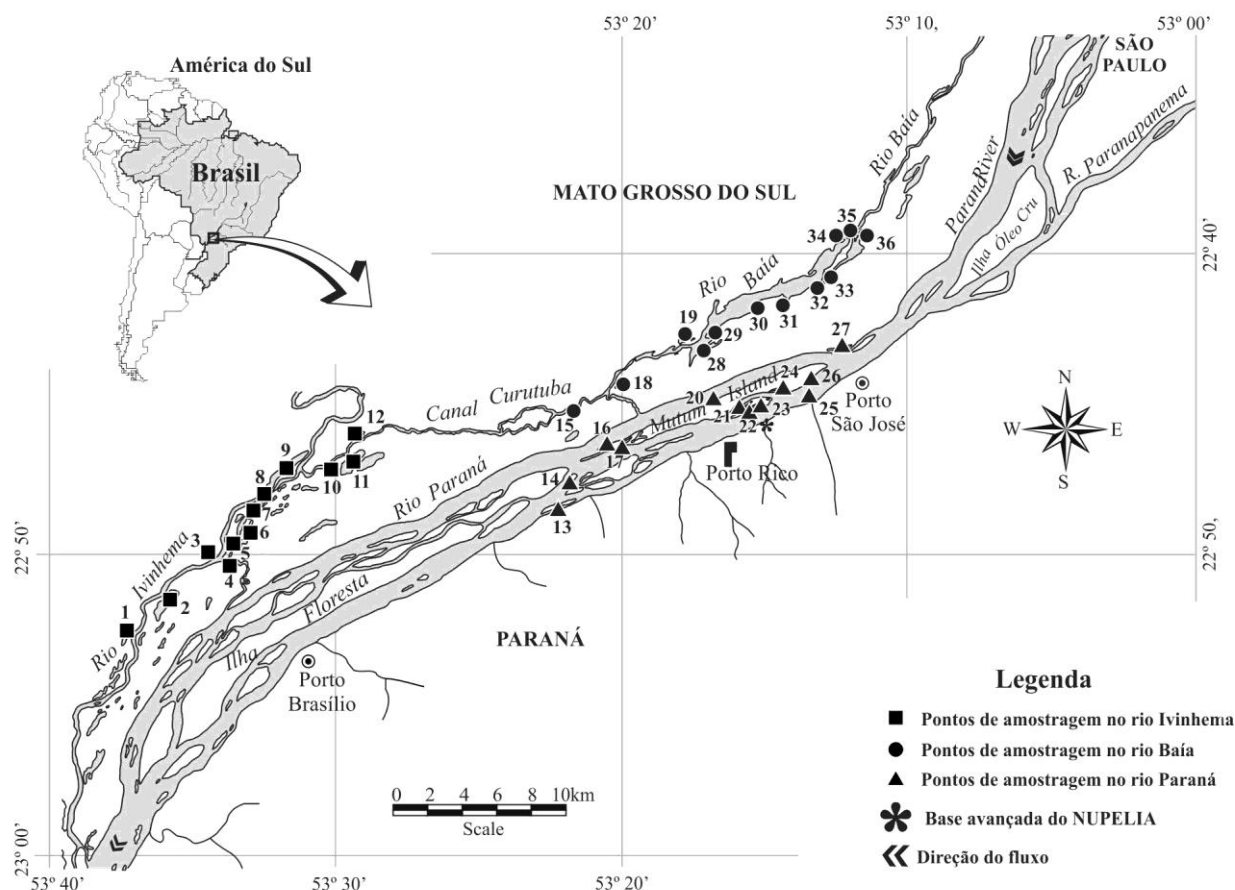


Figura 1 - Locais de amostragem da planície de inundação do alto rio Paraná. 1) Lagoa Peroba; 2) Lagoa Ventura; 3) Lagoa do Zé do Paco; 4) Canal do Ipoitã; 5) Lagoa Boca do Ipoitã; 6) Lagoa dos Patos; 7) Lagoa Capivara; 8) Rio Ivinhema; 9) Lagoa do Finado Raimundo; 10) Lagoa do Jacaré; 11) Lagoa Sumida; 12) Lagoa do Cervo; 13) Canal Cortado; 14) Lagoa das Pombas; 15) Canal Curutuba; 16) Ressaco do Manezinho; 17) Lagoa do Osmar; 18) Lagoa da Traíra; 19) Lagoa do Guaraná; 20) Ressaco do Bilé; 21) Ressaco do Leopoldo; 22) Lagoa Genipapo; 23) Lagoa Clara; 24) Ressaco do Pau Vêio; 25) Rio Paraná; 26) Lagoa Pousada; 27) Lagoa das Garças; 28) Rio Baía; 29) Lagoa Fechada; 30) Lagoa Pousada das Garças; 31) Lagoa dos Porcos; 32) Lagoa do Aurélio; 33) Baía Canal; 34) Lagoa Maria Luiza; 35) Lagoa do Gavião; 36) Lagoa da Onça.

#### 2.2.1.1 Subsistema Paraná

O subsistema Paraná é constituído pelo rio Paraná e pelos ambientes direta ou indiretamente relacionados a ele (por exemplo, lagoas com e sem conexão direta, respectivamente). O rio Paraná compõe a segunda maior bacia hidrográfica da América do Sul, ocupando uma área 20.000 km<sup>2</sup> no período de inundação máxima (11, 69). O rio Paraná possui alta velocidade de fluxo e seu leito é formado principalmente de areia (63). A região marginal do rio apresenta remanescentes da Floresta Estacional Semidecidual e muitos trechos antropizados (61). Entre os ambientes que formam o subsistema Paraná, encontram-se diversas lagoas e ressacos (Tabela 1).

#### 2.2.1.2 Subsistema Baía

O subsistema Baía é constituído pelo rio Baía; localizado à margem direita do

rio Paraná no Estado do Mato Grosso do Sul; por canais secundários e diversas lagoas. O rio Baía apresenta largura variada e profundidade média de 3,2 metros, com trechos marginais de vegetação ripária e de campos inundados (várzea). Pode ser considerado como um ambiente intermediário entre lântico e lótico, destacado por características com padrões de estratificação térmica da coluna de água. No subsistema Baía foram analisadas as lagoas Traíra, Pousada das Garças, Porcos, Aurélio, Maria Luíza, Gavião, Onça, Fechada e do Guaraná; canal Curutuba e Baía e rio Baía propriamente dito (Tabela 1).

#### 2.2.1.3 Subsistema Ivinhema

O rio Ivinhema tem seu baixo curso associado com o braço direito do rio Paraná possuindo canais anastomosados, esses canais são altamente estáveis, do ponto de vista geomórfico (58), e altamente susceptíveis à dinâmica hidrológica dos rios Paraná e do próprio Ivinhema (19). Nesse rio foram analisadas as lagoas Peroba, Boca do Ipoitã, Capivara, Finado Raimundo, Jacaré, Sumida, Cervo, Ventura, Patos e canal Ipoitã, que compõem o subsistema Ivinhema (Tabela 1).

Tabela 1. Características físicas dos ambientes amostrados na planície de inundação do alto rio Paraná\*.

<b>Ambientes</b>	<b>Subsistema</b>	<b>Conexão com o Rio</b>	<b>Área (ha)</b>	<b>Profundidade média (m)</b>
<b>Canal Cortado</b>	Paraná	Canal	**	1,300
<b>Res. do Leopoldo</b>	Paraná	Com conexão	2,950	3,100
<b>Res. Manezinho</b>	Paraná	Com conexão	0,100	2,100
<b>L. Garças</b>	Paraná	Com conexão	14,100	2,000
<b>Res. Bilé</b>	Paraná	Com conexão	**	1,300
<b>L. Pombas</b>	Paraná	Com conexão	**	3,300
<b>Res. Pauvéio</b>	Paraná	Com conexão	3,000	1,800
<b>L. Osmar</b>	Paraná	Sem conexão	0,006	1,100
<b>L. Genipapo</b>	Paraná	Sem conexão	0,060	0,960
<b>L. Clara</b>	Paraná	Sem conexão	0,910	1,200
<b>L. Pousada</b>	Paraná	Sem conexão	12,700	0,390
<b>Canal Ipoitã</b>	Ivinhema	Canal	**	3,200
<b>L. Sumida</b>	Ivinhema	Com conexão	67,400	1,600
<b>L. Boca do Ipoitã</b>	Ivinhema	Com conexão	2,300	3,600
<b>L. Peroba</b>	Ivinhema	Com conexão	12,200	3,100
<b>L. Finado Raimundo</b>	Ivinhema	Com conexão	84,900	3,200
<b>L. Patos</b>	Ivinhema	Com conexão	113,800	3,500
<b>L. Zé do Paco</b>	Ivinhema	Sem conexão	2,700	3,900
<b>L. Capivara</b>	Ivinhema	Sem conexão	7,200	3,600
<b>L. Ventura</b>	Ivinhema	Sem conexão	89,800	2,160
<b>L. Cervo</b>	Ivinhema	Sem conexão	7,810	2,000
<b>L. Jacaré</b>	Ivinhema	Sem conexão	6,960	2,140
<b>Canal Baía</b>	Baía	Canal	**	2,000
<b>Canal Curutuba</b>	Baía	Canal	**	2,700
<b>L. Gavião</b>	Baía	Com conexão	**	2,200
<b>L. Guaraná</b>	Baía	Com conexão	4,200	2,100
<b>L. Porcos</b>	Baía	Com conexão	6,200	2,300
<b>L. Onça</b>	Baía	Com conexão	27,200	2,000
<b>L. Maria Luiza</b>	Baía	Com conexão	14,700	3,300
<b>L. Aurélio</b>	Baía	Sem conexão	0,430	1,950
<b>L. Fechada</b>	Baía	Sem conexão	7,500	2,460
<b>L. Traira</b>	Baía	Sem conexão	0,470	2,100
<b>L. Pousada das Garças</b>	Baía	Sem conexão	3,800	2,300

\* Dados retirados do relatório de pesquisa de longa duração (27)

\*\*Os dados omitidos não constam no relatório.

### 2.2.2 Amostragem

As amostragens foram realizadas em 36 ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, em dezembro/2010, estando vinculadas às coletas do programa de Pesquisa Ecológico de Longa Duração (PELD). Quatro alíquotas foram obtidas da subsuperfície de cada ambiente ( $\pm 0,15$ m de profundidade), sendo três para análise do



componente biótico e uma para análise das variáveis abióticas.

### 2.2.3 Variáveis físicas e químicas

As variações de nível foram obtidas a partir dos dados coletados da régua fluviométrica localizada na Base Avançada de Pesquisa do Nupélia (Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura), no município de Porto Rico – PR.

Durante as amostragens, foram mensuradas *in situ*, a temperatura da água, oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio, pH, e condutividade elétrica através de potenciômetros portáteis (YSI). A transparência da água foi obtida através da profundidade do disco de Secchi e a alcalinidade total estimada através de titulação Gran e calculada, juntamente com as formas de carbono inorgânico (15).

Amostras de água foram obtidas para determinação da concentração de material suspenso (total, orgânico e inorgânico) de acordo com Wetzel e Likens (70) clorofila-*a* de acordo com Golterman, Clymo e Ohnstad (30), nitrogênio total e nitrato foram determinados por espectrofotometria (75) e as concentrações de nitrogênio amoniacal foram determinadas de acordo com Mackereth, Heron e Talling (44). As concentrações de fósforo total e ortofosfato foram determinadas por espectrofotometria de acordo com (30).

### 2.2.4 Comunidade bacteriana

As análises da comunidade bacteriana foram realizadas utilizando o método de hibridização fluorescente *in situ* (4). Três amostras de 9 ml de água foram fixadas com paraformaldeído 20% (concentração final 2%) e concentradas em filtro branco de policarbonato (0,2 µm, 25mm, Whatman). Os filtros foram refrigerados até posterior análise em laboratório. As membranas foram divididas e cada fração recebeu o tratamento com uma sonda marcadora específica para cada um dos grupos bacterianos testados e solução tampão de hibridização (tabela2).

Tabela 2. Composição das soluções tampão de hibridização e de lavagem

	NaCl	Tris-HCl	*EDTA	**SDS	Formamida
<b>Solução de hibridização</b>	0,9 M	20 mM	5mM	0,01%	Variável
<b>Solução de lavagem</b>	Variável	20mM	10mM	0,01%	--

\* Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

\*\*Dodecil Sulfato de Sódio

A hibridização ocorreu por no mínimo oito horas (*overnight*) em estufa escura a uma temperatura de 42 °C. Depois desse período os filtros foram lavados com solução

tampão de lavagem (tabela 2) em estufa escura a 48 °C por 15 minutos. As concentrações de formamida e de NaCl para cada sonda são apresentados na tabela 3. Após a hibridização, os filtros foram corados com 4´6- Diamidino-2Phenilindole (DAPI) por aproximadamente 5 minutos e enxaguados por três vezes com álcool comercial (80%).

As frações de filtros de cada amostra foram colocadas sobre lâminas de vidro e receberam uma mistura 4:1 de Vectashield e solução 7:3 de glicerol:PBS (tampão fosfato salina), cobertos com lamínula e analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX51)

A densidade relativa dos diferentes grupos foram analisados com a utilização de marcadores (sondas) Cy3 em oligonucleotídeos RNAr 16S para a identificação dos dois domínios: *Bacteria* (Eub338R, 5´ – 3GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3´) e *Archaea* (Arc344, 5´ – TCG CGC CTG CTG CIC CCC GT – 3´), das subdivisões do filo Proteobacteria: Alpha-proteobacteria (Alf986, 5´ – 3GG TAA GGT TCT GCG CGT T – 3´), Beta-proteobacteria (Bet42a, 5´ – 3GC CTT CCC ACT TCG TTT – 3´), Gamma-proteobacteria (Gam42a, 5´ – 3GC CTT CCC ACA TCG TTT – 3´), e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* (CF319a, 5´–3TG GTC CGT GTC TCA GTA C–3´). Foi utilizada uma sonda controle para determinar as colorações não específicas, inclusive auto-fluorescência; como proposto por Amann *et al* (5).

Tabela 3. Sequência de sondas de nucleotídeos usadas para a hibridização fluorescente *in situ*

Sondas	Form(%)*	NaCl (mM)**	Referência
EUB338R	30	102	3
Arc344	30	102	56
Alf986	30	102	49
Bet42a	30	102	45
Gam42a	30	102	45
CF319a	35	80	46

\*Concentração de formamida na solução tampão de hibridização

\*\* Concentração de cloreto de sódio na solução tampão de lavagem

Algumas células escolhidas aleatoriamente em cada subsistema foram medidas para cálculo da biomassa. O volume das células bacterianas foi calculado segundo Fry (26), e a conversão para biomassa foi feita considerando  $1\mu\text{m}^3 = 3.5 \times 10^{-13} \text{gC}$  como descrito por Bjorsen (10).

### 2.2.5 Análises Estatísticas

Todas as variáveis abióticas – temperatura (T), oxigênio dissolvido (OD), condutividade (Cond.), Secchi, turbidez (Turb.), matéria orgânica em suspensão total,

inorgânica e orgânica (MST, MSI e MSO, respectivamente), alcalinidade (Alc.), clorofila (Cl-a), nitrogênio total (NT), nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) fósforo total (PT), ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) – com exceção do pH, foram  $\log_{10}(x)$  transformados e sumarizadas em uma análise de componentes principais (PCA), a fim de analisar as diferenças entre os subsistemas no período amostrado. Para determinar quais componentes principais seriam retidos para análise foi utilizada a hipótese de aleatoriedade obtida do modelo de "broken-stick" (33).

A estrutura da comunidade bacteriana foi analisada por meio da densidade total de bactérias (bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ ), e da abundância relativa dos grupos estudados; estimada em porcentagem (%) para determinar a importância de cada grupo em relação à densidade total de bactérias.

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Quando atingidos foram utilizados testes de variância paramétrica (ANOVA), e quando não foram atingidos, foram realizadas análises de variância não paramétricas de Kruska-Wallis para avaliar as diferenças no componente biótico, tanto entre os subsistemas, quanto entre os diferentes tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná; sendo considerados significativos  $p < 0,05$ .

Para as análises de variância dos componentes bióticos foram utilizadas as médias aritméticas das abundâncias relativas observadas nas três amostragens realizadas em cada um dos ambientes, quando os subsistemas e os tipos de ambientes amostrados foram utilizados como réplicas.

O teste de Mantel, que permite criar uma matriz de comparação entre duas matrizes de dissimilaridade (38), foi feito para verificar se a dissimilaridade das condições ambientais promove também a dissimilaridade dos grupos. Foram comparadas duas matrizes de dissimilaridade sendo a distância de Euclidiana usada para as variáveis abióticas e o índice de Morisita-Horn (72) para as abundâncias dos grupos bacterianos.

O melhor subconjunto de variáveis ambientais, de modo que as distâncias euclidianas das variáveis ambientais apresentem o máximo de correlação, com a dissimilaridade da comunidade bacteriana foi obtida pela função Bio-env do software R (18) e permitiu encontrar o conjunto de variáveis ambientais que mais influenciam a estrutura da comunidade bacteriana. Com objetivo de avaliar a distribuição dos grandes grupos de bactérias em função do conjunto das variáveis físicas e químicas da água que

mais influenciam a comunidade bacteriana em cada ambiente foi realizada uma análise de correspondência canônica (CCA).

As análises foram feitas usando os programas Statistica 7.1 (62), PcOrd 5 (47) e software R, pacote Vegan (55).

### 2.3 RESULTADOS

As coletas realizadas em dezembro de 2010 corresponderam ao período de enchente da planície de inundação do alto rio Paraná, em que os níveis hidrométricos são intermediários entre os períodos de águas baixas e águas altas. Nesse período o nível médio do rio Paraná foi de 2,94m ( $\pm 0,22$ m), sendo o nível mínimo 2,20m, enquanto o nível máximo atingido nesse mês 3,40m.

Para a análise de componentes principais foram retidos os dois primeiros eixos pelo critério de *Broken-Stick* explicando 57,48% dos dados (eixo 1= 41,09%; eixo 2= 16,38%). No primeiro eixo as variáveis: MSO ( $r=0,85$ ),  $\text{NO}_3^-$  ( $r=0,83$ ) apresentaram as maiores correlações positivas enquanto clorofila ( $r=-0,70$ ) apresentou correlação negativa. No segundo eixo, alcalinidade ( $r=0,50$ ) apresentou maior correlação positiva e MSI ( $r=-0,72$ ) correlacionou negativamente neste eixo (Figura2).

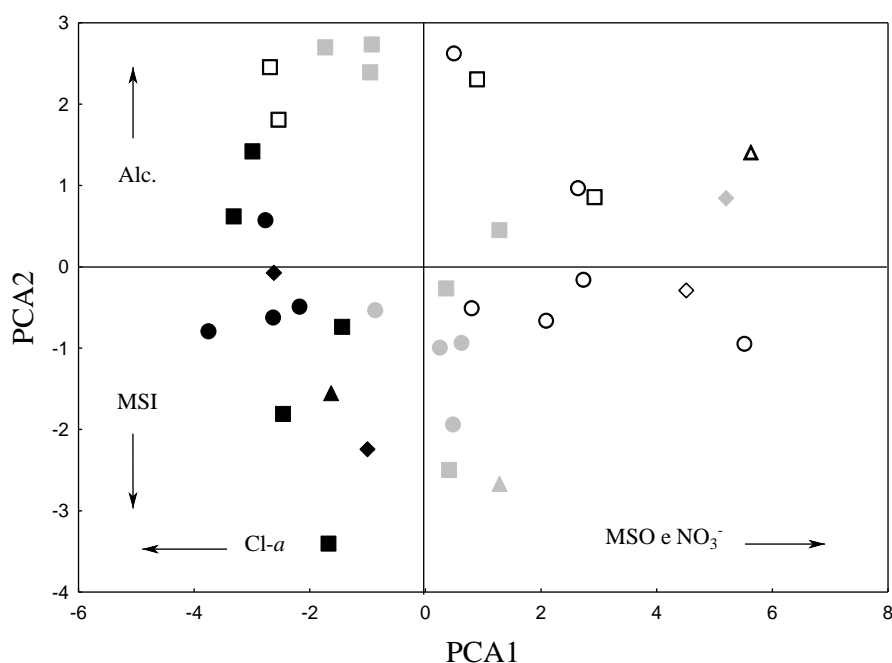


Figura 2 - Ordenação dos escores para cada estação de amostragem em relação ao eixo 1 e 2 da Análise de Componentes Principais. Em relação aos subsistemas: ●■▲◆ (preenchimento em cinza) = Subsistema Ivinhema ●■▲◆ (preenchimento em preto) = Subsistema Baía e ○□△◇ (sem preenchimento) = Subsistema Paraná. E os diferentes tipos de ambientes amostrados ○ = lagoas com conexão direta com o canal principal, □ = Lagoas sem conexão direta com o canal principal e △ = rios e ◇ = canais.

As diferenças limnológicas dos diferentes rios que compõem essa planície permitiram uma separação nítida dos subsistemas na Análise De Componentes Principais, sobretudo dos ambientes relacionados ao rio Baía, (Figura2). Apenas os autovalores do primeiro eixo da PCA apresentaram valores estatisticamente significativos, diferenciando o subsistema Baía dos demais ( $F_{(2;33)}=15,3276$ ;  $p=0,00002$ ). Não foram evidenciadas diferenças significativas entre as lagoas com e sem conexão direta com o canal principal e ambientes lóticos em nenhum dos eixos retidos na PCA.

As diferenças das variáveis limnológicas de acordo com cada subsistema podem ser vista na tabela 4. O subsistema Paraná, apresentou os maiores valores de condutividade, MST, MSI, MSO, alcalinidade e clorofila; e menores valores de nitrogênio e fósforo. O subsistema Baía apresenta as maiores concentrações de nitrogênio total, fósforo total e ortofosfato. O maior valor de turbidez foi encontrado no subsistema Ivinhema.

Tabela 4. Média e desvio padrão (DP) das variáveis abióticas por subsistema

	<b>S. Baía</b>	<b>S. Ivinhema</b>	<b>S. Paraná</b>
<b>Temp. ( °C)</b>	28,42±0,62	28,12±0,80	26,73±0,66
<b>OD (mg/L)</b>	3,38±1,01	4,4±1,64	4,02±1,90
<b>pH</b>	5,78±0,22	6,97±0,43	6,42±0,41
<b>Cond.(uS/cm)</b>	25,75±4,37	41,25±6,82	60,30±13,80
<b>Secchi (m)</b>	0,66±0,15	0,97±0,83	1,55±1,46
<b>Turb (NTU)</b>	19,47±15,71	21,21±19,66	7,60±7,47
<b>MST (µg/L)</b>	0,77±0,49	1,56±1,06	1,98±1,72
<b>MSI (mg/L)</b>	0,57±0,45	1,05±0,85	1,18±1,14
<b>MSO(mg/L)</b>	0,19±0,07	0,51±0,24	0,80±0,63
<b>Alc.(mEq/L)</b>	142,00±24,81	371,08±123,18	454,77±140,53
<b>Clorof.(µg/L)</b>	13,95±11,44	10,23±9,60	15,89±32,49
<b>NT (µg/L)</b>	952,33±177,36	789,12±170,58	808,42±431,80
<b>NO3(µg/L)</b>	18,24±24,69	38,89±38,82	100,28±81,93
<b>NH4 (µg/L)</b>	27,62±24,88	17,86±21,03	40,57±32,49
<b>PT (µg/L)</b>	59,81±19,05	46,10±16,21	49,97±70,74
<b>PO4 (µg/L)</b>	9,05±3,32	7,04±2,96	6,85±1,93
<b>COD (mg/L)</b>	10,87±2,79	*	2,59±2,06

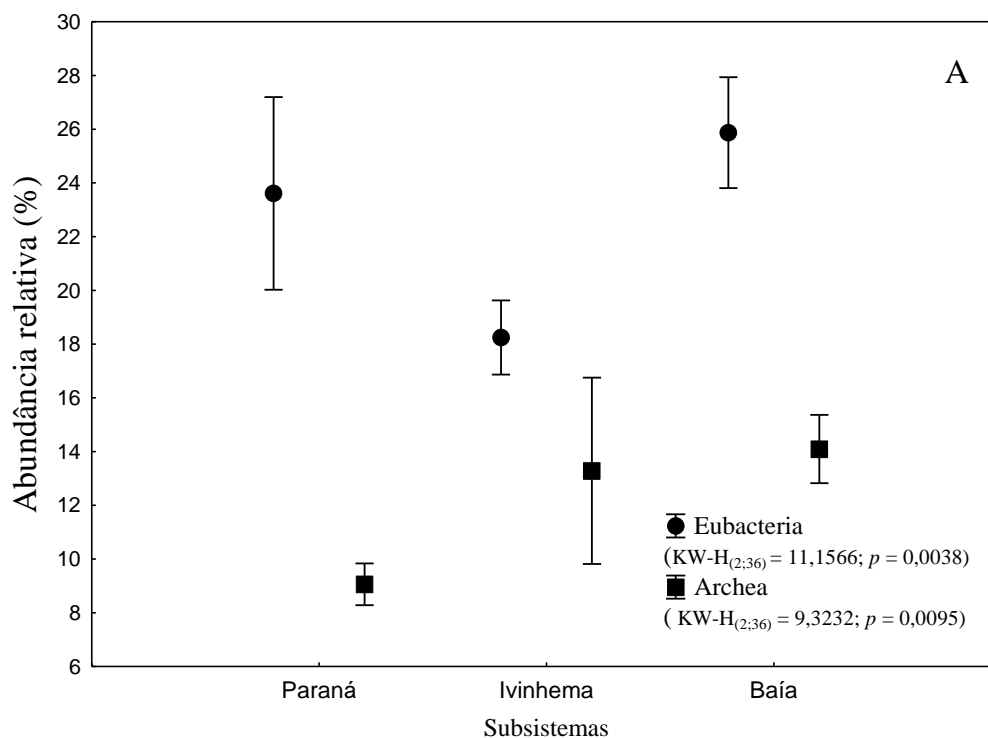
\* Devido a problemas de armazenamento das amostras, as análises de carbono do subsistema Ivinhema não foram realizadas.

A análise de variância não paramétrica demonstrou diferenças significativas entre os subsistemas estudados em relação à densidade de bactérias ( $KW-H_{(2;36)}=6,2748$ ;  $p = 0,0434$ ). O subsistema Baía foi o que demonstrou maior densidade de bactérias,  $7,79 \times 10^6 (\pm 3,03 \times 10^6)$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$  de amostra, seguido do subsistema Ivinhema  $6,45 \times 10^6 (\pm 3,17 \times 10^6)$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ , e a menor densidade de bactérias foi encontrada no subsistema Paraná  $5,15 \times 10^6 (\pm 3,34 \times 10^6)$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ .

A densidade de bactérias não foi diferente quando os diferentes tipos de ambientes presentes na planície de inundação do alto rio Paraná foram analisados (KW- $H_{(3;36)}=2,8069$ ;  $p=0,4224$ ). Os ambientes que apresentaram maiores densidades bacterianas foram as lagoas sem conexão direta com o canal principal ( $7,11 \times 10^6 \pm 4,07 \times 10^6$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ ), lagoas com conexão direta com o canal principal ( $6,68 \times 10^6 \pm 2,83 \times 10^6$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ ), os canais ( $5,21 \times 10^6 \pm 1,54 \times 10^6$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ ) e a menor densidade de bactérias foi encontrada para os rios ( $3,93 \times 10^6 \pm 2,41 \times 10^6$  bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$ ).

A abundância relativa dos dois domínios, *Bacteria* e *Archaea*, foram significativamente diferentes entre os subsistemas, mas apenas a densidade de *Bacteria* diferiu significativamente entre os tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 3A).

Os ambientes do subsistema Paraná apresentaram altas abundâncias relativas de *Bacteria* e baixas abundâncias relativas de *Archaea*, enquanto os do subsistema Ivinhema apresentaram um aumento na abundância relativa de *Archaea* aliado à diminuição da abundância relativa de *Bacteria* em relação ao Paraná (Figura 3A). Já os ambientes do subsistema Baía, por sua vez, apresentaram as maiores abundâncias relativas tanto para *Bacteria* quanto para *Archaea*.



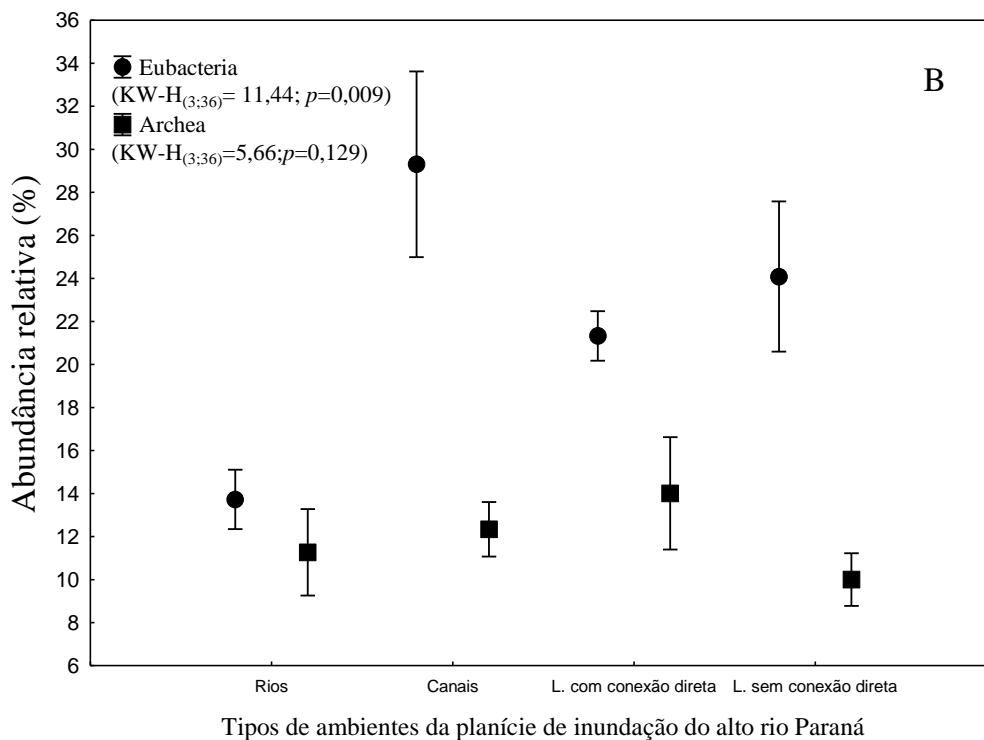


Figura 3 - Variação da abundância relativa dos dois domínios de procariotos, *Bacteria* e *Archaea*. (A) entre os componentes dos subsistemas e (B) entre os tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. ● Média ± Erro Padrão

Em relação aos tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, os canais seguidos das lagoas sem conexão direta, apresentaram as maiores abundâncias relativas do domínio *Bacteria*, enquanto o domínio *Archaea* foi encontrado em menores abundâncias relativas que *Bacteria* em todos os tipos de ambientes.

As divisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* foram significativamente diferentes entre os subsistemas (Figura 4). O subsistema Paraná apresentou maiores abundâncias relativas de Alpha-proteobacteria e Beta-proteobacteria, enquanto a menor abundância relativa foi encontrada para Gamma-proteobacteria. O subsistema Ivinhema apresentou abundâncias relativas muito parecidas para todos os grupos estudados e o subsistema Baía apresentou maiores abundâncias relativas de Beta- e Alpha-proteobacteria, mas ao contrário do que aconteceu no subsistema Paraná, a menor abundância relativa foi de *Cytophaga-Flavobacterium*.

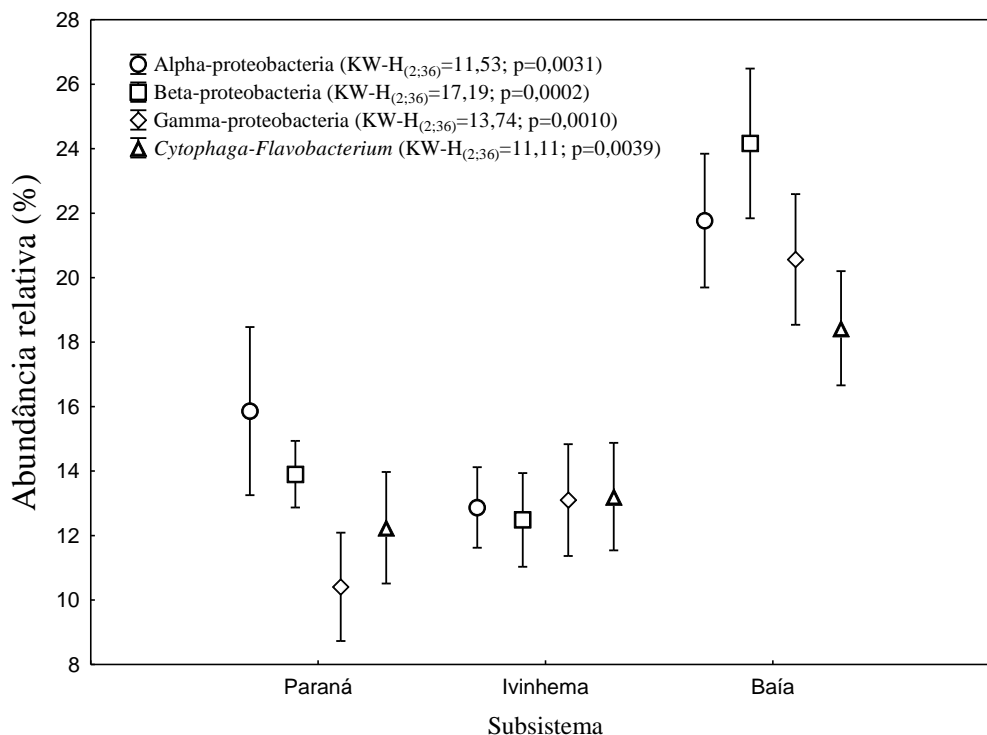


Figura 4 - Variação da abundância relativa das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* em relação aos subsistemas (●Média ⊥Erro Padrão)

Entre os tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, apenas o subgrupo Beta-proteobacteria diferiu significativamente (Figura 5), apresentando a menor abundância relativa nos rios, e estando presente em elevadas abundâncias relativas nos canais e lagoas com e sem conexão com o rio principal. Embora a diferença não seja estatisticamente significativa, a maior abundância relativa de Gamma-proteobacteria foi encontrada nos rios (17%) e a menor em lagoas sem conexão (11%). Nos canais e lagoas com conexão direta as maiores abundâncias relativas foram de Beta-proteobacteria e as menores de *Cytophaga-Flavobacterium*. Nas lagoas sem conexão direta a maior abundância relativa foi de Alpha-proteobacteria.



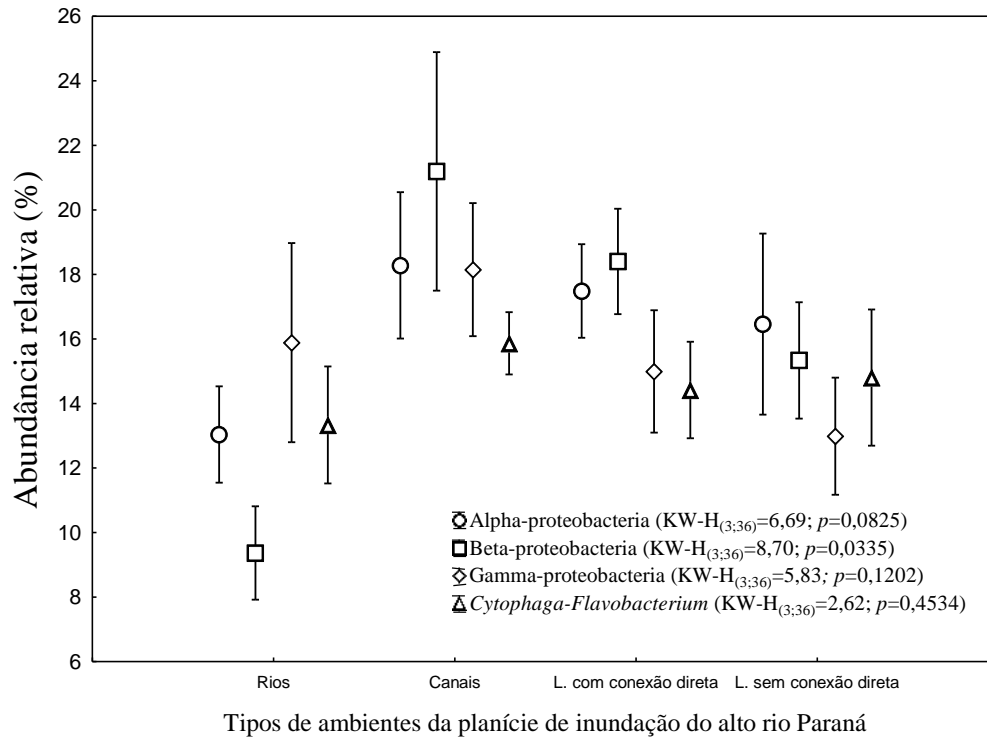


Figura 5 - Variação da abundância relativa das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* em relação aos tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (●Média ± Erro Padrão).

A análise da biomassa foi significativamente diferente entre os rios da planície (KW-H<sub>(2,30)</sub>=9,9744, p=0,0068) sendo menor no rio Paraná e maior no Baía (Figura 6).

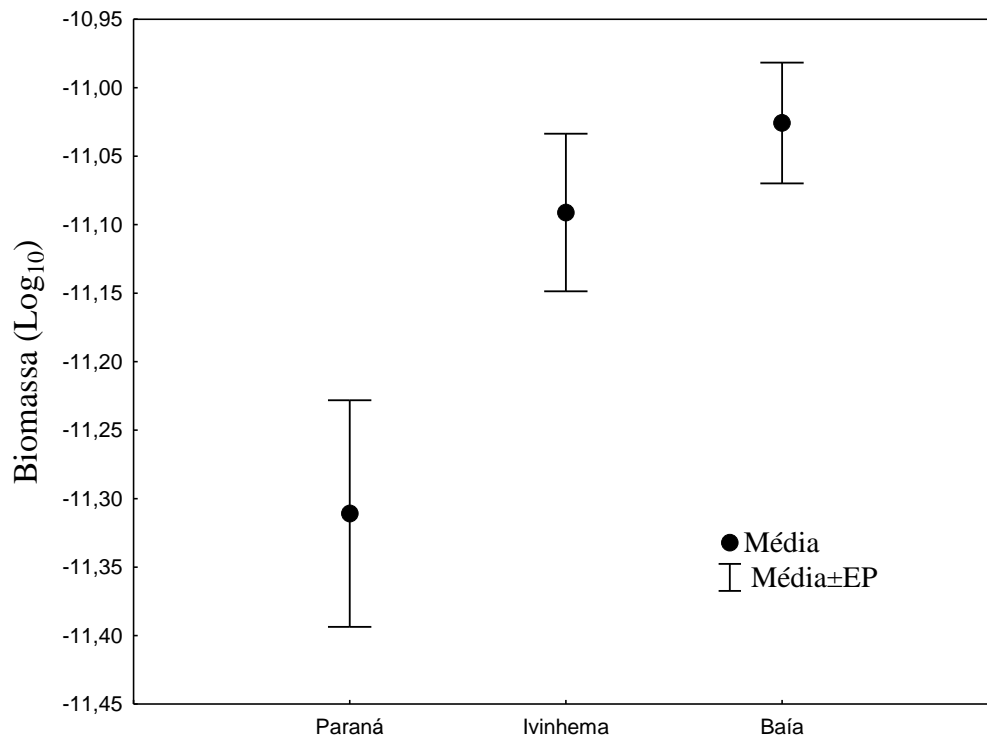


Figura 6 - Biomassa bacteriana nos rios que compõem a planície de inundação do alto rio Paraná.

O teste de Mantel permitiu analisar que a composição da comunidade bacteriana foi significativamente influenciada pelas diferenças nas características físicas e químicas ambientais ( $r=0,1922$ ,  $p=0,018$ ). A análise Bio-env indicou que as variáveis que mais se correlacionam com a diversidade da comunidade bacteriana compreendem quatro parâmetros, sendo eles: clorofila-*a*, NT, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ( $r=0,3542$ ).

A análise de correspondência canônica, correlacionando as variáveis abióticas, indicadas pela análise Bio-env, com diversidade de bactérias, explicou 22,9% dos dados (Tabela 5). As subdivisões Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobactéria e o grupo *Cytophaga-Flavobacterium* foram agrupados positivamente, correlacionando-se com os maiores valores nitrogênio amoniacal. A subdivisão Beta-proteobacteria, por sua vez, foi agrupada negativamente nesse mesmo eixo, correlacionando-se com os maiores valores das variáveis: nitrogênio total, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e clorofila-*a* (Figura7).

Tabela 5. Autovalores, porcentagem de explicação e teste de significância de Monte Carlo para os eixos 1 e 2 da Análise de Correspondência Canônica

	% Exp.	Exp. Acum.	Teste de Monte Carlo			
			Auto Valor	Mín	Max	P
<b>Eixo 1</b>	22,9	22,9	0,016	0,001	0,020	0,006
<b>Eixo 2</b>	5,8	28,7	0,004	0,000	0,008	

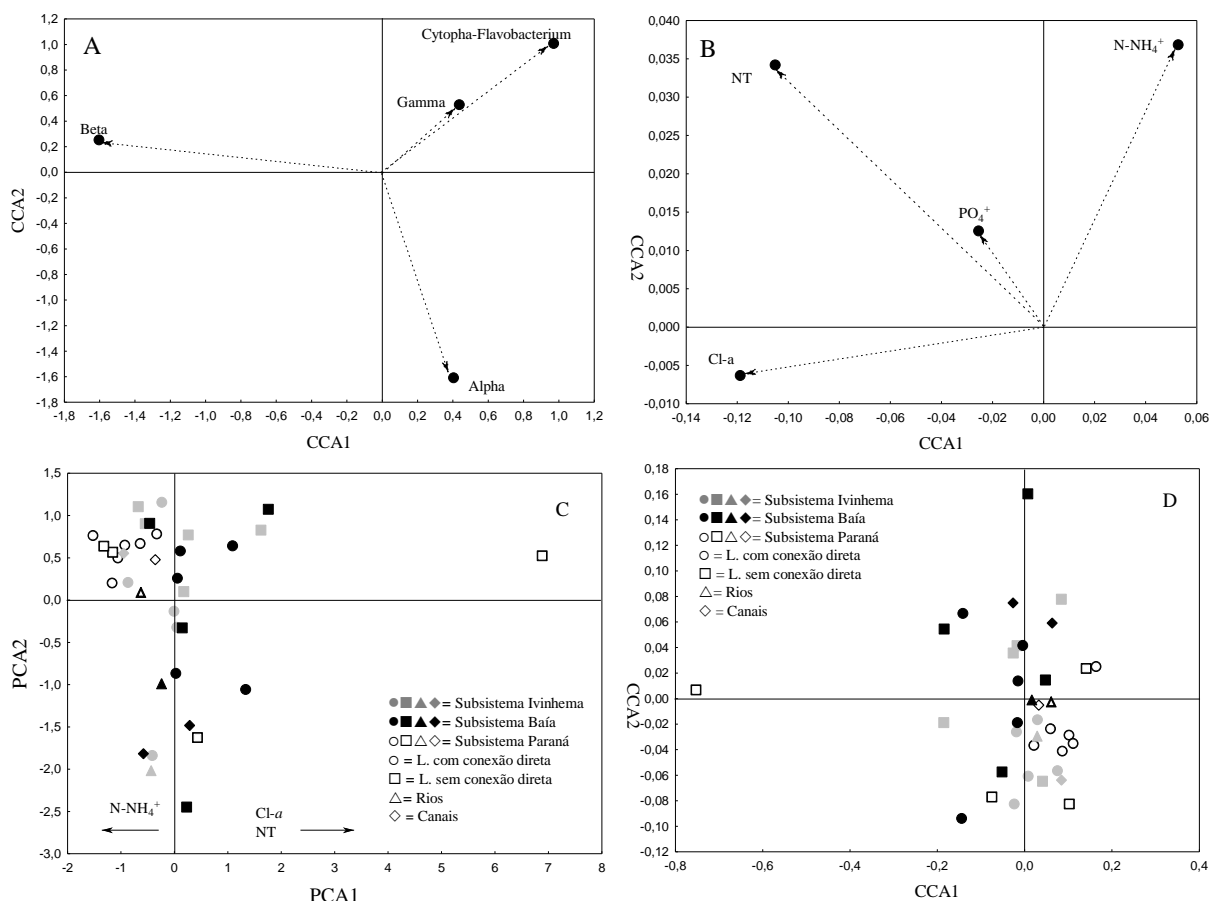


Figura 7. Diagrama de ordenação para os dois primeiros eixos da Análise de Correspondência Canônica (CCA). Ordenações dos escores gerados pelos eixos 1 e 2 em relação: (A) aos grupos Bacterianos e (B) às variáveis abióticas; (C) ordenação das correlações dos dados físicos e químicos e (D) estações de amostragens.

## 2.4 DISCUSSÃO

Na maioria das informações relativas à ecologia das bactérias em ambientes de água doce, o crescimento bacteriano é atribuído a maiores concentrações de nutrientes inorgânicos, principalmente fósforo e nitrogênio (37, 68). A separação dos subsistemas pela PCA permitiu avaliar as características limnológicas distintas dos três rios que compõem a planície de inundação do alto rio Paraná e os ambientes a eles associados. No entanto, a mesma análise não evidenciou distinção das variáveis físicas e químicas entre os tipos de ambientes da planície.

As diferenças limnológicas entre os subsistemas podem ter ocasionado a diferença significativa da densidade e da estrutura da comunidade de bactérias entre os ambientes da planície de inundação. Logo, as maiores concentrações de fósforo e nitrogênio nos ambientes do subsistema Baía, podem ter ocasionado a maior densidade de bactérias observada nesse subsistema.

A redução das concentrações de nutrientes no rio Paraná em decorrência da barragem de Porto Primavera (57) pode ter ocasionado as baixas densidades bacterianas no rio Paraná. Além disso, com as baixas concentrações de nutrientes, os organismos passam a ser menores assim como a disponibilidade de bactérias para a cadeia microbiana, como indicado pelos menores valores de biomassa encontrados nesse rio em comparação com os demais.

O domínio *Archaea* apresenta organismos caracteristicamente encontrados em maiores profundidades, onde há predominância de metabolismo anaeróbico (41). Esse domínio, por sua vez, apresentou a maior abundância relativa no subsistema Baía. Esses organismos são encontrados em baixa frequência em sedimentos de ambientes de água doce (12, 17, 59), representando aproximadamente 1% da comunidade de procariotos nos sedimentos lacustres (59). No entanto, de acordo com Leininger *et al* (39), arqueias do grupo *Crenarchaeota* podem ser os mais abundantes organismos oxidantes de amônia nos solos. A influência da grande área de várzea adjacente aos ambientes do subsistema Baía, carreando matéria orgânica aos corpos hídricos, pode ter acarretado a maior abundância de *Archaea* nestes ambientes.

Ainda assim, há várias controvérsias a respeito do papel das *Archaea*. Esse grupo já foi encontrado em grandes abundâncias relativas também em ambientes oceânicos (34). Talvez uma metodologia diferente da utilizada nesse estudo possa esclarecer melhor os resultados encontrados em relação à abundância relativa de *Archaea* nesse estudo.

Em trabalhos realizados em ecossistemas aquáticos temperados, foi observada uma dominância de eubactérias límnicas acima de 50% (21). As baixas abundâncias relativas do domínio *Bacteria* observadas nesse estudo pode ter ocorrido devido a variações encontradas na detecção de grupos bacterianos pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*, ou variações das condições fisiológicas das células (14). Neste sentido, quando elas se desenvolvem com algum tipo de limitação, o contingente de rRNA é menor, e a hibridização é comprometida.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o fato de que a sonda

Eub338, algumas vezes se mostra insuficiente para estimar todo o domínio *Bacteria*. De acordo com Daims *et al* (24), essa sonda exclui da estimativa os grupos Planctomicetales e Verrucomicrobia, que são constituintes importantes de ambientes aquáticos. Esses autores desenvolveram duas novas sondas EUB338 II e EUB338 III, que se tivessem sido utilizadas juntamente com EUB338 forneceriam uma estimativa mais acurada do domínio *Bacteria* nesse estudo.

Yannarell e Triplett (74) demonstraram que características ambientais, temporais, regionais e em nível de paisagem interagem para determinar a composição das assembleias de bactérias em lagos temperados do hemisfério norte. Nesse estudo, foram encontradas diferenças nas abundâncias relativas das divisões do filo Proteobacteria e do o grupo *Cytophaga-Flavobacterium* entre os subsistemas, mas não entre os tipos de ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. Isso pode sugerir que as características distintas dos rios que percorrem a planície são importantes determinadores da composição da comunidade de bactérias.

Estudos de longa duração atribuíram às cascatas de reservatórios, construídas à montante da planície de inundação do alto rio Paraná, um aumento na transparência da água associada a uma redução nas concentrações de nutrientes (57). Esse impacto antrópico sobre a planície de inundação pode ter influenciado a estrutura da comunidade bacteriana no rio Paraná. A maior abundância relativa de Alpha-proteobacteria e baixa abundância relativa de Gamma-proteobacteria nesse subsistema podem estar relacionadas, principalmente, à baixa disponibilidade de nutrientes observada nesse rio.

A subdivisão Alpha-proteobacteria compreende os gêneros *Beijerinckia* e *Azospirillum*, fixadores de nitrogênio; *Nitrobacter*, nitrificante e *Rhodospirillum*, gênero fotossintético. Algumas bactérias do grupo Alpha-proteobactéria, apresentam crescimento lento e são adaptadas a baixas concentrações de oxigênio (32).

Gamma-proteobacteria é um grupo caracterizado por apresentar organismos de comportamento oportunista, que apresentam maior densidade em locais com grande disponibilidade de nutrientes, principalmente fósforo (13). Fazem parte desse grupo os gêneros *Beggiatoa*, oxidantes de enxofre, presente na interface aeróbia-anaeróbia de sedimentos aquáticos; e bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre dos gêneros *Azotobacter* e *Azomonas*.

O subsistema Baía caracteriza-se pelo seu entorno composto de pastos e campos antropizados (27), que durante o período de águas altas são inundados compondo uma extensa área de várzea. Com a inundação dessa área uma grande quantidade de matéria

orgânica é carregada para os ambientes aquáticos. De acordo com Azevedo *et al.* (8), o carbono orgânico encontrado em maior quantidade no subsistema Baía é de origem alóctone, sendo constituído principalmente de ácidos fúlvicos.

De acordo com Crump *et al.* (22), ocorre uma alteração da comunidade de bactérias planctônicas conforme a natureza do carbono disponível para o crescimento bacteriano. Além disso, nos ambientes do subsistema Baía foram encontrados os maiores valores de nitrogênio e fósforo, que aliada à natureza do carbono orgânico disponível para ser assimilado pelas bactérias, podem ter determinado as maiores abundâncias relativas de proteobactérias e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* nesse subsistema.

Juntamente com a matéria orgânica uma grande quantidade de bactérias pode ser carregada para as lagoas juntamente com a matéria orgânica do entorno, alterando tanto a densidade quanto a diversidade bacteriana (23). Quanto aos organismos do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, esses se relacionam diretamente com a disponibilidade e a degradação de matéria orgânica dissolvida (29, 36), sobretudo de alto peso molecular (36), como é o caso do ácido fúlvico.

O subsistema Baía apresentou também as maiores abundâncias relativas de Beta-proteobacteria. Bactérias desse grupo são comumente encontradas em ambientes de água doce, tendo sido observadas em lagos com diferentes características, oligotróficos (48), eutróficos (76).

O grupo Beta-proteobacteria é composto por gêneros como *Nitrosomonas* (bactérias nitrificantes) e *Spirillum* e é comumente registrado em ambientes de água doce (48, 77). Nesse estudo, além de apresentarem diferenças significativas entre os subsistemas, também foram observadas maior abundância relativa de organismos desse grupo nos canais que nos outros tipos de ambientes.

O subsistema Ivinhema está inserido dentro de uma área de proteção ambiental, o Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema, criado como uma medida de compensação pela construção do reservatório de Porto Primavera. Os ambientes desse subsistema foram observados bem distribuídos entre as subdivisões de Proteobacteria e o grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, talvez por ser provavelmente o mais estável dos três subsistemas e não sofrer com os impactos antrópicos da construção do reservatório a montante, ou das áreas de pastagem em seu entorno.

Entre os tipos de ambientes, foram observadas diferenças significativas apenas na abundância relativa de organismos do grupo Beta-proteobacteria. Embora não tenha

apresentado diferença estatisticamente significativa, a abundância relativa de Gamma-proteobacteria foi maior nos rios do que nas lagoas sem conexão. Provavelmente o fluxo tenha proporcionado uma vantagem competitiva para esse grupo, cujos organismos podem apresentar características oportunistas. Nas lagoas sem conexão direta, a ausência de fluxo pode ter promovido o desenvolvimento da maior abundância relativa foi de Alpha-proteobacteria. Apesar desse grupo não requerer altas concentrações de nutrientes, a característica lântica desses ambientes favoreceu o estabelecimento desse grupo.

Muitos estudos tentam elucidar as variáveis que alteram a estrutura da comunidade de bactérias. A maioria atribui ao carbono orgânico dissolvido as alterações da estrutura da comunidade bacteriana (31, 60), às concentrações de nitrogênio e nitrato (50, 60) e fósforo (13). Neste estudo a estrutura da comunidade bacteriana foi determinada pelas concentrações de clorofila-*a*, NT, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Além disso, a análise de correspondência canônica permitiu analisar quais grupos bacterianos são influenciados por essas variáveis.

As subdivisões Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobactéria e o grupo *Cytophaga-Flavobacterium* são encontrados em ambientes com os maiores valores nitrogênio amoniacal, representados pelos ambientes do subsistema Paraná. Enquanto a subdivisão Beta-proteobacteria é encontrada nos ambientes com os maiores valores das variáveis: nitrogênio total, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e clorofila-*a*, representados pelos ambientes dos subsistemas Baía e Ivinhema.

Esse estudo apresenta dados preliminares sobre as diferenças na estrutura da comunidade bacteriana em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. Foi possível determinar que as diferenças nas variáveis limnológicas dos rios que compõe a planície de inundação são mais importantes para a estrutura da comunidade bacteriana do que as características físicas (grau de conexão com o rio, velocidade de fluxo) dos diferentes tipos de ambientes. Uma vez que dois dos subsistemas analisados estão sujeitos a alterações antrópicas, as diferenças na estrutura da comunidade bacteriana podem estar sendo indiretamente influenciada por esses impactos.

Estudos mais detalhados sobre cada um dos rios que compõem essa planície, bem como a utilização de marcadores bacterianos mais específicos poderão esclarecer o papel funcional das bactérias na ciclagem de nutrientes e energia nesses ambientes. Além disso, outros fatores seletivos estruturantes da comunidade bacteriana devem ser

levados em consideração, como a ocorrência de dominância de alguns grupos sob outros, competição dos grupos na absorção de nutrientes e captação de substrato, predação específica sobre alguns grupos, susceptibilidade a vírus entre outros.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos. Agradecemos ao CNPq e a CAPES pelo financiamento das pesquisas; ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA), ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), pelo apoio no desenvolvimento do trabalho. Ainda, à Maria do Carmo Roberto do Laboratório de Limnologia.

#### REFERÊNCIAS

1. Amann R, Glöckner FO, Neef A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microb. Rev.* 20:191-200.
2. Amann R, Krumholz L, Stahl DA. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacter.* 172:2:762-770.
3. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
4. Amann RI, Fuchs BM, Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:231-236.
5. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews.* Vol. 59, No. 1. p.143-169.
6. Anésio AM, Abreu PC, Esteves FA. 1996. Influence of the Hydrological Cycle on the Bacterioplankton of an Impacted Clear Water Amazonian Lake. *Microb Ecol.* 34:66-73.
7. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA e Thingstad f. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marin. Ecol. Progr. Ser.* 10:257-263
8. Azevedo JC, Teixeira MC, Santos AM, Leandrini JA e Pagioro TA. 2008. Caracterização espectroscópica da matéria orgânica dissolvida da planície de inundação do alto rio Paraná. *Oecol. Bras.* 12:1:66-77.



9. Besemer K, Moeseneder MM, Arrieta JM, Herndl GJ, Peduzzi P. 2005. Complexity of bacterial communities in a River-Floodplain System (Danube, Austria). *Appl. Environ. Microb.* 71:2:609-620.
10. Bjorsen BK. 1936 Automatic Determination of Bacterioplankton Biomass by Image Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:6:1199-1204.
11. Bonneto AA, Wais IR, Castello HP. 1989. The increasing damming of the Parana basin and its effects on the lower reaches. *Reg. Riv. Resear. and Manag.* 4:333-346.
12. Borrel G, Lehours AC, Crouzet O, Jézéquel D, Rockne K, Kulczac A, Duffaud E, Joblin K, Fonty G. 2012. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromitic lake: Vertical shift from methanogenic to uncultured Archaeal lineages. *Plos One.* 7:8:1-14
13. Bouvier T, Del Giorgio PA. 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 47:453-470.
14. Bouvier T, Del Giorgio PA. 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microb. Ecol.* 44:3-15.
15. Carmouze JP. 1995. O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher/ Fapesp. 253 p.
16. Carvalho P, Thomaz SM, Bini LM. 2003. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia.* 510: 67-74.
17. Chan OC, Claus P, Casper P, Ulrich A, Lueders T, Conrad R. 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic Archaeal community in Lake Dagogow sediment. *Environm. Microb.* 7:8:1139-1149
18. Clarke KR, Ainsworth M. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92:205-219.
19. Comunelo, E. 2001. Dinâmica de inundação de áreas sazonalmente alagáveis na planície aluvial do alto rio Paraná. Maringá, 2001. 40f. II. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
20. Cotner JB, Biddanda BA. 2002. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems.* 5: 105-121.
21. Cottrell M e Kirchman DL. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:12:5116-5122.

22. Crump BC, Kling GW, Bahr M, Hobbie JE. 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4:2253-2268.
23. Cuffney TF, Wallace JB. 1988. Particulate Organic Matter Export from Three Headwater Streams: Discrete versus Continuous Measurements. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 2010-2016
24. Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
25. De Long EF, Taylor LT, Marsh TL, Preston CM. 1999. Visualization And Enumeration Of Marine Planktonic Archaea And Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microb.* 65:12:5554-5563.
26. Fry JC. 1990. Direct methods and biomass estimation. *Methods Microbiol.* 22:41-85.
27. Fundação Universidade Estadual De Maringá. Nupélia/Cnpq. Relatório Anual/PELD. 2000. A planície alagável do alto rio Paraná Sitio 6. Descrição dos locais de amostragem.
28. Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 345:60-63.
29. Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R. 1999. Bacterioplankton compositions in lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3721-3726.
30. Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MAM. 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. 2nd ed. London: Blackwell Scientific Publication. 214p.
31. Haukka K, Heikkinen E, Kairesalo T, Karjalainen H, Sivonen K. 2005. Effect of humic material on bacterial community composition in boreal lakes and mesocosms. *Environ. Microbiol.* 7:5:620-630.
32. Imhoff JF. 2006. Chapter 3.1.1. The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg B, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds.) *The Prokaryotes* 3rd Ed. New York, Springer, 5:41-64.
33. Jackson DA. 1993. Stopping rules in principal component analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology.* 74:8:2204-221.
34. Karner MB, deLong EF, Karl DM. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature.* 409:507-510
35. Kent AD, Jones SE. 2006. Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. *Environ. Microb.* 8:8:1448-1459.

36. Kirchman DL. 2002. The ecology of Cytophaga-FlavoBacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39:91-100.
37. Kobayashi T, Ryder DS, Gordon G, Shannon I, Ingleton T, Carpenter M, Jacobs SJ. 2009. Short-term response of nutrients, carbon and planktonic microbial communities to floodplain wetland inundation. *Aquat. Ecol.* 43:843-858.
38. Legendre P, Legendre L. 1998. *Numerical Ecology*. 2nd English Edition. Elsevier.
39. Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature.* 442:17:806-809.
40. Lemke MJ, Lienau EK, Rothe J, Pagioro TA, Rosenfeld J, DeSalle R. 2009. Description of freshwater bacterial assemblages from the upper Paraná river floodpulse system, Brazil. *Microb Ecol.* 57:94-103
41. Lin XJ, Wakeham SG, Putman IF, Astor YM, Scraton MI, Chistoserdov AY, Taylor GT. 2006. Comparison of vertical distributions of prokaryotic assemblages in the anoxic Cariaco Basin and Black Sea by use of fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4:2679-2690.
42. Lindstrom ES. 2000 Bacterioplankton community composition in five lakes differing in trophic status and humic content. *Microb. Ecol.* 40:104-113
43. Lindstrom ES. 2001. Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microb Ecol.* 42:598-605.
44. Mackereth FYH, Heron J, Talling JJ. 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. *Freshw. Biol. Assoc.* 36:1-120.
45. Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593 - 600.
46. Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate Bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiol.* 142: 1097-1106.
47. Mccune B, Mefford MJ. 1999. *Pc-Ord. Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 5.0, MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.
48. Methé BA, Hiorns WD, Zehr JP. 1998. Contrast between marine and freshwater bacterial community composition: Analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43:2:368-374.
49. Neef A. 1997. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis (Technische Universität München).

50. Nelson CE. 2009. Phenology of high-elevation pelagic Bacteria: the roles of meteorologic variability, catchment inputs and thermal stratification in structuring communities. *The ISME Journal*. 3:13-30.
51. Newton RJ, Kent AD, Triplett EW, McMahon KD. 2006. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environ. Microbiol.* 8:6:956-970.
52. Oda Y, Star B, Huisman LA, Gottschal JC, Forney LJ. 2003. Biogeography of the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:9:5186-5191.
53. Palijan G, Fuks D. 2006. Alternation of factors affecting bacterioplankton abundance in the Danube River floodplain (Kopacki Rit, Croatia). *Hydrobiol.* 560:405-415.
54. Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanoBacteria. *Environ. Microbiol.* 5:8:650-659.
55. R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
56. Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240.
57. Roberto MC, Santana NF, Thomaz SM. 2009. Limnology in the Upper Paraná River floodplain: large-scale spatial and temporal patterns, and the influence of reservoirs. *Braz. Jour. Biol.* 69:2:717-725.
58. Rocha PC. 2002. Dinâmica dos Canais no Sistema Rio- Planície Fluvial do Alto Rio Paraná, nas Proximidades de Porto Rico-PR. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 169p. Tese de Doutorado.
59. Schwarz JIK, Eckert W, Conrad R. 2007. Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *System. Appl. Microbiol.* 30:239-254.
60. Shade A, Kent AD, Jones SE, Newton RJ, Triplett EW, McMahon KD. 2007. Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 52:2:487-494.
61. Souza, M. C.; Monteiro, R. Levantamento florístico em remanescente de floresta ripária no alto rio Paraná: Mata do Araldo, Porto Rico, Paraná, Brasil. *Acta Scient. Biol Sci.* 27:4:405-414, 2005.
62. Statsoft Inc. 2005. Statistica (data analysis software system). Version 7.1.
63. Stevaux JC, Takeda AM. 2002. Geomorphological processes related to density and variety of zoobenthic community of the upper Paraná River, Brazil. *Zeist. Geomorph.* 129:143-158.

64. Teixeira MC, Santana NF, Azevedo JCR, Pagioro TA. 2011. Bacterioplankton features and its relations with doc characteristics and other limnological variables in Paraná river floodplain environments (PR/MS-Brazil). *Braz. Journ. Microbiol.* 42:897-908
65. Thomaz SM, Bini LM, Bozelli RL. 2007. Floods increase similarity among aquatic habitats in river-floodplain systems. *Hydrobiol.* 579:1-13.
66. Tockner K, Malard F, Ward JV. 2000. An extension of the flood pulse concept. *Hydrol. Proc.* 14:2861-1883
67. Waichman AV. 1996. Autotrophic carbon sources for heterotrophic bacterioplankton in a floodplain lake of central Amazon. *Hydrobiol.* 341:27-36.
68. Weisse T, Macisaac E. 2000. Significance and fate of bacterial production in oligotrophic lakes in British Columbia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57:95-105.
69. Welcomme RL. 1985. River fisheries. FAO. Technical Paper, Rome: 262-330.
70. Wetzel RG, Likens GE. 1990. *Limnological analyses*. Springer-Verlag: New York, 391pp.
71. Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of Hyperthermophilic Archea. *Sci.* 301:976-978.
72. Wolda H. 1981. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia (Berl).* 50:296-302.
73. Yannarell AC, Triplett EW. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:214-223.
74. Yannarell AC, Triplett EW. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2:227-239.
75. Zagatto EAG, Jacintho AO, Reis BF, Krug FJ, Bergamin H, Pessenda LCR, Mortatti J, Giné MF. 1981. *Manual de análises de plantas empregando sistemas de injeção em fluxo*. Universidade de São Paulo, Piracicaba- SP: 45 pp.
76. Zwart G, Hiorns WD, Methé BA, van Agterveld MP, Huisman R, Nold SC, Zehr JP, Laanbroek HJ. 1998. Nearly Identical 16S Rrna SEQUENCES RECOVERED FROM Lakes in North America Europe Indicath existence of clades of Globally Distributed Freshwater Bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 21:546-556.
77. Zwart G, Crump BC, Van Agterveld MP, Hagen F, Han SK. 2002. Typical freshwater Bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28:141-155.
78. Zwirgmaier K. Fluorescence in situ hybridization (FISH) – the next generation. *FEMS Microbiol Letters.* 246:151-158.

### **3 DINÂMICA SAZONAL DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE BACTERIOPLÂNCTON EM AMBIENTES DA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ**

#### **RESUMO**

Conhecer a comunidade bacteriana, bem como ela se altera frente aos pulsos de inundação, é crucial para o entendimento da ciclagem de nutrientes em ecossistemas de planícies de inundação. Foi analisada a comunidade bacteriana em doze ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, e descrever o comportamento dessa comunidade durante um ciclo hidrológico. Para entender como o regime de águas altas e baixas altera a comunidade bacteriana por meio da alteração das variáveis abióticas. A comunidade bacteriana foi determinada em amostras subsuperficiais de água em rios, canais e lagoas com e sem conexão direta com os rios. As amostragens foram realizadas trimestralmente no período de dezembro/2010 a setembro/2011. A estrutura da comunidade foi analisada pela metodologia de hibridização fluorescente *in situ*, considerando a densidade total de bactérias e as abundâncias relativas de *Bacteria* e *Archaea*, Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria e *Cytophaga-Flavobacter*. Nos períodos de vazante e águas baixas foram observadas as menores densidades, com a mínima sendo registrada em setembro/2011,  $1,69 \times 10^6$  ( $\pm 1,83 \times 10^6$ ) bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$  e as maiores densidades de bactérias observadas atingiram  $5,7 \times 10^6$  ( $\pm 1,88 \times 10^6$ ) bactérias  $\times \text{mL}^{-1}$  em março/2011. O período de águas altas provocou uma diminuição da diversidade de bactérias devido à diminuição da equitabilidade. Os maiores valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener foram observados nos períodos de dezembro/2010 e setembro/2011. O carreamento de nutrientes para os ambientes aquáticos durante o período de águas altas promoveu o aumentando a densidade total desses organismos. A comunidade bacteriana pode apresentar diferenças tanto espaciais quanto temporais, mas quando o componente tempo é considerado, esse é o principal preditor da estrutura da comunidade bacteriana, além de influenciar na sua diversidade.

Palavras-chave: diversidade bacteriana, pulso de inundação, hibridização fluorescente *in situ*.

**ABSTRACT**

Knowing bacterial community, as well as understand how it changes during a hydrological pulse, is very important to understand nutrient cycles in floodplain systems. The aim of this work was to analyze bacterial community in twelve sites of Upper Paraná River floodplain, and describe its changes during a flood pulse. In order to understand how the high water and low water phases changes bacterial community by changing abiotic variables. The bacterial community distribution was determined in superficial water samples from rivers, channels and floodplain lakes with and without connection to the main channel river. The samples were performed every three months since December/2010 to September/2011. The bacterial structure community was analyzed by fluorescent *in situ* hybridization, considering the main domains *Bacteria* and *Archaea* and the subdivisions of the phylum Proteobacteria, Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria, Gamma-proteobacteria and the Cytophaga-Flavobacterium cluster. On ebb and low water periods the smaller densities were observed, with the minimum registered in September/2011,  $1,69 \times 10^6 (\pm 1,83 \times 10^6)$  *Bacteria* x mL<sup>-1</sup> and the highest densities reached  $5,7 \times 10^6 (\pm 1,88 \times 10^6)$  *Bacteria* x mL<sup>-1</sup> on March/2011. The high water period caused a decrease in diversity because of the loss of equitability. The highest values of Shannon-Wiener index were found on December/2010 and September/2011. The nutrients runoff to the aquatic environments of the floodplain promoted an increase in total bacterial density during the high water phase. The bacterial community presented both spatial and temporal differences. But the temporal changes in this community are the most important to determine the bacterial community and also changes its diversity.

Key words: bacterial diversity, flood pulse, fluorescent *in situ* hybridization.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Planícies de inundação são definidas como áreas periodicamente inundadas pelo transbordamento lateral de rios e lagos devido à ação das chuvas ou do lençol freático (27). A planície de inundação do alto rio Paraná compreende uma grande variedade de ambientes, incluindo lagoas, rios e canais (52). Além disso, Roberto, Santana e Thomaz (45) mostraram que a separação dos ambientes nessa planície, ocorre de acordo com a sua posição, e está relacionada com o canal do rio principal, de forma que as particularidades de cada rio que compõe a planície de inundação aumentam a heterogeneidade dos ambientes.

O regime hidrológico a que os sistemas rio-planície de inundação estão sujeitas é o principal fator direcionador da diversidade faunística desses ambientes (27). De acordo com Thomaz, Bini e Bozelli (52), o período de águas altas tende a conectar os corpos de água com características diferentes, promovendo maior similaridade das comunidades biológicas, enquanto durante o período de águas baixas, essas seguem as características locais intrínsecas de cada um dos ambientes.

Os pulsos periódicos de inundação promovem trocas laterais de nutrientes e matéria orgânica entre a planície e os ambientes aquáticos (19, 27). Assim, as alterações físicas e químicas dos ambientes aquáticos resultantes desse processo provocam alterações na diversidade de várias comunidades (27).

Algumas comunidades planctônicas, por exemplo, tendem a apresentar variações na sua composição e abundância entre períodos de águas altas e baixas, bem como apresentar maior similaridade em ambientes com conexão direta ao canal principal, como demonstrado em estudos anteriores para a comunidade zooplanctônica (e.g. 31) e fitoplanctônica (11).

Embora já tenha sido registrado um considerável número de *taxa* de várias comunidades biológicas na planície de inundação do alto rio Paraná (e.g. 31, 53, 54), ainda muito pouco é conhecido sobre a diversidade da comunidade bacteriana e qual a influência do pulso de inundação sobre essa comunidade.

As bactérias participam como base na cadeia alimentar planctônica em vários ecossistemas aquáticos, e desempenham papel considerável no fluxo de carbono para a atmosfera (16). O bacterioplâncton é capaz de incorporar a matéria orgânica dissolvida e nutrientes à sua biomassa e transferi-los para os níveis tróficos superiores através da alça microbiana (7, 43).



As bactérias planctônicas metabolizam não somente os detritos de organismos maiores mortos, mas também os exsudatos fitoplanctônicos (7, 21). Além disso, a planície de inundação exporta matéria orgânica para os ambientes aquáticos (8), que podem ser assimilados pelas bactérias. De acordo com Crump *et al* (18) a comunidade bacteriana se altera de acordo com a origem da matéria orgânica disponível. Isso acontece porque diferentes populações bacterianas são responsáveis pela degradação de diferentes tipos de matéria orgânica. O conhecimento sobre a composição das comunidades bacterianas e seus impactos sobre a ciclagem de carbono é crucial para o entendimento dos processos ecológicos em sistema de planícies de inundação (9).

A maioria dos estudos da dinâmica de bactérias em planícies de inundação tropicais sugere uma forte influência sazonal do pulso de inundação sobre a densidade de bactérias planctônicas (14, 30). Isso porque, durante o período de águas altas, a inundação da várzea carrega uma grande quantidade de matéria orgânica para os ambientes aquáticos (27) que influencia a densidade bacteriana (14, 30). Além disso, uma grande quantidade de bactérias pode ser carregada para as lagoas juntamente com a entrada de matéria orgânica do entorno, alterando tanto a densidade quanto a diversidade bacteriana (19).

Na planície de inundação do alto rio Paraná, foi constatado que a densidade bacteriana é influenciada principalmente pelo enriquecimento das lagoas com nutrientes alóctones, sendo este mais significativo que a matéria orgânica autóctone e a predação por rotíferos para determinação da densidade bacteriana (14). Além disso, Lemke *et al.* (33) demonstraram que há diferenças na composição do bacterioplâncton entre diferentes ambientes dessa planície. Entretanto, poucos estudos foram realizados acerca da estrutura da comunidade bacteriana, ou como ela se altera frente a pulsos de inundação.

Um estudo *in situ* dos fatores que podem regular não apenas a densidade total da comunidade bacteriana e sua dinâmica em um período hidrológico, mas também, a abundância relativa de determinados grupos dessa comunidade, pode levar a um maior entendimento da contribuição dessa comunidade para o ecossistema.

O foco principal é a análise de como o pulso de inundação afeta a comunidade bacteriana entre os ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná e procura avaliar se existem diferenças na diversidade bacteriana entre os períodos de águas altas e águas baixas. Para isto, testaram-se as hipóteses de que o pulso de inundação altera indiretamente a densidade de bacterioplâncton, pois o grande contingente de água que

entra na planície durante o período de águas altas carrega nutrientes para os ambientes aquáticos; e se as diferenças nas variáveis limnológicas abióticas geradas durante os períodos de águas altas e baixas serão as principais determinantes da estrutura da comunidade bacteriana.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado na planície de inundação do alto rio Paraná (Figura 8), influenciada por três rios distintos sendo eles o Paraná, o Ivinhema e o Baía, que proporcionam uma grande heterogeneidade de *habitat* quando considerado amplas escalas nesse ecossistema (45). Foram considerados três subsistemas baseados nas influencias causadas pelos três principais rios da planície de inundação do alto rio Paraná.

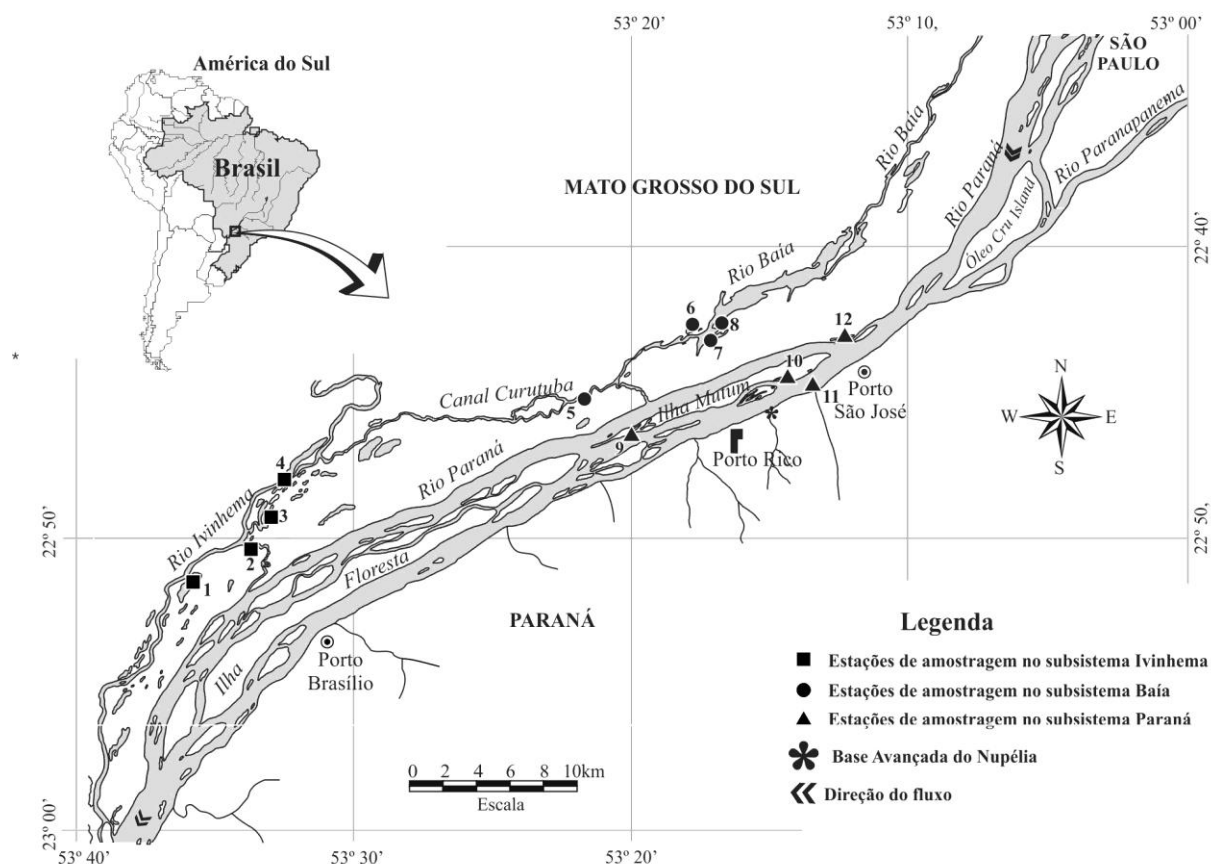


Figura 8 - Locais de amostragem na planície de inundação do alto rio Paraná (1) Lagoa Ventura; (2) Canal do Ipoitã; (3) Lagoa dos Patos; (4) Rio Ivinhema; (5) Canal Curutuba; (6) Lagoa do Guaraná; (7) Rio Baía; (8) Lagoa Fechada, (9) Lagoa do Osmar; (10) Ressaco do Pau Véio; (11) Rio Paraná; (12) Lagoa das Garças.

### 3.2.1.1 Subsistema Paraná

O rio Paraná é a segunda maior bacia hidrográfica da América do Sul, ocupando uma área 20.000 km<sup>2</sup> no período de inundação máxima (10, 57). A região marginal do rio apresenta remanescentes da Floresta Estacional Semidecidual e muitos trechos antropizados (49).

Entre os ambientes que formam o subsistema Paraná, encontram-se diversas lagoas e ressacos. A lagoa do Osmar é uma lagoa temporária e sem comunicação, com profundidade média de 1,1m e área de aproximadamente 0,006ha. A lagoa das Garças possui conexão direta com a calha do rio através de um canal, profundidade média de 2,0m e área de 14,1ha; suas margens contêm grandes quantidades de macrófitas aquáticas. O Ressaco do Pau Véio se localiza na margem direita do Rio Paraná, apresenta comprimento de aproximadamente 1.146m, uma área de 3ha, e profundidade média de 1,8m (22).

### 3.2.1.2 Subsistema Baía

O subsistema Baía é constituído pelo rio Baía; localizado à margem direita do rio Paraná no Estado do Mato Grosso do Sul; por canais secundários e diversas lagoas. O rio Baía apresenta largura variada e profundidade média de 3,2 metros, com trechos marginais de vegetação ripária e de campos inundados (várzea). Pode ser considerado como um ambiente intermediário entre lântico e lótico, destacado por características com padrões de estratificação térmica da coluna de água. No subsistema Baía encontram-se as lagoas Fechada e do Guaraná e canal Curutuba.

A Lagoa Fechada é uma lagoa de forma alongada, com profundidade média de 2,46m, área de 7,5ha. Não apresenta conexão direta com o rio Baía, exceto nos períodos de cheia quando pode apresentar conexão na sua porção superior. A lagoa do Guaraná, por sua vez, é conectada ao rio por um curto canal com grande quantidade de macrófitas aquáticas. A lagoa possui forma arredondada com aproximadamente 4,2 ha de área numa profundidade média de 2,1m. O Canal Curutuba liga o rio Baía ao rio Ivinhema apresentando profundidade média de 2,7m (22).

### 3.2.1.3 Subsistema Ivinhema

O rio Ivinhema tem seu baixo curso associado com o braço direito do rio Paraná possuindo canais anastomosados, esses canais são altamente estáveis, do ponto de vista geomórfico (46), e altamente susceptíveis à dinâmica hidrológica dos rios Paraná e do próprio Ivinhema (15).

A lagoa Ventura é uma lagoa alongada com profundidade média de 2,16m, e área

de 89,8ha; está situada a uma distância de 200m do rio Ivinhema, sendo separada por dique marginal de 3m de altura. A lagoa Patos se situa à margem esquerda do mesmo rio, com o qual se comunica através de um canal com uma grande diversidade de macrófitas aquáticas, e dique marginal de 0,5m de altura; apresenta uma área de aproximadamente 113,8 ha. O Canal Ipoitã é um canal sinuoso que liga o rio Paraná ao rio Ivinhema apresentando uma profundidade média de 3,2m (22).

### 3.2.2 Amostragem

As amostragens foram realizadas trimestralmente, vinculadas às coletas do programa de Pesquisa Ecológico de Longa Duração (PELD), no período de dezembro de 2010 a setembro de 2011. Foram realizadas quatro coletas aleatórias em subsuperfície no centro de cada ambiente, sendo três para análise da comunidade bacteriana e uma para análise limnológica.

### 3.2.3 Variáveis físicas e químicas

As variações de nível foram obtidas a partir dos dados coletados da régua fluviométrica localizada na Base Avançada de Pesquisa do Nupélia, no município de Porto Rico – PR.

Foram mensuradas *in situ*, a temperatura da água (Temp), oxigênio dissolvido (OD), pH e condutividade elétrica (Cond.) através de potenciômetros portáteis (YSI). A transparência da água (Transp.) foi obtida através da profundidade do disco de Secchi e a alcalinidade total (Alc.) estimada através de titulação Gran e calculada, juntamente com as formas de carbono inorgânico (13).

As amostras de água feitas para análise limnológica foram utilizadas para a determinação das concentrações de material suspenso total (MST), orgânico (MSO) e inorgânico (MSI). Clorofila-a (Cl-a) foi analisada por extração com acetona de acordo com Golterman, Clymo e Ohnstad (24). Nitrogênio total (NT) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) foram determinados por espectrofotometria (58) e as concentrações de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) foram determinadas de acordo com Mackereth *et al* (34). As concentrações de fósforo total (PT) e ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) foram determinadas por espectrofotometria de acordo com (24)

### 3.2.4 Comunidade bacteriana

A comunidade bacteriana foi determinada pelo método hibridização *in situ* fluorescente (5). As amostras para análise de componente biológico foram fixadas imediatamente com paraformaldeído 20% (concentração final 2%), armazenadas em

refrigeração por 24h; e concentradas em filtro branco de policarbonato (0,2 µm, 25mm, Whatman). Os filtros foram armazenados a 4 °C até posterior análise em laboratório. A hibridização foi realizada com uma sonda específica para cada um dos grupos testados e solução tampão de hibridização (tabela 6). As amostras foram incubadas *overnight* a 42 °C e depois desse período foram lavadas em solução tampão de lavagem (tabela 1) em estufa escura a 48 °C por 15 minutos. As concentrações de formamida e de NaCl são apresentados na tabela 7.

Tabela 6. Composição das soluções tampão de hibridização e de lavagem

	NaCl	Tris-HCl	*EDTA	**SDS	Formamida
<b>Solução de hibridização</b>	0,9 M	20 mM	5mM	0,01%	Variável
<b>Solução de lavagem</b>	Variável	20mM	10mM	0,01%	--

\* Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

\*\*Dodecil Sulfato de Sódio

A densidade relativa dos diferentes grupos foram analisados com a utilização de marcadores Cy3 em oligonucleotídeos RNAr 16S para a identificação dos grandes grupos, sendo estes: *Bacteria* (Eub338R, 5' – 3GCT GCC TCC CGT AGG AGT – 3'), Alfa-proteobacteria (Alf986, 5' – 3GG TAA GGT TCT GCG CGT T – 3'), Beta-proteobacteria (Bet42a, 5' – 3GC CTT CCC ACT TCG TTT – 3'), Gama-proteobacteria (Gam42a, 5' – 3GC CTT CCC ACA TCG TTT – 3'), *Cytophaga-Flavobacter* (CF319a, 5'–3TG GTC CGT GTC TCA GTA C–3'). Foram utilizadas sondas controle para determinar as colorações não específicas, inclusive auto-fluorescência; como proposto por Amann, Ludwig e Schleifer (4).

As amostras foram simultaneamente coradas com solução de 4'6- Diamidino-2Phenilindole (DAPI) para contagem da densidade bacteriana total. Dez campos aleatórios foram analisados em cada filtro com auxílio do microscópio de epifluorescência (Olympus BX51). Posteriormente, foram colocadas sobre lâminas de vidro e receberam uma mistura (4:1) de Vectashield e solução de glicerol: tampão fosfato salina (7:3) e cobertos com lamínula e levados para análise em microscópio de epifluorescência (Olympus, BX51).

Tabela 7. Sequência de sondas de nucleotídeos usadas para a hibridização fluorescente *in situ*

Sondas	Form(%) <sup>*</sup>	NaCl (mM) <sup>**</sup>	Referência
EUB338R	30	102	3
Arc344	30	102	44
Alf986	30	102	40
Bet42a	30	102	36
Gam42a	30	102	36
CF319a	35	80	37

\* Concentração de formamida na solução tampão de hibridização

\*\* Concentração de cloreto de sódio na solução tampão de lavagem

### 3.2.5 Análises Estatísticas

Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Uma vez que não foram atingidos, foram realizadas análises de variância não paramétricas de Kruska-Wallis para avaliar as diferenças nas variáveis limnológicas, tanto espacial quanto sazonalmente. Os valores das variáveis limnológicas foram demonstrados na forma de média±DP. Os dados foram  $\log_{10}(x)$  transformados (com exceção do pH) e foram sumarizadas em uma Análise de Componentes Principais (PCA).

A densidade total de bactérias foi demonstrada em bactérias x mL<sup>-1</sup> de amostra. A abundância relativa dos grupos estudados foi estimada em porcentagem (%) para determinar a importância de cada grupo em relação à densidade total de bactérias. As diferenças da densidade bacteriana e das abundâncias relativas dos grupos estudados, em relação aos ambientes e aos períodos de amostragem foram analisadas também através de análise não paramétrica, por não atingirem os pressupostos de normalidade e homocedasticidade.

Para avaliar a diversidade dos grupos bacterianos entre os períodos de amostragem foi utilizado o índice de diversidade de Shannon-Weaver, que considera peso igual para as espécies raras e abundantes (35). A riqueza foi estimada pelas diferenças nas abundâncias relativas e o número de táxons foi limitado ao número de sondas utilizadas. Como os grupos estudados não são espécies, a análise de diversidade considerou as subdivisões de Proteobacteria, o grupo *Cytophaga-Flavobacter* e apenas o domínio *Archaea*. O domínio *Bacteria* foi desconsiderado por compreender as demais subdivisões.

Para sumarizar a composição da comunidade de bactérias foi utilizada uma Análise de Correspondência Destendenciada (DCA – 23, 26). Essa análise foi realizada a partir dos dados de abundância relativa dos grupos bacterianos investigados nos diferentes locais e períodos de amostragem.

A influência das variáveis abióticas nas abundâncias relativas dos grupos de

bactérias foi analisada pelo coeficiente de correlação de Pearson. As análises foram feitas usando os programas Statistica 7.1 (50), PcOrd 5 (38).

### 3.3 RESULTADOS

O rio Paraná apresentou período de águas altas em março/2011 (Figura 9), com profundidade média superior a 6 metros; e águas baixas em setembro/2011, quando atingiu profundidade inferior a 2 metros.

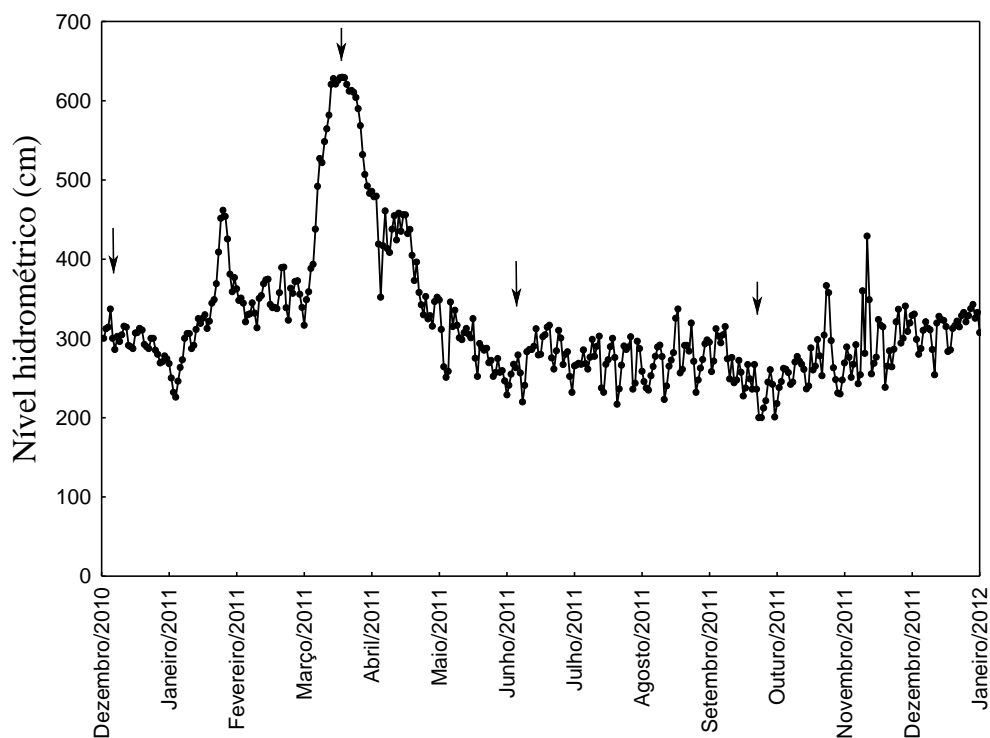


Figura 9 - Medição diária do nível médio da planície de inundação do alto rio Paraná (dados obtidos da Estação de campo da Universidade Estadual de Maringá). As setas indicam os períodos em que as amostragens foram realizadas.

Os períodos de águas altas e baixas foram muito distintos entre os períodos de amostragens. O mês de março de 2011 (período de águas) apresentou o nível fluviométrico médio de 5,4m ( $\pm 0,86m$ ), sendo o nível mínimo registrado 3,42m e nível máximo de 6,32m. O período de águas baixas (setembro/2011) teve o nível máximo atingido de 3,16m, e mínimo de 1,96m, o nível fluviométrico médio nesse período foi de 2,48m ( $\pm 0,31m$ ). Os períodos, intermediários de enchente (dezembro/2010) e vazante (junho/2011), apresentaram profundidade intermediária (aproximadamente 3m).

Assim, foram definidos quatro períodos distintos de amostragem sendo que as amostragens realizadas em dezembro/2010 correspondem ao período de enchente, março/2011 ao período de águas altas, junho/2011 corresponde ao período de vazante e

setembro/2011, o período de águas baixas.

A média e desvio padrão dos valores das variáveis abióticas durante todos os períodos de amostragem estão apresentados na tabela 8. Entre os períodos amostrados, as variáveis abióticas que, estatisticamente, apresentaram diferenças significativas, foram a OD ( $H_{(3;48)}=10,4022$ ;  $p=0,0154$ ), condutividade elétrica ( $H_{(3;48)}=10,3954$ ;  $p=0,0155$ ), turbidez ( $H_{(3;48)}=20,1886$ ;  $p=0,0002$ ), N-NH<sub>4</sub> ( $H_{(3;48)}=11,1596$ ;  $p=0,0109$ ), PT ( $H_{(3;48)}=10,3713$ ;  $p=0,0157$ ) e P-PO<sub>4</sub> ( $H_{(3;48)}=11,3394$ ;  $p=0,0100$ ).

Em dezembro/2010, as variáveis significativamente diferentes entre os ambientes foram pH ( $H_{(2;12)}=7,0385$ ;  $p=0,0296$ ), condutividade ( $H_{(2;12)}=8,7692$ ;  $p=0,0125$ ) e alcalinidade ( $H_{(2;12)}=8,7692$ ;  $p=0,0125$ ). Os maiores valores de pH foram encontrados no subsistema Ivinhema ( $7,1\pm 0,26$ ), e os menores no subsistema Baía ( $5,9\pm 0,27$ ). Os maiores valores de condutividade elétrica e alcalinidade foram encontrados no subsistema Paraná ( $56,1\pm 6,38$  e  $423,7\pm 76,14$ ; respectivamente), enquanto os menores foram encontrados no subsistema Baía ( $26,4\pm 0,89$  e  $135,8\pm 18,98$ ).

Em março, o período de águas altas, as variáveis que apresentaram diferenças significativas entre os subsistemas foram OD ( $H_{(2;12)}=8,7692$ ;  $p=0,0125$ ), MST ( $H_{(2;12)}=6,9615$ ;  $p=0,0308$ ), Clorofila-*a* ( $H_{(2;12)}=6,2692$ ;  $p=0,0435$ ) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $H_{(2;12)}=9,3739$ ;  $p=0,0092$ ). Os maiores valores de OD e MST foram observadas no subsistema Paraná ( $7,71\pm 2,22$  e  $2,81\pm 1,31$ ; respectivamente), seguido do Baía ( $4,62\pm 0,75$  e  $1,5\pm 0,55$ ), enquanto os menores valores observados pertenceram ao subsistema Ivinhema ( $2,9\pm 0,36$  e  $1,1\pm 0,71$ ); nesse subsistema foram também observados os maiores valores de clorofila-*a* e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $4,4\pm 2,1$  e  $6,4\pm 12,74$ ) enquanto os menores valores dessas variáveis foram observadas no subsistema Paraná.

Em junho apenas duas variáveis diferiram significativamente entre os três subsistemas, OD ( $H_{(2;12)}=8,7692$ ;  $p=0,0125$ ) e alcalinidade total ( $H_{(2;12)}=7,5385$ ;  $p=0,0231$ ). Com destaque para o subsistema Baía que apresentou alcalinidade muito inferior em relação aos subsistemas Paraná e Ivinhema.

No período de águas baixas (Setembro/2011), foram observadas diferenças significativas quanto ao pH ( $H_{(2;12)}=8$ ;  $p=0,0183$ ), condutividade ( $H_{(2;12)}=8$ ;  $p=0,0183$ ) e alcalinidade total ( $H_{(2;12)}=9,2692$ ;  $p=0,0097$ ).



Tabela 8. Média e desvio padrão (DP) das variáveis abióticas nos subsistemas durante os períodos de amostragem.

	Dezembro/2010			Março/2011			Junho/2011			Setembro/2011		
	Baía	Ivi.	Paraná	Baía	Ivi.	Paraná	Baía	Ivi.	Paraná	Baía	Ivi.	Paraná
<b>Temp. ( °C)</b>	28,9±0,56	27,6±0,68	26,9±0,68	27,35±0,17	28,3±0,38	26,98±0,7	27,35±0,17	28,28±0,38	26,98±0,70	18,53±0,28	18,65±1,21	18,68±1,81
<b>OD (mg/L)</b>	4,3±0,79	5,6±0,65	3,9±2,39	4,62±0,75	2,9±0,36	7,71±2,22	4,62±0,75	2,92±0,36	7,71±2,22	7,67±0,60	7,77±0,33	6,50±2,17
<b>pH</b>	5,9±0,27	7,1±0,26	6,4±0,46	6,16±0,35	6,2±0,22	6,45±0,61	6,16±0,35	6,24±0,22	6,45±0,61	6,47±0,22	7,24±0,26	6,59±0,57
<b>Cond.(uS/cm)</b>	26,4±0,89	42,8±7,31	56,1±6,83	49,28±3,11	49,9±2,12	54,5±2,32	49,28±3,11	49,88±2,12	54,50±2,32	15,50±1,10	37,18±11,96	47,60±6,96
<b>Secchi (m)</b>	0,6±0,22	1,3±1,51	2,3±2,51	1,85±0,58	2,2±0,88	3,16±2,9	1,85±0,58	2,19±0,88	3,16±2,9	0,98±0,27	1,16±0,63	1,80±1,29
<b>Turb (NTU)</b>	24,2±23,92	35,2±27,66	6,8±5,38	0,82±0,35	2,3±3,52	0,85±0,55	11,73±7,6	16,93±12,76	10,32±4,44	30,99±28,42	38,97±46,21	3,17±4,07
<b>MST (µg/L)</b>	1,2±0,69	2,5±1,28	1,4±0,79	1,5±0,55	1,1±0,71	2,81±1,31	1,41±0,80	2,59±1,17	2,24±0,65	1,58±1,09	5,03±3,95	1,27±2,04
<b>MSI (mg/L)</b>	1,0±0,61	1,8±1,00	0,8±0,50	0,59±0,44	0,6±0,47	2,02±1,03	0,85±0,57	1,98±1,13	1,3±0,64	1,18±0,90	4,09±3,36	1,02±1,42
<b>MSO (mg/L)</b>	0,2±0,11	0,7±0,33	0,6±0,42	0,91±0,50	0,5±0,29	0,79±0,36	0,56±0,24	0,61±0,13	0,94±0,34	0,39±0,21	0,94±0,61	0,25±0,94
<b>Alc.(mEq/L)</b>	135,8±18,9	314,1±636,	423,7±76,1	302,65±19,43	340,0±28,5	344,65±59,01	53,82±6,9	175,65±52,65	197,30±42,94	113,44±23,76	239,20±58,88	355,73±71,78
<b>Cl-a.(µg/L)</b>	10,6±9,87	7,4±7,77	11,6±11,68	2,19±0,22	4,4±2,51	1,18±0,61	18,81±13,67	6,84±3,99	4,46±4,20	9,15±5,43	5,27±5,92	5,58±4,77
<b>NT (µg/L)</b>	998,3±217,9	731,7±161,2	738,8±48,89	833,56±115,11	688,4±37,52	747,11±50,33	914,05±299,48	748,92±76,39	769,06±32,27	1560,60±977,9	1094,30±104,0	726,57±80,15
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(µg/L)</b>	38,3±29,84	54,8±40,37	75,1±71,26	0,00±0,00	6,4±12,74	216,99±52,47	0,14±0,16	60,82±86,54	96,84±75,52	32,20±64,41	110,31±127,6	84,36±116,95
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(µg/L)</b>	49,3±31,67	11,3±5,46	49,4±42,01	17,65±9,55	13,5±1,34	6,78±4,82	32,31±9,51	29,41±1,69	44,78±31,29	57,96±24,65	11,63±6,51	26,62±24,91
<b>PT (µg/L)</b>	68,8±23,03	40,2±21,70	42,1±33,18	24,42±4,89	20,0±7,2	21,83±8,08	45,48±28,55	30,46±13,68	22,51±10,57	70,93±40,39	43,27±21,34	31,66±25,84
<b>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>(µg/L)</b>	11,1±1,57	8,3±3,26	7,9±2,93	10,67±0,54	13,0±4,18	18,16±3,99	6,96±2,45	11,05±5,19	5,41±1,82	20,70±7,78	15,62±9,47	9,09±7,03
<b>COD</b>	11,0±3,22	*	2,4±1,95	2,79±1,89	3,3±0,89	2,47±0,93	5,06±1,77	3,66±1,82	2,03±0,98	7,46±3,01	2,84±1,91	1,06±1,76

\* Amostras para análise de carbono do subsistema Ivinhema foram perdidas

Foram verificadas alterações das variáveis limnológicas durante os diferentes períodos de amostragem. Na Análise de Componentes Principais foram retidos os dois primeiros eixos pelo critério de *Broken-Stick* explicando 53,28% dos dados (eixo 1= 33,26%; eixo 2= 20,02%). As variáveis  $\text{NO}_3^-$  ( $r=0,655$ ), condutividade elétrica ( $r=0,645$ ) e alcalinidade total ( $r= 0,616$ ) apresentaram as maiores correlações positivas enquanto o PT ( $r=-0,833$ ), clorofila-a ( $r=-0,789$ ) e COD ( $r=-0,778$ ) apresentaram correlação negativa. No segundo eixo, MSO ( $r=0,540$ ) e condutividade elétrica ( $r=0,510$ ) apresentaram correlação positiva e PT ( $r=0,639$ ) e clorofila-a ( $r=-0,612$ ) correlacionaram negativamente (Figura 10).

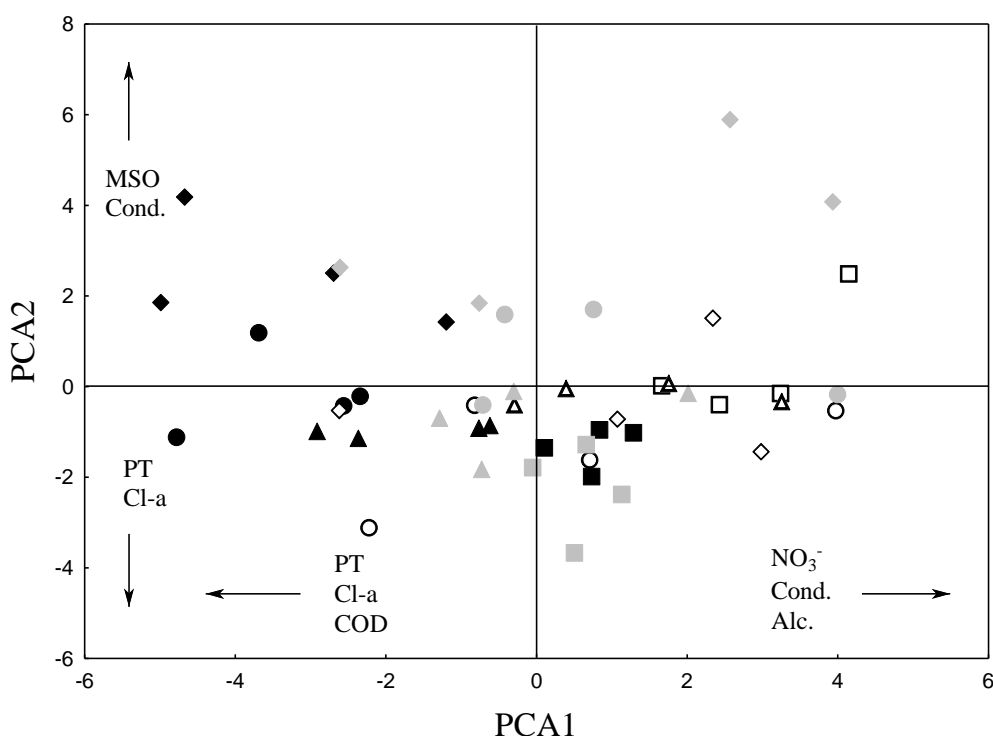


Figura 10 - Ordenação dos escores para cada estação de amostragem em relação ao eixo 1 e 2 da análise de componentes principais. Em relação aos subsistemas: ○□△◇ (Sem preenchimento)= Subsistema Paraná, ●■▲◆ (preenchimento em preto) = Subsistema Baía, ●■▲◆ (preenchimento em cinza)= Subsistema Ivinhema; e aos períodos de amostragem ○ = dezembro/2010, □ = março/2011 △= junho/2011 e ◇ = setembro/2011

O primeiro eixo distinguiu o subsistema Baía dos demais subsistemas ( $\text{KW-H}_{(2;48)}=14,868$ ;  $p=0,0006$ ), apresentando maiores valores de PT, CL-a e COD; enquanto os subsistemas Ivinhema e Paraná apresentaram os maiores valores de  $\text{NO}_3^-$ , condutividade elétrica e alcalinidade total. O segundo eixo separou os períodos de amostragem ( $\text{KW-H}_{(3;48)}=13,1845$ ;  $p=0,0043$ ) de março/2011 e setembro/2011 sendo que em março/2011 foram observadas maiores valores de PT e Cl-a.

A densidade de bactérias foi significativamente diferente entre os períodos de

amostragem (Figura 11A -  $H_{(3;48)}=18,2557$ ;  $p<0,001$ ), sendo que os períodos de enchente e águas altas apresentaram as maiores densidades de bactérias atingindo  $5,7 \times 10^6 (\pm 1,88 \times 10^6)$  bactérias  $\times \text{ml}^{-1}$  em março/2011. Nos períodos de vazante e águas baixas, foram observadas as menores densidades bacterianas, com a mínima sendo registrada em setembro/2011,  $1,69 \times 10^6 (\pm 1,83 \times 10^6)$  bactérias  $\times \text{ml}^{-1}$ .

Entre os ambientes estudados, tomando as amostragens periódicas como réplicas, não foram observadas mudanças significativas na densidade bacteriana ( $H_{(11;48)}=5,8724$ ;  $p=0,88$ ), apesar de ser observado uma densidade maior de bactérias nas lagoas Garças, Ventura e Fechada (Figura 11B).

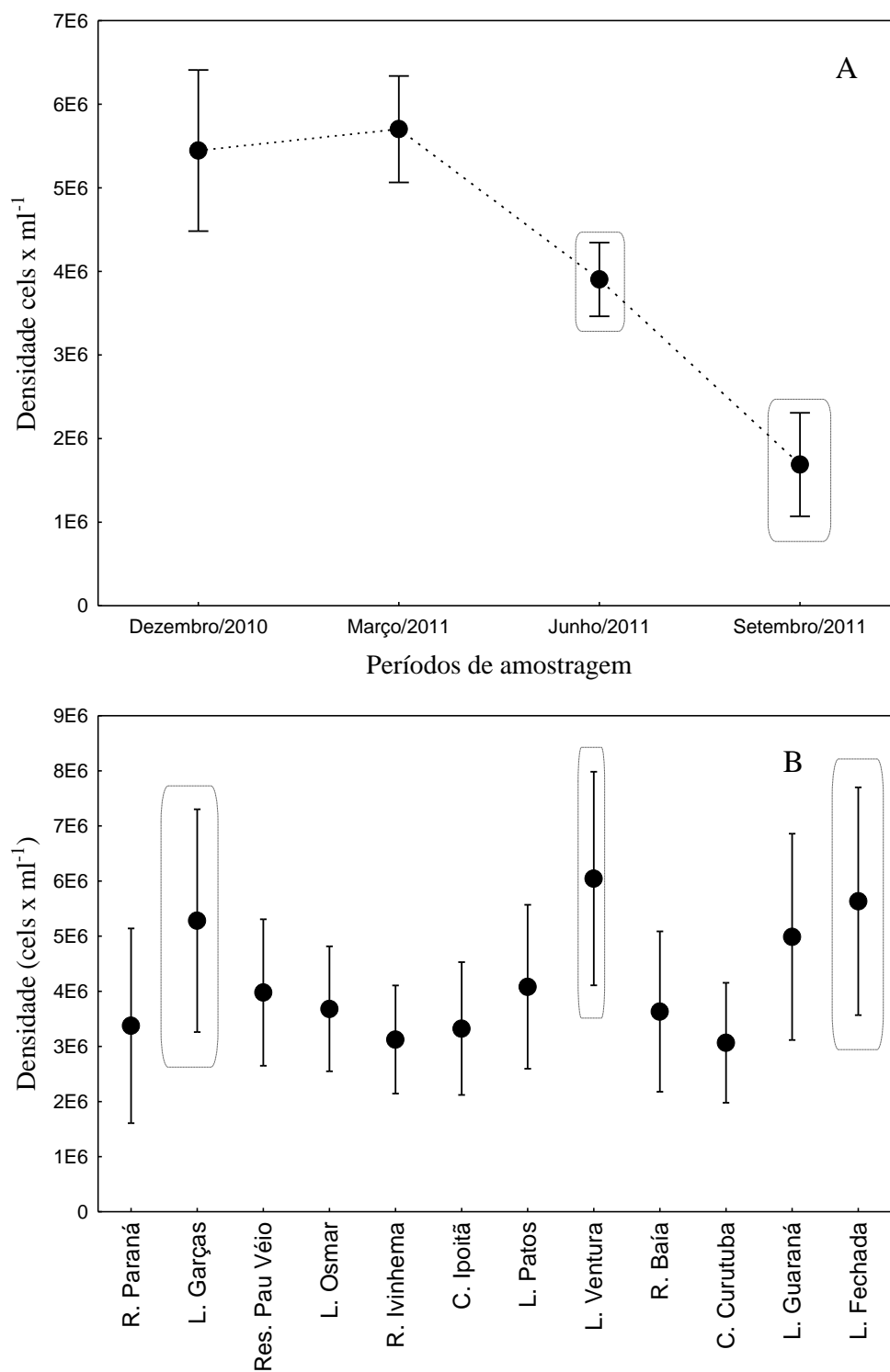


Figura 11 - Densidade da comunidade bacteriana entre os (A) períodos e (B) locais de amostragens. (●Média ± Erro padrão; a linha tracejada demonstra os ambientes com maiores densidades bacterianas)

As diferenças da abundância relativa dos grupos não foram significativas entre os ambientes, ou seja, quando considerados os períodos de amostragem como réplicas (Figura 12). Apesar de o domínio *Bacteria* apresentar maiores abundâncias relativas (acima de 20%) em todos os ambientes estudados.

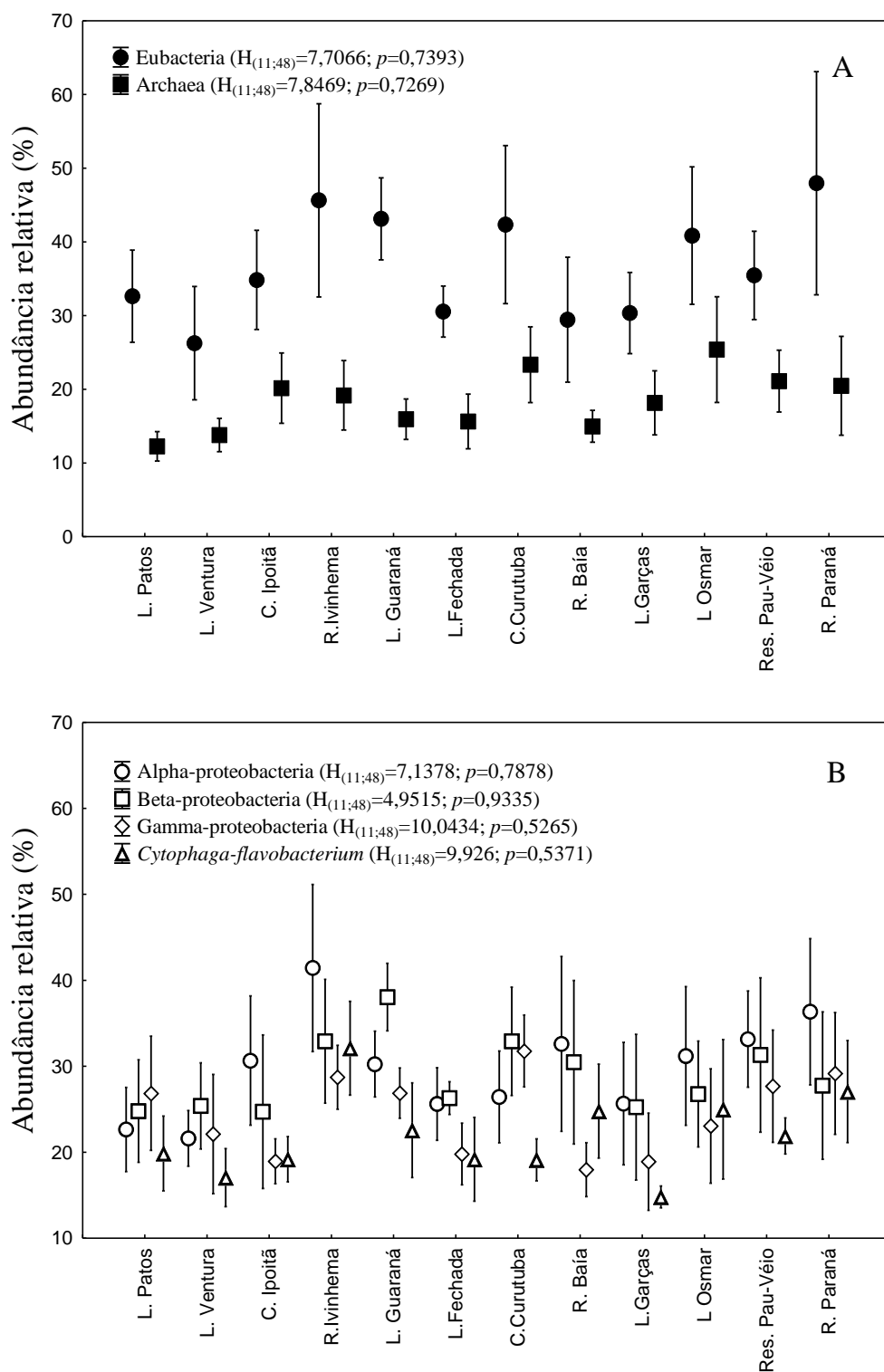


Figura 12 - Abundância relativa (A) dos domínios *Archaea* e *Bacteria* entre os ambientes amostrados e (B) das subdivisões do filo *Proteobacteria* e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. ● Média ⊥ Erro padrão.

No entanto, a abundância relativa dos domínios *Bacteria* e *Archaea*, das subdivisões do filo *Proteobacteria* bem como do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, apresentaram diferenças significativas entre os períodos amostrados. Em dezembro/2010, os grupos apresentaram abundâncias relativas aproximadamente iguais,

ao passo em que março/2011, juntamente com os maiores níveis fluviométricos, os grupos bacterianos apresentaram abundâncias relativas muito diferentes entre si. Os períodos de junho/2011 e setembro/2011 apresentaram uma retomada nas abundâncias relativas similares entre os grupos (Figura 13B).

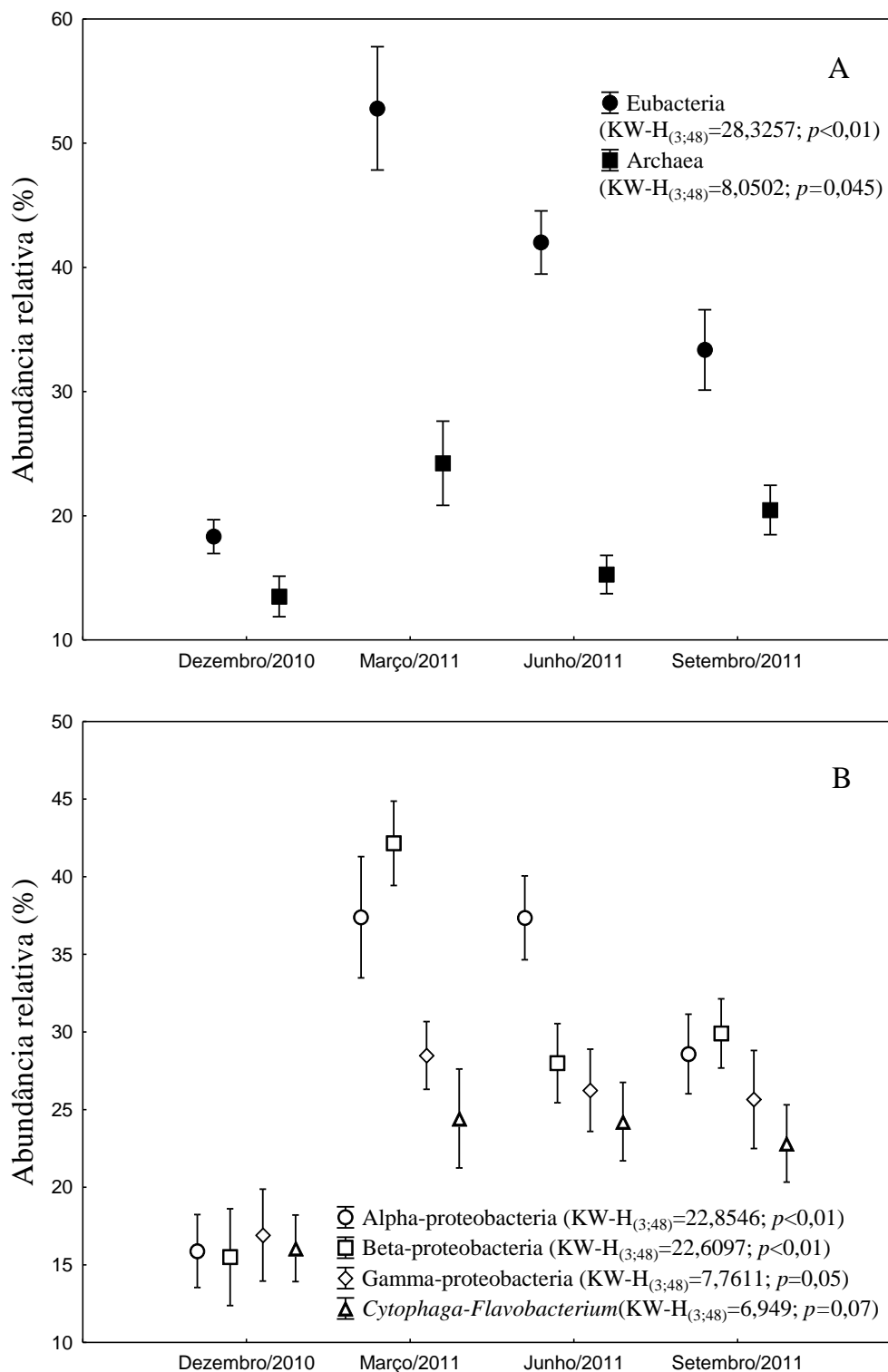


Figura 13 - Abundância relativa (A) dos domínios Archaea e Bacteria entre períodos amostrados e (B) das subdivisões do filo Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. ● Média ± Erro padrão

O período de águas altas provocou uma diminuição da diversidade de bactérias, provavelmente devido à diminuição da equitabilidade. Os maiores valores do índice de diversidade de Shannon-Wiener foram observados nos períodos de dezembro/2010 e Setembro/2011 (Tabela 9).

Tabela 9. Índice de diversidade de Shannon-Wiener entre os períodos amostrados

	Dezembro/2010	Março/2011	Junho/2011	Setembro/2011
Shannon-Wiener	1,61	1,59	1,57	1,60

A análise de agrupamento destendenciada reteve apenas o primeiro eixo com maior autovalor ( $\lambda=0,02$ ). A correlação com a matriz principal de dados demonstrou que os grupos que apresentaram influência positiva foram *Archaea* ( $r=0,228$ ) e Gamma-proteobacteria ( $r=0,118$ ), enquanto os grupos que apresentaram influencia negativa foram Alpha-proteobacteria ( $r=0,494$ ), Beta-proteobacteria ( $r=0,53$ ) e *Cytophaga-Flavobacterium* ( $r=0,067$ , figura 14).

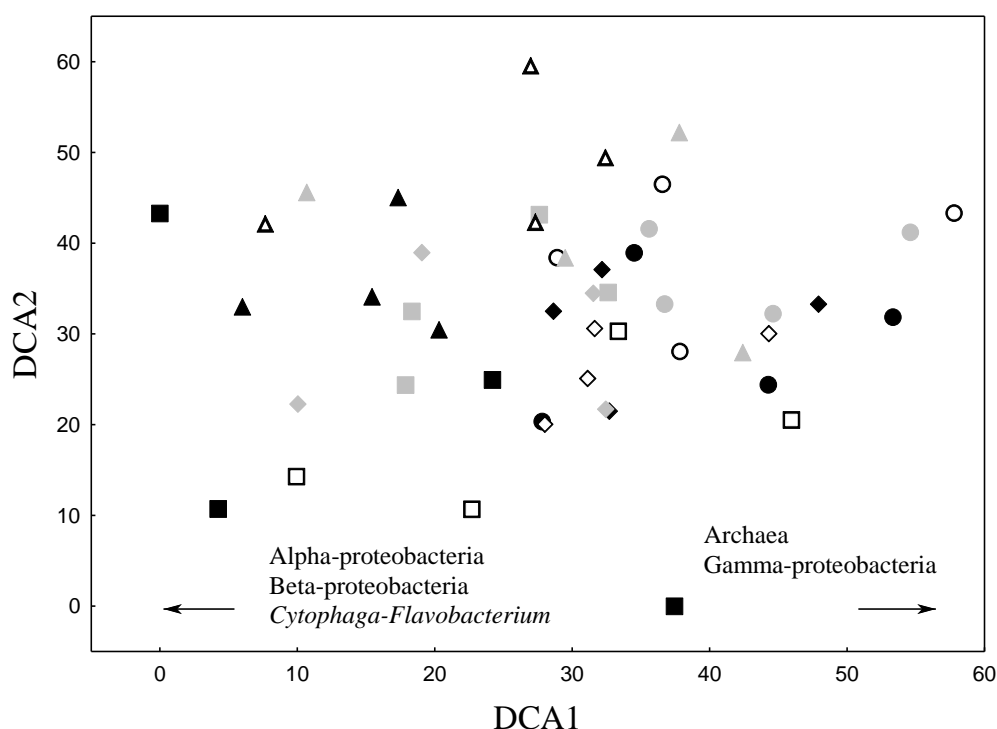


Figura 14 - Análise de agrupamento destendenciada dos grupos Bacterianos estudados em relação aos subsistemas:  $\square \triangle \diamond$  (Sem preenchimento) = Subsistema Paraná,  $\bullet \blacksquare \blacktriangle \blacklozenge$  (preenchimento em preto) = Subsistema Baía,  $\bullet \blacksquare \blacktriangle \blacklozenge$  (preenchimento em cinza) = Subsistema Ivinhema; e aos períodos de amostragem  $\circ$  = dezembro/2010,  $\square$  = março/2011  $\triangle$  = junho/2011 e  $\diamond$  = setembro/2011.

O primeiro eixo da DCA distinguiu os períodos de amostragem ( $KW-H_{(3;48)}=15,2066$ ;  $p=0,0016$ ), de forma que março/2011 e junho/2011 correlacionaram-se com as maiores abundâncias relativas de Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria e *Cytophaga-Flavobacterium*, enquanto setembro/2011 correlacionou-se com as maiores

abundâncias relativas de *Archaea* e Gamma-proteobacteria. Além disso, também é possível visualizar distintamente os grupos que mais apareceram entre os ambientes durante os períodos de enchente (*Archaea* e Gamma-proteobacteria), e vazante (Alpha-proteobacteria, Beta-proteobacteria e *Cytophaga-Flavobacterium*). Nenhum dos dois eixos separou significativamente os subsistemas.

### 3.4 DISCUSSÃO

As planícies de inundação recebem carbono autóctone (algas e macrófitas aquáticas) e alóctone (vegetação terrestre da área de várzea) que são incorporadas na biomassa bacteriana (21). Isto faz com que estejam sujeitas a uma intensa atividade do bacterioplâncton, que é influenciada pela alteração dos níveis hidrométricos (14, 30).

A estrutura da comunidade bacteriana em ambientes aquáticos pode estar relacionada às propriedades físicas e químicas dos ambientes (41, 48) e à composição da comunidade de outros micro-organismos eucarióticos (28, 42). As maiores densidades, embora não estatisticamente significativas, que foram observadas nas lagoas sem conexão permanente com o rio e da lagoa Garças (com conexão permanente), podem ter ocorrido em decorrência do carbono orgânico mais lábil, predominante nesses ambientes, resultando em maiores densidades bacterianas (51).

Além disso, os ambientes da planície de inundação podem servir como reservatórios de bactérias que são carreadas para os ambientes aquáticos durante o período de inundação (18, 19). Isso pode ter ocasionado as altas densidades bacterianas durante o período de águas altas. Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho, Thomaz e Bini (14), que evidenciaram um aumento da densidade bacteriana aliada às maiores concentrações de carbono orgânico dissolvido, durante o período de águas altas.

Em planícies de inundação, a biota é diretamente influenciada pelas trocas laterais entre a planície e os ambientes aquáticos, permitindo a rápida ciclagem de matéria orgânica e nutrientes (27). De acordo com Leininger *et al* (32) arqueias do grupo *Crenarchaeota* podem ser os mais abundantes organismos oxidantes de amônia nos solos. A distinção dos grupos *Archaea* e Gamma-proteobacteria como mais ocorrentes entre os ambientes durante o período de enchente (dezembro/2011) pode estar relacionado com o carreamento arqueias para os ambientes aquáticos a partir da área de várzea adjacente. Enquanto Gamma-proteobacteria, que é um grupo caracterizado por seu comportamento oportunista (12), desenvolveu alta abundância



relativa devido à entrada de nutrientes da planície.

O domínio *Bacteria* tem sido encontrado nos ambientes aquáticos em altas abundâncias relativas (17), enquanto o domínio *Archaea* não ultrapassa 1% dos sedimentos límnicos (47). Assim como esperado, neste estudo as abundâncias relativas de *Bacteria* foram maiores do que do domínio *Archaea* em todos os ambientes e períodos de amostragem, apesar das abundâncias relativas de *Bacteria* encontradas nesse estudo serem menores do que as encontradas em outros estudos de ambientes aquáticos. Essa baixa abundância relativa pode estar atribuída ao uso de apenas uma das três sondas que podem ser utilizadas em conjunto para marcar as bactérias desse domínio. Para uma estimativa mais acurada do domínio *Bacteria* deveriam ter sido utilizadas as sondas EUB338 II e EUB338III, juntamente com a EUB338 (20).

Logo após o pico da cheia; com a diminuição do nível da água (vazante), a matéria orgânica proveniente das áreas de várzea começa a se acumular decompor, reduzindo as concentrações de oxigênio dos ambientes. Nesse período é observada a maior incidência do grupo Alpha-proteobacteria. Segundo Imhoff (25), estas são bactérias que apresentam crescimento lento e são adaptadas a baixas concentrações de oxigênio.

Na vazante, a matéria orgânica dissolvida de alto peso molecular, proveniente da inundação da várzea diminui, levando a redução da abundância relativa do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* (relacionado diretamente com a disponibilidade de matéria orgânica; 29). Apesar de ser comumente registrada em lagos de água doce independente das condições tróficas (39, 59), a abundância relativa das Beta-proteobacteria também diminui em relação ao período de águas altas.

Algumas bactérias do grupo Alpha-proteobactéria, apresentam crescimento lento e são adaptadas a baixas concentrações de oxigênio (25). No período de águas baixas, a abundância do grupo Alpha-proteobacteria diminuiu em relação ao período de vazante. As menores concentrações de oxigênio foram observadas durante o período de vazante, uma vez que durante o período de águas baixas, provavelmente as lagoas tornam-se mais aeradas devido à baixa profundidade que estas apresentam. Assim, a abundância relativa dos demais grupos aumenta, sobrepondo a abundância de Alpha-proteobacteria nesse período.

As amplas variações das características limnológicas observadas entre os subsistemas, indicam que essa planície é composta por ambientes muito diversos; o que pode levar a uma grande diversidade de organismos (2). Além disso, a flutuação dos

níveis hidrológicos observados nessa planície pode influenciara diversidade das espécies faunísticas nos ambientes de planície de inundação (1).

No período de águas altas, as características limnológicas tendem a se tornar mais homogêneas devido à maior conectividade entre os ambientes da planície de inundação (52). A separação das amostragens de março/2011 e setembro/2011 pelo segundo eixo da PCA demonstraram os períodos de águas altas e baixas bem definidas durante o estudo.

A PCA também distinguiu o subsistema Baía do Paraná e Ivinhema, mas apesar das diferentes características limnológicas, a DCA não distinguiu diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os subsistemas, apenas entre os períodos amostrados. Isso pode sugerir que as alterações das características limnológicas causadas pelo ciclo hidrológico sejam mais importantes para a determinação da comunidade de bacterioplâncton que as características regionais.

Ou seja, apesar da estrutura da comunidade ser diferente entre os ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná, quando o fator tempo é inserido, esse será o melhor preditor da comunidade bacteriana. O pulso de inundação altera as variáveis limnológicas mais importantes para a determinação da comunidade bacteriana, como por exemplo, a qualidade e a origem da matéria orgânica e as concentrações de nutrientes.

De acordo com Van der Gucht *et al* (55), a composição da comunidade de bactérias responde a fatores ambientais chave ao longo de uma ampla escala espacial, sendo que os principais fatores controladores dessa comunidade são a disponibilidade de recursos e a predação. A alternância entre períodos de águas altas e baixas, a que as planícies de inundação estão sujeitas, alteram esses dois fatores, de forma que, nesse estudo, as diferenças na estrutura da comunidade bacteriana durante os períodos de amostragens acompanharam as variações das características limnológicas temporais, enquanto as variações espaciais não são determinadoras da comunidade bacteriana quando o componente tempo é avaliado.

No geral, o período de águas altas é caracterizado por apresentar um efeito homogeneizado sobre os ambientes aquáticos na planície de inundação do alto rio Paraná (52). Para o fitoplâncton e zooplâncton, o período de águas altas permite a troca e inclusão de diferentes *taxa* entre os ambientes da planície de inundação (11, 31). O aumento do número de *taxa* provoca altos valores da riqueza de espécies para essas comunidades aquáticas durante esse período (54, 56).

Nesse estudo, no período de águas altas foi constatada uma diminuição da diversidade de Shannon-Wiener gerada pelo fator homogeneizador, que leva à diminuição da equitabilidade dos grupos bacterianos, seguido de um aumento na diversidade no período de águas baixas. Fatores locais e regionais, como chuva, vento e mesmo fatores autóctones, acabam promovendo a diferenciação dos ambientes e aumento da diversidade após o período de águas altas. Vale lembrar que nesse estudo foram utilizados para a análise um domínio e quatro filos bacterianos, ou seja, um refinamento taxonômico muito baixo. Uma análise mais específica da comunidade bacteriana pode mostrar resultados muito mais esclarecedores.

Muitos estudos demonstraram como a densidade bacteriana se altera frente ao pulso de inundação (e.g. 6, 14, 30), mas poucos estudos abordam a dinâmica sazonal da estrutura da comunidade bacteriana na em sistemas de planície de inundação em região tropical. O conhecimento da estrutura e dinâmica da comunidade de bactérias planctônicas pode levar a um maior entendimento da contribuição dessa comunidade para o ecossistema.

O pulso de inundação é a principal força direcionadora das características limnológicas da planície e também o principal direcionador da comunidade de bactérias planctônicas. Observou-se que: i) o período de águas altas aumenta a densidade bacteriana, ii) a comunidade bacteriana durante o período de enchente e águas altas é influenciada tanto pela entrada de nutrientes como também de bactérias da planície para os ambientes aquáticos e iii) apesar de proporcionar maior similaridade entre os ambientes da planície, diminui a equitabilidade da comunidade bacteriana e reduz sua diversidade.

A disponibilização de recursos durante o pulso, bem como as alterações da diversidade e densidade do fitoplâncton e do zooplâncton, potencialmente podem alterar a estrutura da comunidade bacteriana nos ambientes aquáticos. A vantagem competitiva de um grupo bacteriano sobre os demais, bem como os efeitos “bottom up” e “top down” sobre o bacterioplâncton, a predação seletiva e a susceptibilidade aos fagos, são fatores relacionados ao pulso de inundação que podem influenciar a comunidade bacteriana. Novos estudos devem ser realizados para investigar como essas alterações da comunidade bacteriana influenciaria na disponibilização de nutrientes para os ambientes de planícies de inundação.

## Agradecimentos

O trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, entidade do Governo Brasileiro voltada para a formação de recursos humanos. Agradecemos ao CNPq e a CAPES pelo financiamento das pesquisas; ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPELIA), ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), pelo apoio no desenvolvimento do trabalho e a Maria do Carmo Roberto do Laboratório de Limnologia.

## REFERÊNCIAS

1. Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC. 2004. Threats for biodiversity in the floodplain of the upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. *Ecohydrology & Hydrobiology*. 4:3:255-268.
2. Agostinho AA, Thomaz SM, Minte-Vera CV, Winemiller KO. 2000. Biodiversity in the high Paraná River floodplain. In: Gopal B, Junk WJ, Davis JA (eds.), *Biodiversity in Wetlands: Assessment, Function and Conservation*. The Netherlands Backhuys Publishers. Leiden. p.89-118.
3. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
4. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews*. Vol. 59, No. 1. p.143-169.
5. Amann, R.I., Fuchs, B. M., Behrens, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, vol. 12, p. 231-236.
6. Anésio AM, Abreu PC, Esteves FA. 1996. Influence of the Hydrological Cycle on the Bacterioplankton of an Impacted Clear Water Amazonian Lake. *Microb Ecol.* 34:66-73.
7. Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA e Thingstad f. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marin. Ecol. Progr. Ser.* 10:257-263
8. Azevedo JC, Teixeira MC, Santos AM, Leandrini JA e Pagioro TA. 2008. Caracterização espectroscópica da matéria orgânica dissolvida da planície de inundação do alto rio Paraná. *Oecol. Bras.* 12:1:66-77.
9. Besemer K, Moeseneder MM, Arrieta JM, Herndl GJ, Peduzzi P. 2005. Complexity of bacterial communities in a River-Floodplain System (Danube, Austria). *Appl. Environ. Microb.* 71:2:609-620

10. Bonneto AA, Wais IR, Castello HP. 1989. The increasing damming of the Parana basin and its effects on the lower reaches. *Regulated Rivers Research. and Management.* 4:333-346.
11. Borges PAF, Train S. 2009. Phytoplankton diversity in the Upper Paraná River floodplain during two years of drought (2000 and 2001). *Brazilian Journal of Biology.* 69:2:637-647.
12. Bouvier T, Del Giorgio PA. 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnol. Oceanogr.* 47:453-470.
13. Carmouze JP. 1995. O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. São Paulo: Edgard Blücher/ Fapesp, 253 p.
14. Carvalho P, Thomaz SM, Bini LM. 2003. Effects of water level, abiotic and biotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia.* 510: 67-74.
15. Communelo, E. 2001. Dinâmica de inundação de áreas sazonalmente alagáveis na planície aluvial do alto rio Paraná. Maringá, 2001. 40f., II. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
16. Cotner JB, Biddanda BA. 2002. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems.* 5: 105-121.
17. Cottrell M e Kirchman DL. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:12:5116-5122.
18. Crump BC, Kling GW, Bahr M, Hobbie JE. 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4:2253-2268.
19. Cuffney TF, Wallace JB. 1988. Particulate Organic Matter Export from Three Headwater Streams: Discrete versus Continuous Measurements. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 2010-2016
20. Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
21. Findlay S, Carlough M, Crocker MT, Gill HK, Meyer JL, Smith PJ. 1986. bacterial growth on macrophyte leachate and fate of bacterial production. *Limnol Oceanogr.* 31:6:1335-1342.
22. Fundação Universidade Estadual De Maringá. Nupélia/Cnpq. Relatório Anual/PELD 2000. A planície alagável do alto rio Paraná Sitio 6. Descrição dos locais

de amostragem, 2000.

23. Gauch Jr., HG. 1986. Multivariate analysis in community ecology. Cambridge: Cambridge University Press. 298p

24. Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MAM. 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. 2nd ed. London: Blackwell Scientific Publication. 214p.

25. Imhoff JF. 2006. Chapter 3.1.1. The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg B, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds.) The Prokaryotes. New York, Springer, 2006. 3<sup>rd</sup> Ed. 5:41-64.

26. Jongman RHG, Ter Braak CJF, Van Tongeren OFR. 1996. Data analysis in community and landscape ecology. Cambridge: University Press. 299p. Junk WJ, Bayley PB; Sparks RE. 1989. The floodpulse concept in river-floodplain systems.

27. Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE. 1989. The floodpulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge D.P. (Ed) Proceedings of the International Large River Symposium, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences. 106:110-127.

28. Kent AD, Jones SE. 2006. Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. Environmental Microbiology 8:8:1448-1459.

29. Kirchman DL. 2002. The ecology of Cytophaga-FlavoBacteria in aquatic environments. FEMS Microbiol. Ecol. 39:91-100.

30. Kobayashi T, Ryder DS, Gordon G, Shannon I, Ingleton T, Carpenter M, Jacobs SJ. 2009. Short-term response of nutrients, carbon and planktonic microbial communities to floodplain wetland inundation. Aquat. Ecol. 43:843-858.

31. Lansac-Tôha FA, Bonecker CC, Velho LFM, Simões NR, Dias JD, Alves GM, Takahashi EM. 2009. Biodiversity of zooplankton communities in the upper Paraná River floodplain: interannual variation from long-term studies. Brazilian Journal of Biology. 69:2(Suppl.):539-549.

32. Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature. 442:17:806-809.

33. Lemke MJ, Lienau EK, Rothe J, Pagioro TA, Rosenfeld J, DeSalle R. 2009. Description of freshwater bacterial assemblages from the upper Paraná river floodpulse system, Brazil. Microb Ecol. 57:94-103.

34. Mackereth FYH, Heron J, Talling JJ. 1978. Water analysis: some revised methods for limnologists. Freshw. Biol. Assoc. 36:1-120.

35. Magurran AE. 1988. Ecological Diversity and its measurement. Croom Helm, London.

36. Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593 – 600
37. Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate *Bacteria* of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiol.* 142: 1097-1106.
38. Mccune B, Mefford MJ. 1999. *Pc-Ord. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 5.0*, MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.
39. Methé BA, Hiorns WD, Zehr JP. 1998. Contrast between marine and freshwater bacterial community composition: Analyses of communities in Lake George and six other Adirondack lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43:2:368-374.
40. Neef A. 1997. Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis (Technische Universität München).
41. Nelson CE. 2009. Phenology of high-elevation pelagic *Bacteria*: the roles of meteorologic variability, catchment inputs and thermal stratification in structuring communities. *The ISME Journal.* 3:13-30.
42. Newton RJ, Kent AD, Triplett EW, McMahon KD. 2006. Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environmental Microbiology.* 8:6:956-970.
43. Pomeroy Lr. 2007. The Microbial Loop. *Oceanography.* 20:2.
44. Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE, Stahl DA. 1994. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240.
45. Roberto MC, Santana NF, Thomaz SM. 2009. Limnology in the Upper Paraná River floodplain: large-scale spatial and temporal patterns, and the influence of reservoirs. *Brazilian Journal of Biology* v.69 n. 2 p. 717-725
46. Rocha PC. 2002. Dinâmica dos Canais no Sistema Rio- Planície Fluvial do Alto Rio Paraná, nas Proximidades de Porto Rico-PR. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 169p. Tese de Doutorado.
47. Schwarz JIK, Eckert W, Conrad R. 2007. Community structure of Archaea and *Bacteria* in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *System. Appl. Microbiol.* 30:239-254.
48. Shade A, Kent AD, Jones SE, Newton RJ, Triplett EW, McMahon KD. 2007. Interannual dynamics and phenology of bacterial communities in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 52:2:487-494.
49. Souza MC, Monteiro R. 2005. Levantamento florístico em remanescente de floresta ripária no alto rio Paraná: Mata do Araldo, Porto Rico, Paraná, Brasil. *Acta*

Scientiarum. Biological Sciences. 27:4:405-414.

50. Statsoft Inc. 2005. Statistica (data analysis software system). Version 7.1.
51. Teixeira MC, Santana NF, Azevedo JCR, Pagioro TA. 2011. Bacterioplankton features and its relations with DOC characteristics and other limnological variables in Paraná River floodplain environments (PR/MS-Brazil). *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 897-908.
52. Thomaz SM, Bini LM, Bozelli RL. 2007. Floods increase similarity among aquatic habitats in river-floodplain systems. *Hydrobiologia* 579:1-13
53. Thomaz SM, Bini LM, Pagioro TA, Murphy KJ, dos Santos Am, Souza DC. 2004. Aquatic macrophytes: diversity, biomass and decomposition. In Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS. (Eds.) *The Upper Paraná River Floodplain: Physical aspects, ecology and conservation*. Netherlands: Backhuys. p. 331-350
54. Train S, Rodrigues LC. 2004. Phytoplankton assemblages. In Thomaz SM, Agostinho AA, Hahn NS (Eds.). *The Upper Paraná River floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers. p. 103-124.
55. Van der Guch K, Cottenie K, Muylaert K, Vloemans N, Cousin S, Declerck S, Jeppesen E, Conde-Porcuna JM, Schwenk K, Zwart G, Degans H, Vyerman W, Meester LD. 2007. The power of species sorting: local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *PNAS*. 104:51: 20404 – 20409.
56. Velho LFM, Bini LM, Lansac-Tôha FA. 2004. Testate amoeba (Rhizopoda) diversity in plankton of the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Hydrobiologia*. 523: 1-3:103-111.
57. Welcomme RL. 1985. River fisheries. FAO. Technical Paper, Rome: 262-330.
58. Zagatto EAG, Jacintho AO, Reis BF, Krug FJ, Bergamim H, Pessenda LCR, Mortatti J, Giné MF. 1981. Manual de análises de plantas empregando sistemas de injeção em fluxo. Universidade de São Paulo, Piracicaba- SP: 45 pp.
59. Zwart G, Hiorns WD, Methé BA, van Agterveld MP, Huisman R, Nold SC, Zehr JP, Laanbroek HJ. 1998. Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in north America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater *Bacteria*. *System. Appl. Microbiol*. 21:546-556.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Estes são os primeiros estudos abordando a estrutura da comunidade de bactérias na planície de inundação do alto rio Paraná em amplas escalas e durante um ciclo hidrológico completo. Constatou-se que os subsistemas da planície de inundação apresentam padrões distintos de distribuição dos organismos, sendo que os rios da



planície de inundação do alto rio Paraná influenciam fortemente a comunidade bacteriana, seja pelas suas características limnológicas ou pelas atividades antrópicas a que estão submetidos.

Através das análises concluiu-se que a comunidade bacteriana se altera sazonalmente, sendo influenciada principalmente pelo pulso de inundação. O período de águas altas promove a diminuição da densidade total de bactérias e um aumento da abundância relativa de *Archaea*, que são carreadas dos ambientes terrestres adjacentes.

O período de águas altas apresenta o menor índice de diversidade de Shannon-Wiener que os demais períodos do pulso de inundação. Deve-se chamar atenção pela falta de refinamento taxonômico, ou seja, considerando que esse resultado foi obtido quando analisado os grandes grupos bacterianos, estudos com sondas específicas provavelmente poderiam responder muito mais sobre a comunidade bacteriana em planícies de inundação. A utilização de uma nova técnica molecular forneceu um avanço para o estudo da comunidade bacteriana na planície de inundação do alto rio Paraná.