

**DESNITRIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
FILOGENÉTICA DAS BACTÉRIAS DE
VIDA LIVRE E BACTÉRIAS ADERIDAS
ÀS PARTÍCULAS NO HIPOLÍMNIO DO
LAGO KIZAKI, JAPÃO**

Donato Seiji Abe



Tese apresentada à Escola de Engenharia
de São Carlos da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Ciências
da Engenharia Ambiental.

ORIENTADOR: Prof. Titular José Galizia Tundisi

São Carlos
1998

Class.	TESE
Cutt.	0088
	e.1
Tombo	T0104/98

311 00013356

Ciências da Engenharia Ambiental

at 0964599

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do serviço de Biblioteca - EESC-USP

A138d Abe, Donato Seiji
Desnitrificação e caracterização filogenética
das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às
partículas no hipolímio do Lago Kizaki, Japão /
Donato Seiji Abe. -- São Carlos, 1998.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de
São Carlos - Universidade de São Paulo, 1998.
Área: Ciências da Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. José Galizia Tundisi.

1. Desnitrificação. 2. Óxido nítrico.
3. Hipolímio. 4. rRNA. 5. Hibridização in situ.
I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Candidato: Bacharel **DONATO SEIJI ABE**

Tese defendida e aprovada em 14-04-1998
pela Comissão Julgadora:



Prof. Titular **JOSÉ GATZIA TUNDISI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo)



Profª. Doutora **MIRNA JANUÁRIA LEAL GODINHO**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



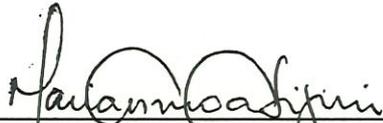
Prof. Titular **JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



Profª. Titular **ODETE ROCHA**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



Profª. Titular **TOCAYA MATSUMURA TUNDISI**
(Universidade Federal de São Carlos - UFSCar)



Profª. Doutora **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora da Área de Ciências da Engenharia Ambiental



JOSE CARLOS A. CINTRA
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

*Aos meus pais,
Abe Joshie (in memoriam) e Reiko Abe*

Creating a new theory... is rather like climbing a mountain, gaining new and wider views, discovering unexpected connections between our starting point and its rich environment. But the point from which we started still exists and can be seen, although it appears smaller and forms a tiny part of our broad view gained by mastery of the obstacles on our adventurous way up.

A. Einstein e L. Infeld (1938), *The Evolution of Physics*.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Galizia Tundisi pela orientação e pelo apoio e incentivo antes e durante a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Kenji Kato da Universidade de Shinshu, Japão, pelos ensinamentos sobre ecologia microbiana, pelo apoio logístico ao longo da elaboração deste trabalho, pelas inúmeras discussões, pela hospitalidade e principalmente pela amizade.

Ao Professor José Eduardo dos Santos, Professora Mirna Januária Leal Godinho, Professora Odete Rocha e Professora Takako Matsumura-Tundisi, membros efetivos da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e críticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado no país e da bolsa de doutorado especial no Japão.

Ao Ministério da Ciência, Educação e Cultura do Japão (Monbusho) pela aprovação da bolsa de estudos no Japão.

Ao Professor Hisayoshi Terai da Universidade de Nagoya pelo ensinamento sobre técnicas de coleta e análise de N_2O , pelas valiosas sugestões e pela amizade.

Ao Professor Muneoki Yoh da Universidade de Tecnologia e Agricultura de Tóquio pela amizade, pelas sugestões fundamentais à elaboração deste trabalho e pela permissão para o uso de seu laboratório de cromatografia a gás para análise de N_2O .

Ao Professor Emeritus Yatsuka Saijo da Universidade de Nagoya por gentilmente deixar a disposição as facilidades para coleta no Lago Kizaki.

Ao Professor Keiichi Ohta da Universidade de Nagoya pelo apoio na fase preliminar à aprovação da bolsa no Japão.

Aos professores Park Ho Dong , T. Toda e Teiji Sota pela amizade e pelas discussões durante a elaboração deste trabalho, ao Professor Hidetake Hayashi pelo fornecimento de material para coleta, e aos Professores Tokio Okino e Takayuki Hanazato pela permissão ao uso dos laboratórios e acomodações na Estação Hidrobiológica do Lago Suwa, todos da Universidade de Shinshu.

Ao Prof. Laszlo G-Tóth do Instituto de Pesquisas Limnológicas de Balaton da Academia Húngara de Ciências, ex-bolsista da Sociedade Japonesa de Progresso à Ciência (JSPS), pelo apoio durante as coletas, pela inúmeras discussões, mas principalmente pela amizade e pelo nosso alegre convívio em Matsumoto como bolsistas estrangeiros.

Ao Professor Kimitoshi Ishikawa do Instituto Nacional de Recursos Ambientais em Tsukuba pelo apoio constante no Japão.

Aos funcionários administrativos da Escola de Ciências Paramédicas da Universidade de Shinshu pelo suporte burocrático.

À administração da Universidade de Shinshu pela concessão de vaga no Alojamento Universitário para Estudantes Estrangeiros.

Ao Professor Rudolf Amann da Universidade Técnica de Munique pelo ensinamento teórico e prático sobre a técnica da hibridização fluorescente *in situ*, durante o curso por ele ministrado no Instituto Nacional de Biociências e Tecnologia Humana em Tsukuba, Japão, e ao Professor Kazunori Nakamura, Conselheiro Geral de Pesquisa desta instituição, pela permissão para que eu fizesse parte do curso ministrado pelo Professor Amann.

Ao Professor Isao Koike da Universidade de Tóquio pelas sugestões na fase preliminar à execução deste trabalho.

À Professora Yaeko Masuchi da Universidade de Tóquio pelos ensinamentos sobre técnica de purificação de DNA.

Ao Professor Hiroyuki Yamamoto da Universidade de Gifu pelas sugestões sobre técnicas moleculares e pelo fornecimento de importantes referências bibliográficas.

Ao Prof. Donald Adams da Universidade do Estado de Nova York pelas sugestões e pelo envio das câmaras infláveis.

Ao colega Takashi Arakawa da Estação Hidrobiológica do Lago Suwa por ter me ensinado o uso do aparelho analisador de TOC.

Aos familiares do Professor Kato, Sra. Yoko Kato e os filhos Sayaka e Kunihiko, pela hospitalidade e atenção durante minha permanência em Matsumoto.

Ao meu irmão Flávio Saiji Abe, engenheiro da Indústria de Automóveis Toyota do Japão, e à minha cunhada Cláudia Kohara Abe, que tanto me apoiaram durante a minha permanência no Japão.

À colega Liang Tsui Hua do Instituto Oceanográfico da USP e ex-bolsista do Monbusho na Universidade de Pesca e Ciências Aquáticas de Tóquio, pela amizade e hospitalidade durante a minhas visitas a Tóquio.

Ao colega Koichi Ara do Instituto Oceanográfico da USP pelo apoio e amizade.

À Prof.a Iara Della Senta, representante do CNPq no Japão, pelo auxílio burocrático através de inúmeros contatos telefônicos realizados com Brasília.

Ao Sr. Kentaro Nagata da Associação Central Nipo-Brasileira sediada em Tóquio pelos auxílios prestados antes e durante a minha permanência no Japão.

À Diretora do CRHEA, Prof.a. Maria do Carmo Calijuri, pelo apoio e empenho na direção do Centro.

Às Professoras Mirna J. L. Godinho e Takako Matsumura-Tundisi pelas valiosas sugestões e críticas abordadas durante o meu exame de qualificação.

Ao Professor Salvador Airton Gaeta do Instituto Oceanográfico da USP pelo constante incentivo.

Aos funcionários do CRHEA, Claudete e Regina pelo constante auxílio e atenção, ao Ivan, Paulo, Eli, Rogério, Sr. Maurício, Dona Catarina, Regina, Sr. Milton e todos os demais funcionários, pela prestatividade.

Aos técnicos dos laboratórios do CRHEA: Amândio, Miro, Lucy, Marcelo, América e Betão.

Aos saudosos amigos adquiridos no Japão: Atsuko Yumoto, Yoko Kamijo, Kimiko Nishimaki, Kayo, Sr. Sasai, Sr. Makita, Fujimata, Onoda, Nakamura, Araki, Yumi, Yuzawa, Nakano, Ikegami, Dr. Morita, Sr.

Hasegawa, Yara Iguchi, Natália, Tomas, Harriet Baillie, Akira Shibata, Minoru Wada, Toshitada Fujita e Konohira.

Aos colegas de São Carlos: Alfredo Lages, Sérgio Sonoda, Flávia, Fernan, José Américo, Glória, Alexandre, Antônio, Esperanza, Susicley, Rosa, Lola, Eduardo, Danilo, Guillermo, Elzita, André, Ana Luisa, Luiz Fernando, Simone, Luiz Fernando Chalar, Bittar, Abílio, Leonardo, Denílson, Luci, Aninha, Dora, Marion, e a todos aqueles com quem convivi durante o período de doutorado.

Aos amigos Fábio Moretzsohn, Antony Chatwin, Paulo Yukio, Cláudia Vieitas, Jaqueline Goerck, Wolfgang Fisher, Oscar Brino, Patricia Metzler, Eduardo Masami Kitahara, Albert Ditchfield, Sérgio Sonoda, Guillermo Marquiza, e aos demais companheiros que amenizaram minha solidão no Japão pelas freqüentes correspondências pelo correio eletrônico.

Às amigas Maria Solange Francos e Sueli Caleffi, pela amizade e incentivo.

Aos meus pais Abe Joshie (*in memoriam*) e Reiko Abe, e ao meu irmão Carlos Kenji Abe e sua esposa Mary Miyata Abe, pelo apoio e incentivo permanentes.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de símbolos.....	iii
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Histórico.....	1
1.2. Bases científicas.....	3
1.3. Objetivos.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1. Local de estudo: Lago Kizaki.....	12
2.2. Amostragem.....	15
2.3. Montagem dos experimentos de desnitrificação.....	16
2.4. Análise de N ₂ O.....	19
2.5. Determinação da atividade desnitrificante.....	22
2.6. Análises químicas.....	22
2.7. Contagem de bactérias.....	23
2.8. Caracterização filogenética da comunidade microbiana	24
2.8.1. Fixação das amostras.....	25
2.8.2. Concentração e tratamento das células.....	25
2.8.3. Tratamento das lâminas de vidro.....	26
2.8.4. Hibridização com oligonucleotídeos fluorescentes.....	27
2.8.5. Oligonucleotídeos utilizados.....	28
2.8.6. Preparação de lâminas para microscopia e determinação das proporções dos grupos.....	30
2.9. Análise estatística.....	32

3. RESULTADOS	34
3.1. Condições ambientais.....	34
3.2. Atividade desnitrificante.....	36
3.3. Contagem de bactérias.....	37
3.4. Análise da comunidade microbiana.....	38
3.5. Análise estatística.....	41
4. DISCUSSÃO	43
4.1. Atividade desnitrificante e variáveis ambientais.....	43
4.2. Contagem de bactérias.....	54
4.3. Análise da comunidade bacteriana.....	56
5. CONCLUSÕES	64
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8. FIGURAS	78
9. TABELAS	97

LISTA DE SÍMBOLOS

ALFA	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias da subclasse alfa da classe <i>Proteobacteria</i>
BETA	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias da subclasse beta da classe <i>Proteobacteria</i>
β	- coeficiente de Bunsen, definido como volume de gás (CNTP) absorvido por unidade de volume de solução, quando a pressão total e a fugacidade são iguais a 1 atm.
C ₂ H ₂	- gás acetileno
CF	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias do grupo <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> do filo CFB
CFB	- filo Cytophaga-flavobacter-bacteroides
COD	- carbono orgânico dissolvido, mg.l ⁻¹
COT	- carbono orgânico total, mg.l ⁻¹
DELTA	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias da subclasse delta da classe <i>Proteobacteria</i>
EUB338	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias do domínio <i>Bacteria</i>
GAMA	- oligonucleotídeo complementar ao rRNA das bactérias da subclasse gamada classe <i>Proteobacteria</i>
HCl	- ácido clorídrico

He	- gás hélio
Ko	- constante de equilíbrio do N_2O , determinado de acordo com a temperatura da solução durante a determinação
N_2	- gás nitrogênio
NH_4^+	- íon amônio
NO_2^-	- íon nitrito
NO_3^-	- íon nitrato
N_2O	- óxido nitroso
NO	- óxido nítrico
NON 338	- oligonucleotídeo utilizado como controle negativo (não complementar ao rRNA bacteriano)
O_2	- oxigênio
PO_4^{3-}	- íon fosfato
SO_4^{2-}	- íon sulfato
μM	- micromolar (micromol por litro)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNTP	- condições normais de temperatura e pressão (273 K e 1 atm)
DAPI	- 4',6-diamidino-2phenilindol (corante fluorescente específico ao DNA)
DP	- desvio padrão
ECD	- detetor de captura de elétrons (para cromatógrafo a gás)
EDTA	- ácido etilenodiamino tetracético
FISH	- fluorescent <i>in situ</i> hybridization = hibridização fluorescente <i>in situ</i>
GL	- grau de liberdade
ILEC	- International Lake Environment Committee
IPCC	- Intergovernmental panel on climate change
MPN	- Most probable number; número mais provável (método de contagem de bactérias)
mRNA	- RNA mensageiro
NIRA	- National Institute for Research Advancement
OD	- oxigênio dissolvido, mg.l ⁻¹
PBS	- phosphate saline buffer; tampão salino de fosfato
PCR	- Polymerase Chain Reaction

- RDP - Ribosomal Database Project: banco de dados da Universidade de Illinois contendo informações sobre espécies válidas de bactérias descritas, inclusive seqüências de moléculas de rRNA.
- rRNA - RNA ribossômico
- SDS - sodium dodecyl sulfate
- TRITC - tetrametilrodamina (corante fluorescente)

RESUMO

ABE, D. S. *Desnitrificação e caracterização filogenética de bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímnio do Lago Kizaki, Japão*. São Carlos, 1998. 102 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A atividade desnitrificante das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas foram medidas no hipolímnio do lago Kizaki, Japão, no período entre agosto e dezembro de 1996. Examinou-se também a estrutura da comunidade bacteriana pela técnica de hibridização "in situ", utilizando-se oligonucleotídeos fluorescentes específicos ao RNA ribossômico do domínio *Bacteria*, das subclasses alfa, beta, gama e delta da Classe *Proteobacteria*, e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. Entre agosto e setembro, as bactérias aderidas às partículas, presentes em grande proporção na parte mais profunda do hipolímnio, apresentaram maior atividade desnitrificante nesse local (0.360 a 0.788 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$), contribuindo em 74 a 93 % da atividade total. De outubro a novembro, as bactérias de vida livre passaram a apresentar maior atividade desnitrificante na camada intermediária do hipolímnio, contribuindo em 40 a 95 % da atividade desnitrificante total. A análise da comunidade bacteriana revelou distinta proporção dos grupos constituintes, sendo as bactérias aderidas às partículas compostas principalmente pelas subclasses alfa e beta *Proteobacteria*, bem como do grupo *Cytophaga/Flavobacterium*, e as bactérias de vida livre foram bem dominadas pela subclasse beta *Proteobacteria* e bactérias não caracterizadas. As amostras que apresentaram alta atividade desnitrificante foram dominadas pela subclasse beta *Proteobacteria*, cujo resultado sugere que as bactérias desnitrificantes eram compostas principalmente por espécies pertencentes a esta subclasse.

Palavras-chave: desnitrificação; óxido nítrico; hipolímnio; rRNA, hibridização *in situ*.

50 raduzin

ABSTRACT

ABE, D. S. *Denitrification and community analysis of free-living and attached bacteria in the hypolimnion of Lake Kizaki, Japan*. São Carlos, 1998. 102p. Ph.D. thesis. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Denitrification by both free-living bacteria and those attached to particles was examined in the hypolimnion of Lake Kizaki, Japan, between August and December, 1996. Bacterial community structure was also examined with in situ hybridization using fluorescent oligonucleotide probes specific to the rRNA of the domain Bacteria, the subclasses alpha, beta, gamma and delta subclasses of the Class Proteobacteria, and for the Cytophaga-Flavobacterium group. From August to September, attached bacterial abundance and activity was proportionally higher than free-living bacteria below 24 m depth (0.360 to 0.788 $\mu\text{M.l}^{-1}.\text{day}^{-1}$), represented by 74 to 93 % of total activity. However, from October to November, free-living bacteria became the predominant denitrifiers, contributing from 40 to 95 % of total denitrification in the above layer between 22 and 24 m. Attached bacteria usually were composed by alpha and beta Proteobacteria and by Cytophaga-Flavobacterium group, while free-living bacteria were well dominated by beta Proteobacteria and non-characterized Bacteria. The samples which have shown high denitrification activity were dominated by beta Proteobacteria, suggesting that denitrifying bacteria were represented mainly by species of this group.

Keywords: denitrification; nitrous oxide; hypolimnion; rRNA; in situ hybridization.

1

INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O presente estudo foi realizado entre abril de 1995 a março de 1997 no Japão, sob a co-orientação do Professor Kenji Kato da Universidade de Shinshu. A escolha de seu laboratório para a realização deste estudo tem razões históricas, fruto de um trabalho cooperativo na área de limnologia entre pesquisadores brasileiros e japoneses, que se iniciou em 1974 com a primeira visita do Professor N. Nakamoto da Universidade de Shinshu ao Brasil. A partir dessa data, formou-se um laço cooperativo ainda mais forte, com a visita de outros pesquisadores japoneses ao Brasil, a citar: Tetsuo Sunaga em 1977, Professor Y. Saijo em 1979, Prof. Isao Ikusima em 1981, Prof. H. Fukuhara em 1982, entre outros. Da mesma forma, vários pesquisadores brasileiros visitaram o Japão, a citar: Professor José Galizia Tundisi em 1978, 1979, 1980 e 1982; Profa Takako Matsumura-Tundisi em

1978 e 1980; Prof. Kozo Hino em 1980 e 1982; Prof. Raul Henry em 1982; Profa Odete Rocha em 1990, entre outros. Um dos resultados deste trabalho cooperativo internacional foi a realização do projeto para estudo dos lagos do Vale do Rio Doce, cujos dados estão compilados no livro recentemente editado por TUNDISI & SAIJO (1997).

Em 1994 o Professor J. G. Tundisi, então diretor do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA) da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, convidou o Prof. Kenji Kato da Universidade de Shinshu a vir ao Brasil para colaborar para o estabelecimento de um laboratório de microbiologia no CRHEA. O Professor Kato realizou assim, sua primeira visita ao Brasil em julho de 1994, ensinando técnicas e ministrando palestras nesta instituição. Neste período, eu era então aluno de doutorado recém ingresso no programa de Ciências da Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos, sob a orientação do Professor Tundisi, e estávamos interessados desenvolver estudos sobre bactérias da desnitrificação. Para dar continuidade à aprendizagem com o Professor Kato, realizei minha viagem ao Japão com uma bolsa de estudos financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), em convênio com o Ministério da Ciência, Educação e Cultura do Japão (Monbusho), na modalidade de doutorado especial no exterior (bolsa "sandwich") por um período de 2 anos. Neste período, realizou-se o projeto no laboratório do Professor Kato para o estudo da desnitrificação e

das comunidades microbianas do Lago Kizaki, do qual este trabalho faz parte.

1.2. Bases Científicas

A desnitrificação, segundo KUENEN & ROBERTSON (1987), refere-se à redução de NO_3^- via NO_2^- e N_2O a N_2 , realizado por bactérias que utilizam esta via como uma alternativa respiratória ao uso do oxigênio, quando este se torna limitante. O processo é conduzido por bactérias aeróbias que, em condições normais de disponibilidade de oxigênio dissolvido, oxidam a matéria orgânica com a concomitante redução de oxigênio, mas com o esgotamento deste, a presença de nitrato no meio induz a formação das enzimas da respiração do nitrato, através de um desvio metabólico a nível da cadeia de transporte de elétrons (WHITAKER, 1993), resultando na obtenção de energia e produção de ATP.

A representação linear do processo em uma série de reações foi inicialmente apresentada por MATSUBARA & MORI (1968), tendo o NO e N_2O como precursores para a formação de N_2 a partir de NO_2^- , sendo posteriormente apresentada por PAYNE (1973) com a inclusão de NO_3^- a ser reduzido a NO_2^- no passo inicial da desnitrificação:



Até a década passada, a formação de NO como produto intermediário da desnitrificação era tida como questionável. Porém, inúmeros trabalhos realizados principalmente nesta década evidenciaram claramente que, pelo menos para a grande maioria das bactérias desnitrificantes, a redução de NO_2^- ocorre em duas etapas enzimáticas, sendo o NO um produto intermediário obrigatório. Esses estudos referentes ao NO foram revistos por YE et al. (1994).

A desnitrificação em sistemas aquáticos promove importantes transformações no ciclo biogeoquímico, atuando tanto na remoção do excesso de nitrogênio como de carbono introduzido ao sistema, sendo assim, um controlador da eutrofização em sistemas aquáticos. Os gases NO e N_2O produzidos no processo podem escapar para a atmosfera, envolvendo-se em reações que incluem redução da camada de ozônio e efeito estufa (YUNG et al. 1976; DAVIDSON, 1990), que podem estar causando alterações na climatologia global. De fato, sabe-se que a concentração de N_2O na atmosfera tem aumentado nas últimas décadas

em 0,25 % por ano (IPCC¹, apud MENGIS 1996), o que tem resultado em uma intensificação dos estudos relacionados à emissão desse gás.

Existem inúmeros trabalhos publicados abordando os processos de desnitrificação em diversos ambientes aquáticos, porém, mais sob um aspecto geoquímico, e estudos realizados sob um aspecto microbiológico são escassos. A abordagem microbiológica em ambientes naturais pode oferecer informações suplementares, considerando-se que bactérias que possuem diferentes vias metabólicas para assimilação de carbono ou diferentes tolerâncias às variáveis ambientais, como por exemplo, à concentração de oxigênio, podem possuir diferentes habilidades para desnitrificar (WARD 1996). Portanto, torna-se necessário o estudo dos processos geoquímicos em si em conjunto com informações sobre as características microbiológicas envolvidas nesses processos. As informações da microbiologia da desnitrificação podem ser extremamente úteis, por exemplo, na biomanipulação de ambientes impactados pelo excesso de nitrogênio. O emprego de espécies ou linhagens de bactérias isoladas de amostras do próprio sistema para biomanipulação promove, possivelmente, resultados mais positivos e de menor impacto, se comparado ao emprego de espécies exóticas.

¹IPCC (Intergovernmental panel on climate change).(1990). Climate change 1990 - the science of climate change - contribution of working group I to the second assessment report of the intergovernmental panel on climate change, Cambridge apud MENGIS, M. (1996). Nitrogen elimination *in* lakes by N₂ and N₂O emission. Tese (Doutorado) - Swiss Federal Institute of Technology Zürich.

Uma abordagem funcional normalmente utilizada para a caracterização da comunidade microbiana em ambientes aquáticos baseia-se na forma de ocorrência das bactérias, ou seja, de vida livre e aderidas às partículas em suspensão. Apesar de coexistirem no mesmo corpo de água, as bactérias aderidas às partículas vivem em um ambiente distinto do meio aquático, sendo muitas vezes favorecidas pela presença de matéria orgânica, nutrientes que a elas se adsorvem, e mesmo microambientes anóxicos oferecidos pelas partículas às quais elas colonizam. As bactérias aderidas às partículas são normalmente maiores em tamanho e em concentração local (CARON et al. 1982), e descritas como metabolicamente mais ativas quando comparadas às bactérias de vida livre (KIRCHMAN & MITCHELL 1982; PAERL & MERKEL 1982; SIMON 1987). Um aspecto importante com relação às partículas é o afundamento destas na coluna de água, que tendem a depositar-se rapidamente ao fundo. Durante a fase inicial da formação da camada anóxica que se inicia no fundo do lago, as bactérias desnitrificantes aderidas às partículas podem ser favorecidas nessas condições, desde que haja nitrato e nitrito em quantidades suficientes para a sua atividade. Porém, a permanência prolongada da camada anóxica é seguida pelo esgotamento de nitrato e nitrito, e também pelo desenvolvimento de outras formas de bactérias que dependem de condições de baixo potencial de óxido-redução, como por exemplo, as bactérias redutoras de sulfato e bactérias metanogênicas. Nessas

condições, o afundamento das partículas torna-se desfavorável às bactérias desnitrificantes aderidas. As bactérias de vida livre, por outro lado, não são afetadas pela sedimentação (JASSBY, 1975) devido ao pequeno tamanho da sua grande maioria. Elas representam a fração predominante em termos de número total de células (KIRCHMAN & MITCHELL 1982; SIMON *et al.* 1990), bem como pela grande proporção da produtividade bacteriana em ambientes aquáticos (AZAM & FUHRMAN 1984). O pequeno tamanho das bactérias de vida livre as tornam adaptadas às condições "diluídas", ou seja, possuem maior afinidade às condições de baixa concentração de nutrientes em função da alta razão superfície-volume (KATO, 1996). Levando-se em consideração esses aspectos, investigou-se neste projeto, a possibilidade de que as bactérias de vida livre atuem de forma significativa na desnitrificação no hipolímnio, informação esta inexistente na literatura até o momento.

A maioria dos trabalhos existentes sobre desnitrificação com abordagem microbiológica foi realizada utilizando-se espécies individuais cultivadas em meios enriquecidos, cujas taxas foram posteriormente extrapoladas ao ambiente natural. Os meios de cultura desenvolvidos pioneiramente por Robert Koch e por Joseph Lister no século passado foram de extrema importância para o desenvolvimento da microbiologia, sobretudo para a prevenção de doenças infecciosas e posteriormente para estudos ambientais. Porém, com o advento das técnicas de contagem direta de bactérias, descobriu-se que o uso de meios de cultura

enriquecidos destinados a estudos em ambientes aquáticos torna-se problemático, visto que pouquíssimas espécies de bactérias são capazes de formar colônias, e essas espécies nem sempre são representativas ao ambiente natural. FERGUSON et al. (1984), KOGURE et al. (1979), e KOGURE et al. (1980) estimaram que menos de 0,1 % das bactérias do ambiente marinho são cultiváveis em meios enriquecidos convencionais. O avanço das técnicas de biologia molecular para estudos taxonômicos tem proporcionado novas perspectivas para a caracterização da comunidade microbiana em ambientes naturais. A análise comparativa de seqüências de RNA ribossômico (rRNA) bacteriano, realizada inicialmente por WOESE (1987), além de ter possibilitado a reconstrução das árvores filogenéticas universais, possibilitou a elaboração de novas técnicas para identificação de bactérias de uma forma independente ao uso de cultivos. Segundo AMANN (1995), as moléculas de rRNA possuem algumas características que as tornam propícias para serem utilizadas como ferramentas ao estudo taxonômico: a) são moléculas presentes em todos os organismos vivos; b) as estruturas primárias das moléculas 16S e 23S são compostas por regiões com seqüências de alta e baixa conservação evolucionária, ou seja, algumas porções das moléculas possuem seqüências que mantiveram-se inalteradas durante todo o processo evolutivo, e em outras porções as seqüências sofreram muitas alterações, possibilitando assim, a distinção dos organismos desde o nível de reino até o nível de subespécie; c) estão presentes naturalmente em grande número por célula

(normalmente acima de 10.000 cópias), facilitando a sensibilidade de detecção dessas moléculas; d) as seqüências de rRNA 16S e 23S já foram determinadas para 50 % das espécies válidas de bactérias descritas (em torno de 3500 espécies), que estão disponíveis em bancos de dados acessíveis à comunidade científica, sendo o mais conhecido desses, o RDP (Ribosomal Database Project) da Universidade de Illinois (LARSEN et al. 1993).

Levando-se em consideração essas características, DELONG et al. (1989) desenvolveram uma técnica em que moléculas de rRNA de células bacterianas intactas fixadas com formaldeído são hibridizadas a oligonucleotídeos fluorescentes com seqüências de base complementares a estas. Os oligonucleotídeos, que são seqüências curtas de DNA contendo de 17 a 34 bases nitrogenadas, são sintetizados quimicamente e, posteriormente, ligados a um fluorocromo. Devido ao pequeno tamanho dos oligonucleotídeos fluorescentes, estes permeiam pela parede celular da bactéria a que se deseja marcar e, sendo complementares às seqüências de base das moléculas de rRNA espalhados aos milhares no citoplasma, sofrem hibridização, marcando-as. As células hibridizadas são posteriormente visualizadas ao microscópio de epifluorescência e, conseqüentemente, distinguidas das demais células não hibridizadas. A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), como é designada, foi empregada com sucesso para a caracterização de alguns grupos funcionais de bactérias, como nitrificantes (MOBARRY et al. 1996; SCHRAMM et al.

1996), bem como para bactérias redutoras de sulfato (AMANN et al. 1992; RAMSING et al. 1996). O fato desses grupos funcionais serem constituídos por um número relativamente reduzido de gêneros “próximos” genealogicamente possibilitou uma ampla caracterização, a partir da utilização de um número reduzido de oligonucleotídeos. Porém, a técnica FISH tem sido pouco utilizada para a caracterização das bactérias desnitrificantes, principalmente por estas serem um grupo polifilético, que inclui bactérias gram-negativas e gram-positivas, formadoras e não formadoras de esporos, fototróficas, heterotróficas e autótrofas, conforme descritas por INGRAHAM (1981), o que torna o agrupamento das bactérias desnitrificantes uma tarefa muito difícil. Nesses casos envolvendo grupos mais complexos, as informações sobre grupos taxonômicos intermediários, como classe, subclasse, ordem e família, possibilitam uma caracterização preliminar da comunidade microbiana, cujas informações podem ser úteis posteriormente para uma rápida classificação e identificação mais detalhada dos microorganismos (MANZ et al. 1992). O uso de oligonucleotídeos específicos a grupos taxonômicos intermediários tem provado um eficiente método capaz de distinguir comunidades distintas de bactérias em sistemas naturais, como demonstrado por DELONG et al. (1993) em ambiente marinho, por WEISS et al. (1996) em partículas orgânicas agregadas de sistema lacustre, e por ALFREIDER et al. (1996) em um lago de alta montanha. Seguindo esta

linha, adotou-se no presente trabalho, o método de hibridização fluorescente *in situ* para a caracterização de grupos taxonômicos intermediários da comunidade bacteriana do hipolímnio do Lago Kizaki, grupos estes pertencentes aos membros do domínio *Bacteria* (subclasses alfa, beta, gama e delta da Classe *Proteobacteria*, e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*), tanto para bactérias aderidas às partículas como para bactérias de vida livre.

1.3. Objetivos

- Comparar a atividade desnitrificante entre bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas em diferentes camadas do hipolímnio e em diferentes épocas do ano.
- verificar a influência das variáveis ambientais sobre a atividade desnitrificante das formas de vida bacterianas estudadas.
- caracterizar filogeneticamente as bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas ao nível de grupos taxonômicos intermediários, com o intuito de se verificar a ocorrência de variação filogenética ao longo do tempo e nas diferentes profundidades do hipolímnio, e visando correlacionar o grupo predominante com a atividade desnitrificante.

2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de estudo: Lago Kizaki

O lago Kizaki está localizado na Província de Nagano (Lat. 36°33'N - Long. 137°50'E), ao sopé dos Alpes Japoneses Setentrionais, a uma altitude de 764 m na chamada Fossa Magna, que atravessa a porção central da ilha de Honshu, a principal do arquipélago japonês (Figura 1). É um lago dimítico e mesotrófico, de origem tectônica e com idade aproximada de 30 mil anos. Suas dimensões são relativamente pequenas (Figura 4), com área superficial é de 1,4 km², 7 km de comprimento e volume de 25 milhões de metros cúbicos. Sua profundidade máxima é de 29,5 m na porção central do lago e profundidade média de 17,9 m (Fig. 3), sendo alimentado pelo rio Nougou e com tempo de residência de 0,5 ano. Faz parte do chamado "Três Lagos Nishina", juntamente com os lagos Aoki e Nakatsuna, situados a montante do Lago Kizaki (Figura 2). Apresenta-se termicamente estratificado de maio a novembro, e a camada

anóxica se desenvolve de agosto até o início de dezembro, quando ocorre a mistura vertical da coluna de água ("overturn") causada pelo resfriamento das águas superficiais com a chegada do inverno. A superfície do lago permanece congelada de janeiro a março. Os dados mensais de temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, nitrogênio total, fósforo total e carbono orgânico dissolvido estão apresentados na tabela 1, e os dados mensais de concentração de clorofila na coluna de água do Lago Kizaki estão apresentados na tabela 2.

O clima da região é temperado, com temperatura média anual de 8,8 °C. A precipitação média anual é de 1953 mm, sendo junho o período mais chuvoso, com média mensal de 218 mm, resultante das monções de verão. Os dados de temperatura atmosférica e precipitação anuais estão apresentados na tabela 3.

Sua bacia hidrográfica abrange uma área de 23,85 km², sendo 84% ocupada por vegetação arbórea (floresta decídua, floresta de coníferas "evergreen") e vegetação herbácea (gramíneas e comunidades de plantas alpinas), 5,1 % ocupada pela agricultura (principalmente cultivo de arroz), e 2,9 % por ocupação urbana. As principais utilidades do lago são a pesca, o turismo e a recreação (natação, pesca esportiva e iatismo).

As principais fontes de fósforo e nitrogênio totais estão apresentados na tabela 4.

A flora lacustre é composta por macrófitas emergentes (*Nelumbo nucifera*, *Zizania latifolia*, *Eleocharis kurokuwai*, *Phragmites communis*), macrófitas flutuantes (*Nymphoides peltata*, *N. tetragona*, *Trapa japonica*), macrófitas submersas (*Ceratophyllum demersum*, *Hydrilla verticillata*, *Elodea nuttallii*). (ILEC 1993). O fitoplâncton é composto principalmente por *Anabaena* sp, *Fragilaria crotonensis*, *Melosira* sp. e *Peridinium bipes*. O zooplâncton é composto por *Conochilus* sp., *Cyclops vicinus*, *Alona quadrangularis*, *Colurella* sp, *Daphnia galeata*, o bentos por *Chironomus plumosus*, *Chaoborus* sp., *Tubifex* sp., *Tanytarsus* sp., e a ictiofauna por *Leuciscus hakonensis*, *Zacco platypus*, *Hypomessua transpacificus* e *Carassius* sp. (ILEC 1993).

Diversos estudos sobre desnitrificação foram realizados no Lago Kizaki, destacando-se os trabalhos de YOH et al. (1983), TERAJ et al. (1987), TERAJ (1987), YOH et al. (1988), YOH et al. (1990), YOH (1992) e TERAJ & YOH (1996). YOH (1992) verificou que o N₂O que se acumula no hipolímnio do Lago Kizaki apresenta grandes variações de ano para ano, causado possivelmente pelo balanço entre consumo e produção de N₂O realizado por bactérias desnitrificantes e à disponibilidade de matéria orgânica no hipolímnio.

Com relação às espécies de bactérias desnitrificantes do Lago Kizaki, TERAJ (1979) isolou 44 espécies estimadas pelo método de contagem pelo número mais provável (MPN) em meio Giltay. A grande

maioria das espécies isoladas foram classificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (34 espécies de 44) e algumas (4 espécies de 44) foram classificadas como pertencentes a *Alcaligenes-Achromobacter*.

Informações suplementares sobre o Lago Kizaki podem ser encontradas em ILEC (1993).

2.2. Amostragem

As amostras de água foram coletadas mensalmente no ponto de maior profundidade do lago (Figuras 3 e 5). Para os experimentos de desnitrificação e caracterização da comunidade bacteriana, coletaram-se amostras em 2 a 3 profundidades do hipolímnio, de acordo com a concentração de oxigênio dissolvido, e para a determinação das variáveis químicas, coletaram-se amostras em 5 profundidades do hipolímnio, no período de 22 de agosto a 13 de dezembro de 1996. O oxigênio dissolvido, o pH, a condutividade e a temperatura da água foram medidos diretamente ao longo da coluna de água de metro em metro, com o auxílio de um multisensor Horiba U-10 até 10 m de profundidade, e abaixo de 10 m, as amostras foram inicialmente coletadas com uma garrafa de Van Dorn e as variáveis físicas foram medidas com o mesmo sensor no interior da garrafa. A tomada das amostras destinadas aos experimentos de desnitrificação foi realizada com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn

de 8 litros de capacidade e transferidas cuidadosamente com um tubo de latex para frascos esterilizados de borossilicato de 1 litro de capacidade com tampas esmerilhadas, evitando-se a formação de bolhas e perturbações drásticas das condições ambientais das amostras, sobretudo na concentração de oxigênio dissolvido. As amostras foram posteriormente transportadas para o laboratório em caixas térmicas contendo gelo, onde foram processadas para a realização dos experimentos. A tomada de amostras para determinação das variáveis químicas foi realizada em 5 profundidades do hipolímnio, incluindo aquelas amostradas para a realização dos experimentos de desnitrificação.

2.3. Montagem dos experimentos de desnitrificação

Todo o manuseio das amostras destinadas aos experimentos de desnitrificação foi realizado em condições anóxicas, no interior de uma câmara inflável de polietileno I2R[®] contendo N₂ no seu interior, após várias lavagens com este gás. Uma parte das amostras foi transferida para frascos de incubação de vidro de 20 ml com o auxílio de tubos de silicone, sendo estas, consideradas como representativas da comunidade total. Outra parte da amostra foi passada por um filtro de policarbonato Nuclepore[®] de 1,0 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, utilizando-se um conjunto de filtração esterilizado (Sterifil, Millipore), aplicando-se baixa pressão positiva pela face superior do filtro com o auxílio de uma

bomba manual Nalgene® e, posteriormente, transferida para os frascos de incubação, sendo esta fração considerada como bactérias de vida livre, de acordo com FERGUSON & RUBLEE (1976), RIEMANN (1978) e KATO & SAKAMOTO (1981). Todos os frascos de incubação foram tampados com septos de borracha imediatamente após preenchidos com amostras de água e selados com tampas de rosca. A atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas foi estimada pela diferença entre a atividade da comunidade total e a atividade da fração menor do que 1 µm.

Para a determinação da atividade desnitrificante, utilizou-se a técnica do bloqueio pelo acetileno, de acordo com a metodologia de YOSHINARI et al. (1977) e SØRENSEN (1978). Esta metodologia baseia-se na propriedade do gás acetileno (C₂H₂) em inibir a óxido nitroso redutase, enzima esta que catalisa a redução do N₂O a N₂. Em uma amostra contendo bactérias desnitrificantes ativas, a inibição causada pelo C₂H₂ resulta no acúmulo de N₂O, que posteriormente é quantificado. A técnica do bloqueio pelo C₂H₂ possui algumas vantagens, como por exemplo, a facilidade com que se pode medir o N₂O com alta sensibilidade utilizando-se um cromatógrafo a gás dotado de um detetor de captura de elétrons, bem como a possibilidade de se medir a atividade em amostras contendo concentrações de NO₃⁻ *in situ*, ou seja, sem a necessidade de enriquecimento com este íon. Porém, a técnica é falha em alguns casos, como na presença de sulfeto (CHALAMET 1985; TAM & KNOWLES 1979). O C₂H₂ possui ainda a propriedade de inibir a nitrificação (HYNES

& KNOWLES 1978; WALTER et al. 1979), impossibilitando a regeneração de NO_3^- e NO_2^- às bactérias desnitrificantes. O uso de técnicas baseadas no ^{15}N tornou-se muito popular nesta década, por possuir a vantagem da não necessidade do uso de inibidores, e os processos de nitrificação, desnitrificação e redução de NH_4^+ podem ser investigados em um único experimento. Porém, os métodos de detecção de ^{15}N possuem baixa sensibilidade, o que torna necessário longos períodos de incubação (entre 24 a 48 h) e enriquecimento com altas concentrações de $^{15}\text{NO}_3^-$, causando um distúrbio no regime de nitrogênio da amostra (SLATER & CAPONE 1989). Levando-se em consideração as vantagens da análise de N_2O por cromatografia a gás, e o fato de que a maioria dos dados existentes na literatura foram obtidos pelo método do bloqueio pelo C_2H_2 , adotou-se esta metodologia no presente trabalho.

Injetou-se em cada frasco de incubação, uma solução saturada de C_2H_2 (5 % v/v, concentração final). A solução saturada de C_2H_2 foi produzida filtrando-se água deionizada em filtros Nuclepore® de 0,1 μm de porosidade e borbulhando-a com gás C_2H_2 por um período de 15 minutos.

As amostras foram incubadas em duplicata no escuro a temperatura *in situ* (7 ± 1 °C), por um período de 6 e 12 horas. Uma parte das amostras foi imediatamente fixada com formaldeído (2% v/v, concentração final), para a determinação da concentração inicial de N_2O , e

o restante das amostras teve a atividade desnitrificante interrompida com a adição de formaldeído na mesma concentração final após o período de incubação.

2.4. Análise de N₂O

A preparação das amostras para análise de N₂O foi realizada empregando-se a metodologia de YOH et al. (1990), conforme ilustra a figura 6. Tomou-se uma alíquota de 5 ml da amostra contida no frasco de incubação com o auxílio de uma seringa de vidro graduada de 5 ml dotada de uma agulha com poro lateral, injetando-a, em seguida, no interior de uma outra seringa de vidro graduada de 10 ml de capacidade, isolada do meio externo por um septo de silicone (seringa de equilíbrio), após duas lavagens com a própria amostra para a remoção de bolhas. Com o auxílio de uma outra seringa de vidro de 5 ml, injetou-se 5 ml de He na seringa de equilíbrio e agitou-se vigorosamente por duas vezes em um intervalo de 5 minutos. A seringa de equilíbrio foi mantida mergulhada em uma cuba contendo água a temperatura ambiente durante 10 minutos para evitar oscilações bruscas de temperatura, e para que o N₂O contido na amostra de água entrasse em estado de equilíbrio entre a fase líquida (amostra de água) e a fase gasosa ("headspace") no interior da

seringa. A temperatura da cuba foi monitorada com um termômetro de mercúrio durante todo o período de análise. Com o auxílio de uma seringa específica para cromatografia a gás (Precision Sampling Corp.), tomou-se uma sub-amostra do "headspace" da seringa de equilíbrio para a análise cromatográfica. O N₂O contido no "headspace" foi medido com o auxílio de um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14B, equipado com um detetor de captura de elétrons (ECD), tendo o N₂ como gás de arraste. A calibração do detetor foi realizada empregando-se um padrão de N₂O 99,9 % (Nagoya Kosan Co., Ltd) diluído em He, a uma concentração final de aproximadamente 5 µl.l⁻¹ (5 ppb). Após a determinação direta da concentração de N₂O do "headspace", calculou-se a concentração de N₂O contido na fase líquida da seringa de equilíbrio, utilizando-se a equação da constante de equilíbrio de WEISS & PRICE (1980) para a determinação do coeficiente de Bunsen (β):

$$K_o = \beta / V^+$$

onde: β = coeficiente de Bunsen, definido como volume de gás (CNTP) absorvido por unidade de volume de solução, quando a pressão total e a fugacidade são iguais a 1 atm (WEISS 1974).

V⁺ = volume de um mol do gás real puro em condições padrões (CNTP), que equivale a 22,4 litros.

K_o = constante de equilíbrio do N₂O, determinado de acordo com a temperatura da solução durante a determinação e as constantes A₁, A₂ e

A₃, determinados experimentalmente por WEISS & PRICE (1980) para água doce:

$\ln K_o = A_1 + A_2 (100/T) + A_3 \ln (T/100)$, onde:

A₁ = -62,7062; A₂ = 97,3066; e A₃ = 24,1406

T = temperatura da água (°C)

Determinado o coeficiente de Bunsen β , calculou-se o volume de N₂O contido em 5 ml da fase líquida:

Vol. N₂O na fase líquida = Vol. N₂O contido em 5 ml do headspace x β

Com a determinação do volume de N₂O na fase líquida, pôde-se determinar a concentração de N₂O no frasco de incubação, a partir da somatória da concentração de N₂O na fase gasosa com a concentração de N₂O na fase líquida, que corresponde ao volume de N₂O contido originalmente em 5 ml de amostra:

$N_2O \text{ (ml)} = [N_2O \text{ na solução aquosa (ml)} + N_2O \text{ no "headspace" (ml)}] \times$
 volume de amostra / 5 ml

onde volume de amostra = volume do frasco de incubação (ml) - volume de solução saturada de C₂H₂ - volume de formaldeído injetado

Assim, pôde-se determinar a concentração de N₂O contido em 1 litro de amostra de água em termos de moles, pela equação de estado para um gás ideal:

$$PV = nRT, \text{ ou } n = PV / RT$$

onde P é a pressão atmosférica (atm) no local da análise; V é o volume de N₂O dissolvido em 1 litro de amostra de água; T é a temperatura em Kelvin (K) no momento da análise; R é a constante universal dos gases, que equivale a 0,0821 l x atm x mol⁻¹ x K⁻¹ ; e n é o número de moles de N₂O correspondente.

2.5. Determinação da atividade desnitrificante

A atividade desnitrificante foi determinada pela diferença entre a concentração de N₂O acumulado na amostra antes e após o período de incubação, tomando-se a maior inclinação da curva de tempo-N₂O produzido que, na maioria das vezes, esteve nas primeiras 6 horas de incubação:

$$\text{Atividade desnitrificante } (\mu\text{M} \times \text{dia}^{-1}) = \frac{[\text{N}_2\text{O final } (\mu\text{M}) - \text{N}_2\text{O inicial } (\mu\text{M})]}{\text{tempo de incubação (dias)}}$$

2.6. Análises químicas

Alíquotas para determinação de nutrientes inorgânicos dissolvidos (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁻ e SO₄⁻), carbono orgânico total (COT) e carbono

orgânico dissolvido (COD) também foram tomadas e mantidas em frascos de 50 ml a -20°C , após serem filtradas em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F de 25 mm de diâmetro pré-calcinados a 450°C durante 1 hora.

O nitrato, nitrito e sulfato dissolvidos na água foram medidos com o auxílio de um cromatógrafo de íons Shimadzu PIA-1000. O fosfato dissolvido e a amônia foram medidos por espectrofotometria, de acordo com STRICKLAND E PARSONS (1972).

O COT e o COD foram determinados com o auxílio de um analisador de COT Shimadzu TOC-5000A.

2.7. Contagem de bactérias

Sub-amostras destinadas a contagem bacteriana foram diretamente coletadas em frascos de vidro esterilizados de 20 ml de capacidade para a quantificação da comunidade total, e uma outra sub-amostra foi filtrada em filtro de policarbonato Nuclepore[®] de $1,0\ \mu\text{m}$ de porosidade para determinação do número de bactérias de vida livre. As sub-amostras coletadas foram imediatamente fixadas a bordo com formaldeído neutralizado com hexametilenotetramina (2% v/v, concentração final), e mantidas no refrigerador a $4\ ^{\circ}\text{C}$ antes da contagem. A contagem direta bacteriana foi realizada utilizando-se laranja de acridina como corante

fluorescente pelo método de HOBBIÉ et al. (1977), e um microscópio de epifluorescência Olympus BH-2-RFCA. Antes da filtração, as sub-amostras da comunidade total foram sonicadas para desprender as células aderidas às partículas e facilitar sua quantificação. As bactérias de vida livre foram contadas separadamente, usando-se a sub-amostra contendo a fração menor do que 1,0 μm . Foram feitas 20 contagens de aproximadamente 100 células para cada sub-amostra, em sub-campos escolhidos aleatoriamente (magnificação de 1200 \times). Portanto, para cada sub-amostra, foram contadas aproximadamente 2000 células. As bactérias aderidas às partículas foram estimadas pela diferença entre o número de células da comunidade total e o número de células de vida livre.

2.8. Caracterização filogenética da comunidade microbiana

A caracterização filogenética das bactérias foi realizada pelo método da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), de acordo com AMANN (1995) com algumas modificações quanto a concentração e tratamento das células a serem hibridizadas, para os quais, empregou-se o método de ALFREIDER *et al.* (1996). Este método difere do método empregado por AMANN et al. (1995) por utilizar a filtração com filtros de policarbonato para concentração, lavagem e desidratação das células, ao invés do uso da centrifugação. Segundo o próprio AMANN (comunicação pessoal), o uso da centrifugação para concentrar células contidas em

amostras de águas lacustres é desaconselhável, visto que a existência de um número muito significativo de células bacterianas de pequeno tamanho nesses ambientes torna a precipitação incompleta no processo de centrifugação, havendo assim, uma grande perda de células. Segundo o autor, com o uso da filtração a perda de células se torna menor e, conseqüentemente, o método torna-se mais eficiente, apesar do maior trabalho.

2.8.1. Fixação das amostras

Amostras de água não filtrada contendo a comunidade total, bem como amostras filtradas em filtros Nuclepore® de 1,0 µm de porosidade, foram fixadas adicionando-se 3 partes de paraformaldeído 4 % em PBS (tampão salino de fosfato, pH 7,2) para uma parte de amostra, e mantida a 4 °C por um período inferior a 24 horas antes de serem concentradas e tratadas, de acordo com a técnica de AMANN et al. (1990).

2.8.2. Concentração e tratamento das células

As células fixadas foram imobilizadas sobre filtros Nuclepore® de 0,2 µm de porosidade e de 25 mm de diâmetro. Filtrou-se 20 ml da mistura (15 ml de paraformaldeído + 5 ml de amostra), e o fixativo foi removido após três lavagens com 2 ml de PBS (pH 7,2), constituído por 130 mM de cloreto de sódio, 10 mM de tampão de fosfato de sódio e o pH

ajustado com HCl 1,2 M. As células foram desidratadas após passagens sucessivas de 500 µl de etanol a 50, 80 e 99,5 % (3 minutos cada). Os filtros contendo células imobilizadas foram então retirados do equipamento de filtração, secados ao ar, cortados em secções de aproximadamente 5 mm² com o auxílio de uma tesoura de inox desinfetada com etanol 70 %, guardados no interior de porta-filtros esterilizados e mantidos a -20°C, antes de se realizar a hibridização.

2.8.3. Tratamento das lâminas de vidro

Lâminas de vidro de 2,5 cm por 7,5 cm foram lavadas após serem mergulhadas em solução de KOH 10% por uma hora, enxaguadas várias vezes com água destilada, secadas na estufa e, posteriormente, mergulhadas em uma solução de 0,2 % de gelatina e 0,01 % de sulfato crômio de potássio a 70 °C e secadas ao ar na posição vertical tornando-as hidrófobas, de acordo com a metodologia de STAHL & AMANN (1991). Este procedimento foi de fundamental importância para que as soluções utilizadas durante o processo de hibridização se mantivessem sobre a lâmina e evitando-se o escorrimento do tampão de hibridização sobre a lâmina e a secagem do filtro, o que teria comprometido o sucesso do método. Todos os reagentes utilizados foram da marca Wako, Japão.

2.8.4. *Hibridização* com oligonucleotídeos fluorescentes*

Secções de filtros contendo células já tratadas para a hibridização foram colocadas sobre uma lâmina de vidro hidrófoba, cobertas com 16 µl de tampão de hibridização pré-aquecido a 46 °C e 2 µl da solução de oligonucleotídeo fluorescente (50 ng.ml⁻¹). O tampão de hibridização era composto por 0,9 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 % de SDS (sodium dodecyl sulfate) e concentrações variadas de formamida, de acordo com o oligonucleotídeo utilizado (ver tabela 4). A hibridização foi realizada no interior de tubos de polipropileno de 50 ml de capacidade com tampa de rosca, contendo no seu interior, um pedaço de papel de filtro embebido com 2 ml de tampão de hibridização pré-aquecido a uma temperatura de 46 °C. O tubo de polipropileno funcionou como uma câmara úmida, que manteve a concentração do tampão de hibridização inalterada e evitando também o problema de secagem das células. Os tubos foram mantidos no interior de uma estufa elétrica a uma temperatura de 46 °C por um período de 90 minutos. A temperatura de 46 °C utilizada corresponde à chamada temperatura de dissociação, isto é, temperatura a qual a dupla hélice da molécula de rRNA se dissocia em duas cadeias monocatenárias. A dissociação é necessária para que o oligonucleotídeo fluorescente tenha acesso à porção da cadeia livre de

* O termo "hibridização utilizado neste trabalho não se refere ao cruzamento de espécies de bactérias, mas sim à marcação do rRNA bacteriano com oligonucleotídeo fluorescente complementar à uma porção da sua seqüência de bases.

rRNA com seqüência de bases complementar a sua cadeia. Porém, esta temperatura depende de outro fatores, como a composição de bases (CG ou AU) da seqüência a que se deseja hibridizar, do comprimento da cadeia, etc. Se a temperatura de dissociação for ultrapassada, passa a ocorrer a desnaturação da molécula de rRNA (STAHL & AMANN 1991). A função da formamida empregada na solução de hibridização foi de reduzir a temperatura de dissociação da molécula de rRNA, evitando-se assim, a sua desnaturação.

Os filtros foram posteriormente retirados cuidadosamente da lâmina e mergulhados em 20 ml de solução de lavagem pré-aquecidos a 48°C no interior de frascos de vidro individuais e mantidos à mesma temperatura por um período de 15 minutos, procedimento este necessário para se retirar do interior das células bacterianas, os oligonucleotídeos fluorescentes que não sofreram hibridização. A solução de lavagem continha 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM de EDTA, 0,01 % de SDS e concentrações de NaCl entre 225 mM e 80 mM, de acordo com a fórmula de LATHE (1985).

2.8.5. Oligonucleotídeos utilizados

Utilizou-se neste trabalho, oligonucleotídeos específicos ao rRNA dos seguintes grupos: Domínio *Bacteria*, subclasses alfa, beta, gama e delta da classe *Proteobacteria* (bactérias púrpuras), e grupo *Cytophaga-*

Flavobacterium. Escolheram-se os grupos acima citados porque eles compõem a maioria das bactérias gram-negativas do domínio *Bacteria* rotineiramente observada em ambientes aquáticos (WEISS et al. 1996). A composição e a ocorrência dos grupos a serem estudados estão descritos na tabela 5. As seqüências, os sítios de hibridização do rRNA e a especificidade dos oligonucleotídeos, bem como a concentração de formamida empregada em cada oligonucleotídeo estão apresentados na tabela 6.

O oligonucleotídeo EUB338, específico a uma região do rRNA das bactérias do domínio *Bacteria*, foi utilizado como controle positivo para a avaliação da eficiência da hibridização (AMANN et al. 1990). O oligonucleotídeo NON338, comprovadamente incapaz de hibridizar-se ao rRNA bacteriano (MANZ et al. 1992), foi utilizado como controle negativo, visando quantificar a porcentagem de hibridizações não-específicas e de células autofluorescentes. A hibridização não-específica refere-se à hibridização que ocorre entre um oligonucleotídeo e uma porção do rRNA bacteriano não complementar a este. Este problema ocorre em função do uso de temperaturas inadequadas, ou devido à secagem indevida do tampão de hibridização e das células durante o processo de hibridização.

Todos os oligonucleotídeos foram marcados com tetrametilrodamina (TRITC), um corante fluorescente que emite na faixa

do vermelho (570 nm), adquiridos pela firma japonesa Takara Biomedicals.

2.8.6. Preparação das lâminas para microscopia e determinação das proporções dos grupos

Após o período de lavagem com tampão a 48 °C, os filtros foram rapidamente lavados com um leve jato de água destilada, secados ao ar, alojados sobre lâminas limpas de vidro e corados com 2 µl de solução de 0.1 µg.ml⁻¹ de DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole) durante 5 minutos para a determinação total das bactérias. As lâminas foram montadas em um montante de glicerol/PBS (pH > 8.5) e visualizadas ao microscópio de epifluorescência Olympus BX-FLA, em conexão com uma câmera colorida 3CCD Hamamatsu C5810 e um analisador de imagem Olympus SP500F. Para cada campo microscópico aleatoriamente escolhido, duas imagens foram digitalizadas e congeladas pelo analisador de imagem, uma correspondente à excitação da TRITC, ou seja, referente às células hibridizadas, e outra correspondente à excitação do DAPI, correspondente o total de células. As duas imagens foram então sobrepostas pelo analisador no monitor de vídeo para confirmar que as partículas coradas com TRITC eram realmente células hibridizadas, de acordo com as células coradas com DAPI. As figuras 7 e 8 ilustram simplificadaamente a técnica de hibridização fluorescente *in situ* e a obtenção das imagens das células.

Para a contagem de bactérias aderidas às partículas, tomaram-se, aleatoriamente, partículas contidas nas amostras referentes à comunidade total, e contaram-se as bactérias aderidas às partículas, desconsiderando-se as bactérias de vida livre. A contagem de bactérias de vida livre foi realizada utilizando-se as amostras que já haviam sido previamente passadas por um filtro de 1,0 μm de porosidade. A contagem das células foi realizada sobre o monitor de vídeo, utilizando-se imagens já digitalizadas e salvas na memória do computador, possibilitando uma análise minuciosa e prolongada, sem a preocupação com o problema de descoloração que normalmente ocorre durante as contagens feitas diretamente na lâmina ao microscópio de epifluorescência. Foram contadas de 100 a 300 células coradas com os oligonucleotídeos fluorescentes para cada filtro hibridizado (magnificação de 1000 x) e, no caso dos grupos contendo número muito reduzido de células hibridizadas, contou-se o total de células contidas em 4 telas, correspondentes, cada uma, a um campo microscópio de aproximadamente 100 μm^2 . As porcentagens de ocorrência das células pertencentes aos grupos taxonômicos alfa, beta, gama, delta Proteobacteria e *Cytophaga-Flavobacterium* foram obtidos assumindo-se como 100 %, as células pertencentes ao domínio *Bacteria* e, posteriormente, subtraindo de cada grupo, inclusive *Bacteria*, a porcentagem de células detectadas pelo controle negativo (NON338). As células hibridizadas com

EUB338 serviram, portanto, como uma medida da eficiência de hibridização, bem como uma referência para a subsequente análise da comunidade bacteriana com os oligonucleotídeos de cada grupo, expressos em porcentagem de células detectadas em relação às células detectadas com EUB338 (% de *Bacteria*), da mesma forma como fora utilizada por ALFREIDER et al. (1996). O número absoluto de células de cada grupo foi obtido multiplicando-se a proporção de células destes em relação à contagem com DAPI pelo número de células obtido pela contagem direta com laranja de acridina, por esta ser mais direta e precisa em relação à contagem realizada com DAPI para as células que passaram por todo o tratamento de hibridização.

2.9. Análise estatística

Para se quantificar a influência das variáveis ambientais observadas sobre a atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas, bem como das bactérias de vida livre, foi realizada a análise de regressão múltipla passo a passo, de acordo com DRAPER e SMITH (1966), executadas com o emprego do pacote "Estatística for Windows", versão 4.2. Além da atividade desnitrificante das bactérias aderidas e bactérias de vida livre, o N_2O *in situ* foi considerado também como variável

dependente, por ser um produto da desnitrificação. As variáveis físicas, químicas e biológicas utilizadas na análise foram: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{--} , SO_4^- , COD, número de bactérias aderidas e número de bactérias de vida livre, atividade desnitrificante das bactérias aderidas e atividade desnitrificante das bactérias de vida livre.

3

RESULTADOS

3.1. Condições ambientais

As variações temporais da temperatura e do oxigênio dissolvido no hipolímnio do Lago Kizaki estão apresentadas na figura 9. A estratificação térmica esteve presente de agosto a novembro (Fig. 9A), e a camada anóxica surgiu a partir de 21 de setembro abaixo de 26 m de profundidade, desenvolvendo-se até os 22 m no final de novembro (Fig. 9B). Com o resfriamento das águas superficiais devido à aproximação do inverno, a camada anóxica voltou a restringir-se na camada inferior a 26 m de profundidade em 13 de dezembro. O pH no hipolímnio variou muito pouco no período observado, ficando entre 5,88 a 6,35 (Tabela 7). Apesar do pH ótimo para a desnitrificação situar-se na faixa entre 7,0 e 8,0 (WIJLER & DELWICHE 1954; NOMMIK 1956), sabe-se que o limite de tolerância de pH para a ocorrência do processo é bastante amplo, ficando entre 3,5 e 11,2 (PRAKASAN & LOEHR 1972), demonstrando que o

ambiente não esteve desfavorável em termos de pH para as bactérias desnitrificantes.

O desenvolvimento da camada anóxica foi acompanhado por uma nítida variação dos compostos dissolvidos no hipolímnio. O NO_3^- , NO_2^- e N_2O , que estiveram presentes em concentrações consideráveis entre 22 de agosto e 21 de setembro, sofreram esgotamento entre 19 de outubro e 13 de dezembro na camada abaixo de 24 m (Figuras 10 A, 10B e 10C, respectivamente), caracterizando o consumo desses compostos realizado pelas bactérias desnitrificantes. O SO_4^- também diminuiu visivelmente no mesmo local (Fig. 11B) a partir de outubro, sugerindo a ação de bactérias redutoras de sulfato. O íon NH_4^+ , que encontrava-se em baixas concentrações entre agosto e setembro (Fig. 11 A), acumulou-se no período entre outubro e dezembro nas profundidades abaixo de 24 m. Por outro lado, houve também neste período um acúmulo de NO_2^- e N_2O *in situ* nas profundidades entre 22 e 24 m, onde as concentrações de oxigênio dissolvido estiveram próximas a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Em 13 de dezembro o NO_2^- e N_2O esgotaram-se em todo o hipolímnio (Figuras 10B e 10C).

O íon fosfato variou muito pouco no período estudado, ficando sempre entre $0,22$ e $1,03 \mu\text{M}$ (Tabela 7).

3.2. Atividade desnitrificante

A variação temporal da atividade desnitrificante no hipolímnio do Lago Kizaki está ilustrada na figura 12, e os valores da atividade estão apresentados na tabela 7.

O valor máximo da atividade desnitrificante foi observado no dia 22 de agosto a 26 m de profundidade, correspondente a $0,844 \mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$. Entre 22 de agosto e 21 de setembro, as atividades máximas limitaram-se na parte mais profunda do hipolímnio (abaixo de 24 m de profundidade). Neste dia, as bactérias aderidas às partículas foram as que mais contribuíram para a atividade desnitrificante, responsáveis por 74 a 97 % da atividade da comunidade total (Tabela 7). Porém, com o esgotamento de NO_3^- e NO_2^- no período entre agosto e dezembro, a atividade desnitrificante diminuiu consideravelmente nessa camada. Nesse período, por outro lado, a camada deficiente em oxigênio passou a ocupar também profundidades superiores do hipolímnio (Figura 9 B), e as máximas atividades desnitrificantes passaram a ocorrer entre 22 e 24 m de profundidade, onde ainda havia NO_3^- e NO_2^- em disponibilidade (Figuras 10 A e 10B). Neste local, as bactérias de vida livre foram as que mais contribuíram para a atividade desnitrificante, sendo responsáveis por 33 a 95 % da atividade total. Em dezembro houve a diminuição da atividade desnitrificante, tanto das bactérias aderidas como de vida livre, em razão da retração da camada deficiente em oxigênio causada pela

desestratificação térmica, bem como pelo esgotamento de NO_3^- e de NO_2^- no hipolímnio.

Portanto, a atividade desnitrificante no hipolímnio do Lago Kizaki foi caracterizada por dois padrões distintos de distribuição ao longo do tempo. De 22 de agosto a 21 de setembro, a atividade máxima manteve-se abaixo de 24 m, atribuída principalmente às bactérias aderidas às partículas (Figura 12 B). De 19 de outubro a 22 de novembro, por outro lado, a atividade máxima manteve-se entre 22 e 24 m de profundidade, atribuída principalmente às bactérias de vida livre (Figura 12C).

Os padrões de variação da atividade desnitrificante observados neste trabalho (Figura 12) assemelham-se muito aos padrões de variação de NO_2^- e de N_2O (Figura 10B e 10 C, respectivamente), ou seja, nas camadas as quais observaram-se as máximas atividades, houve também um acúmulo de NO_2^- e N_2O , sugerindo uma forte relação entre essas variáveis. Esta relação foi realmente observada pela análise de regressão múltipla passo a passo, que está descrita em um item à parte (3.5.) neste capítulo.

3.3. Contagem de bactérias

A figura 15 mostra a ocorrência das bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre em cada um dos dias estudados.

O número total de bactérias no hipolímnio variou de $3,04 \times 10^6$ a $1,21 \times 10^7$ células.ml⁻¹ durante o período estudado, e os mais altos valores foram observados abaixo de 25 m de profundidade, sempre superiores a 10^7 células.ml⁻¹ (Tabela 7). As bactérias de vida livre dominaram em número durante todo o período estudado ($1,65$ a $8,03$ células $\times 10^6$.ml⁻¹), representadas por 54 a 95 % do total de células. Uma exceção foi observada em agosto, quando as bactérias aderidas às partículas dominaram a 26 m de profundidade, representadas por 71 % do número total de células contadas. A dominância das bactérias aderidas às partículas a 26 m em agosto, bem como o número muito significativo destas observado em setembro ($1,30$ a $3,97 \times 10^6$ células.ml⁻¹), coincide com a alta atividade desnitrificante desta fração observada nesse mesmo período (Tabela 7), sugerindo uma forte relação entre essas variáveis.

3.4. Análise da comunidade microbiana

Nas figuras 20 e 21 estão ilustradas algumas das imagens obtidas pela técnica de hibridização *in situ*, mostrando as células hibridizadas coradas com TRITC, e a imagem referente ao mesmo campo microscópico mostrando as células coradas com DAPI.

Na tabela 8 estão apresentadas as porcentagens de eficiência de hibridização do controle positivo (EUB338) e as porcentagens de hibridizações não-específicas ocorridas com o controle negativo (NON338). Entre 41 a 57 % das bactérias aderidas às partículas (média: 49,1 %) e entre 20 e 69% (média: 47,0 %) das bactérias de vida livre coradas com DAPI foram detectadas com o oligonucleotídeo EUB338. Segundo AMANN (comunicação pessoal), a eficiência de hibridização em bactérias de ambientes lacustres é em torno de 20 %, devido ao pequeno número de cópias de rRNA que as células bacterianas presentes nesses ambientes normalmente possuem. RAMSING et al. (1996) obteve valores de eficiência de hibridização correspondente a 50 % para bactérias coletadas em um fiorde da Dinamarca, com a ajuda de um analisador de imagens para a contagem de células hibridizadas, e ALFREIDER et al. (1996) obtiveram valores em torno de 64 % para bactérias de um lago de alta montanha da Áustria, com a utilização de um marcador fluorescente de maior potência (CY-3). Portanto, os valores de eficiência de hibridização obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles normalmente obtidos em ambientes aquáticos.

O controle negativo (NON338) hibridizou-se com uma porcentagem muito pequena de células coradas com DAPI (de 1,1 a 3,3 %, média de 1,7 % para bactérias aderidas às partículas, e entre 0,0 a 1,2 %, média de 1,3 % para bactérias de vida livre)(Tabela 8). Estes resultados demonstram que a ocorrência de hibridização não específica foi insignificante.

As figuras 16 e 17 apresentam os resultados pela análise da comunidade de bactérias aderidas às partículas, em termos de número de células e em termos de porcentagem em relação às células pertencentes ao domínio *Bacteria*, respectivamente. Os resultados correspondentes às bactérias de vida livre estão ilustrados nas figuras 18 e 19.

A composição das bactérias aderidas às partículas foi visivelmente diferente das bactérias de vida livre. Em 22 de agosto e 21 de setembro, as bactérias aderidas às partículas foram dominadas pela subclasse beta da classe *Proteobacteria*, especialmente a 26 m de profundidade (Figura 16), representadas por 62,8 % das células pertencentes ao domínio *Bacteria* (Tabela 10). De 19 de outubro a 22 de novembro, as subclasses alfa, beta e delta *Proteobacteria*, bem como o grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, compuseram a maior parte das bactérias aderidas às partículas, porém, sem que houvesse um domínio específico de algum desses grupos. As bactérias aderidas dos grupos alfa e delta apresentaram-se em maior número no período entre outubro e dezembro, nas amostras coletadas em profundidades inferiores a 25 m (Fig. 16). As bactérias aderidas da subclasse gama tiveram a menor representatividade, contribuindo em média por 9,8 % das células do domínio *Bacteria*. (Tabela 10).

As bactérias da subclasse beta compuseram a maior parte das bactérias de vida livre em todas as amostras analisadas (Figura 18),

representadas, em média, por 41,8 % das células pertencentes ao domínio *Bacteria* (Tabela 10).

As bactérias detectadas por EUB338, porém, não explicáveis pelas bactérias detectadas pelos oligonucleotídeos grupo-específicos empregados, foram categorizadas como "outras". As bactérias de vida livre foram representadas por uma alta proporção dessas células não identificadas (0,4 a 67 % das *Bacteria*), e as bactérias aderidas foram representadas por 0 a 39 % (Tabela 10).

As amostras que apresentaram atividade desnitrificante máxima no dia amostrado (Tabela 7) tiveram como grupo dominante a subclasse beta da classe *Proteobacteria*, tanto com relação às bactérias aderidas como às bactérias de vida livre (Figuras 16 e 18, respectivamente), o que sugere a existência de uma proporção significativa de bactérias desnitrificantes pertencentes a esta subclasse.

3.5. Análise estatística

O resultado da análise de regressão múltipla passo a passo aplicado às variáveis dependentes atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas, atividade desnitrificante das bactérias de vida livre e N_2O *in situ* está apresentado na tabela 9.

A atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas, a variável número de bactérias aderidas foi a contribuidora mais significativa (52,7 % de explicação), seguida do íon NH_4^+ (15,1 % de explicação). Para esta variável dependente, 67,8 % da sua variabilidade foi atribuível às variações das variáveis escolhidas.

Para a variável dependente atividade desnitrificante das bactérias de vida livre, o nitrito foi o maior contribuidor da sua variabilidade (62,5 % da explicação), seguido do COD (8,2 % de explicação). A alta porcentagem de explicação do nitrito para a variabilidade da atividade desnitrificante das bactérias de vida livre era um fato esperado, visto que os padrões de distribuição dessas variáveis no hipolímnio ao longo do tempo se assemelham muito, conforme a descrição feita no item 5.2. .

Com relação à variável dependente N_2O *in situ*, sua variabilidade foi atribuível às variáveis independentes desnitrificação das bactérias de vida livre e desnitrificação das bactérias aderidas, responsáveis por 58,9 % e 25,0 %, respectivamente. Esta análise foi realizada para se saber quais dessas frações atuam de forma mais significativa sobre a variabilidade do N_2O no hipolímnio do Lago Kizaki. Verificou-se, portanto, que as bactérias de vida livre são responsáveis pela maior variabilidade do N_2O .

4

DISCUSSÃO

4.1. Atividade desnitrificante e variáveis ambientais

Na tabela 11 estão apresentados alguns valores de atividade desnitrificante observados na coluna de água de vários lagos do mundo. Os valores da atividade desnitrificante da comunidade total observados neste trabalho (Tabela 7) estão dentro da faixa de valores observados entre setembro e novembro de 1994 por TERAÍ & YOH (1996) também no Lago Kizaki, e não muito diferentes dos dados observados em outros lagos do mundo. Uma das exceções refere-se aos valores observados no Lago Kinneret por CAVARI & PHELPS (1977), onde taxas consideravelmente mais altas foram medidas (3 a 36 $\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$), em razão das altas concentrações de NO_3^- existentes nesse lago (acima de 107 μM).

Os valores da atividade desnitrificante observados no hipolímnio são, em geral, muito inferiores aos valores normalmente observados em amostras de sedimento. Para se ter uma base de comparação, os valores

da atividade desnitrificante obtidos em cada dia de experimento foram integrados na coluna de água para a obtenção da unidade em μmol por m^2 por dia, conforme a tabela 12. Os valores da atividade desnitrificante da comunidade total variaram entre 7,2 e 84,4 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$. TERAÍ & YOH (1996) obtiveram valores estimados da atividade desnitrificante *in situ* em amostras litorâneas de sedimento do Lago Kizaki que variaram entre 10 a 2650 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$, ou seja, valores máximos muito superiores aos valores máximos da coluna de água obtidos no presente trabalho. A maior taxa de remoção de nitrogênio pela desnitrificação nos sedimentos de áreas litorâneas em relação à desnitrificação na coluna de água é um fato esperado, visto que a água sobrenadante oxigenada proporciona uma rápida nitrificação e regeneração de nitrato às bactérias desnitrificantes no sedimento contendo baixas concentrações de oxigênio e abundância de matéria orgânica, proporcionando-as uma alta atividade. Apesar da desnitrificação na coluna de água não ser considerada um importante sumidouro de nitrogênio, pode ter conseqüências ecológicas e geoquímicas importantes, tanto em sistemas lacustres (KEENEY 1973) como costeiros marinhos (RYTHER & DUNSTAN 1971), podendo regular a produtividade primária em ambientes limitantes em nitrogênio e controlar a eutrofização em ambientes que recebem descargas substanciais de nutrientes de origem antropogênica (SEITZINGER 1988).

Os dados observados neste trabalho mostram claramente que, em termos comparativos, as bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre atuam distintamente com relação à desnitrificação ao longo do tempo e nas diferentes camadas do hipolímnio. As bactérias aderidas às partículas apresentaram-se proporcionalmente mais ativas nos primeiros meses em que se formou a camada deficiente em oxigênio dissolvido (agosto e setembro) nas profundidades do hipolímnio inferiores a 24 m (Fig. 12 B). As bactérias de vida livre, por outro lado, apresentaram-se mais ativas entre outubro e novembro na faixa intermediária do hipolímnio, entre 22 e 24 m de profundidade (Fig. 12 C). Entre 22 de agosto e 21 de setembro, as bactérias aderidas às partículas foram favorecidas pela presença de NO_3^- em concentrações superiores a $6,4 \mu\text{M}$ (Tabela 7) e, possivelmente, pela presença de partículas ricas em matéria orgânica nesse período. Apesar da ocorrência de partículas em suspensão não ter sido quantificada neste trabalho, sabe-se que a existência de partículas orgânicas aumenta no ambiente pelágico após a proliferação do fitoplâncton, que normalmente ocorre no verão (FUKAMI et al. 1981; PEDRÓS-ALIÓ & BROCK 1983; SIMON 1987). SUGIURA & HANDA (1979) verificaram que a taxa de sedimentação de partículas ricas em carbono, medida com coletores de sedimento instalados no Lago Kizaki a 15 m de profundidade, é máxima entre agosto e setembro (245 a $270 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$). Essas informações sugerem a existência de partículas orgânicas em abundância no hipolímnio entre agosto e setembro, que

devem ter favorecido as bactérias aderidas às partículas em termos de suprimento de substrato orgânico. A ocorrência de maior número de partículas em agosto e setembro pode estar relacionado também à formação da estratificação térmica no metalímnio. Na fase anterior ao estabelecimento da termoclina, ou seja, entre abril e junho, as partículas provenientes do epilímnio, tanto autóctones como alóctones, teriam sofrido afundamento, muitas delas atingindo livremente a camada mais profunda do hipolímnio. Porém, com o estabelecimento da estratificação térmica, principalmente entre agosto e novembro (Fig. 9 A), as partículas provenientes do epilímnio foram possivelmente barradas fisicamente pela termoclina, resultando na diminuição destas no hipolímnio. De fato, verificou-se a predominância de bactérias aderidas às partículas a 26 m de profundidade no dia 22 de agosto, responsáveis por 71 % do total de células, coincidindo com a alta atividade desnitrificante na mesma amostra ($0,788\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$; 93 % do total), a máxima observada em todo o período estudado (Tabela 7). Além disso, o número de bactérias aderidas às partículas foi a variável independente que mais contribuiu para a variabilidade da variável dependente atividade desnitrificante das bactérias aderidas (52,7 %) na análise de regressão múltipla passo a passo (Tabela 9). As bactérias desnitrificantes são organismos aeróbios que utilizam naturalmente o oxigênio como acceptor final na cadeia de transporte de elétrons e, quando o oxigênio se torna limitante, passam a utilizar óxidos de nitrogênio como aceptores finais de elétrons. Portanto, é

muito provável que as partículas em suspensão provenientes da zona eufótica tenham sido colonizadas em grande parte por bactérias desnitrificantes que, ao atingir o hipolímnio deficiente em oxigênio dissolvido, passaram a utilizar NO_3^- como acceptor de elétrons, resultando na alta atividade desnitrificante observada (Fig. 12B) e no acúmulo de N_2O na parte mais profunda do hipolímnio entre agosto e setembro (Fig. 10C). Uma outra hipótese baseia-se no caminho inverso das bactérias, ou seja, do sedimento para a o hipolímnio anóxico e rico em NO_3^- . De acordo com TERAJ & YOH (1996), a máxima atividade desnitrificante no sedimento do Lago Kizaki ocorre entre o final de junho e julho, isto é, antes do desenvolvimento da camada anóxica no hipolímnio. Os autores verificaram também que a máxima atividade desnitrificante ocorreu na camada mais superficial do sedimento (primeiro 1 cm), que possivelmente se encontrava bem colonizada por bactérias desnitrificantes em razão do acúmulo de partículas orgânicas. Portanto, existe a possibilidade de que algumas dessas partículas bem colonizadas por bactérias desnitrificantes na superfície do sedimento tenham sido ressuspensas para a camada de água acima pelo movimento turbulento no hipolímnio. Porém, a alta atividade desnitrificante na camada abaixo de 24 m em agosto e setembro resultou no esgotamento de NO_3^- e NO_2^- em meados de outubro (Figuras 10A e 10B, respectivamente), sem que houvesse a reposição desses íons pelas bactérias nitrificantes, em razão da permanência da anoxia nesse local. Sem a reposição de NO_3^- e NO_2^- nessa camada, os níveis desses íons

tornaram-se baixos de outubro a dezembro e, conseqüentemente, a atividade desnitrificante também manteve-se extremamente baixa (Fig. 12 A). Além disso, a permanência da anoxia deve ter promovido a queda do potencial de óxido-redução a valores negativos, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento de outras formas bacterianas, como por exemplo, as bactérias redutoras de sulfato. Na figura 11B, que ilustra a variação temporal de sulfato no hipolímnio, verifica-se uma diminuição deste íon entre outubro e dezembro, principalmente na camada abaixo de 24 m, o que sugere a atividade de bactérias redutoras de sulfato. Sabe-se que o sulfeto, produto liberado por bactérias redutoras de sulfato, possui a propriedade de inibir tanto a desnitrificação (CHALAMET 1985) como a nitrificação (HANSEN et al. 1981). Portanto, vários aspectos podem ter contribuído para que as condições ambientais na camada abaixo de 24 m de profundidade se tornassem inadequadas para as bactérias desnitrificantes entre outubro e dezembro, como o esgotamento de NO_3^- e NO_2^- e o surgimento das bactérias redutoras de sulfato, que passaram a competir por substrato orgânico e também a produzir sulfeto, inibindo a nitrificação e impedindo a reposição de NO_3^- e NO_2^- , e inibindo a própria desnitrificação.

O NH_4^+ que se forma naturalmente no hipolímnio tem basicamente duas origens. A principal fonte refere-se aos processos de decomposição de matéria orgânica acumulada no sedimento (mineralização aeróbia e anaeróbia). A outra origem refere-se à redução dissimilatória de NO_3^- a

NH_4^+ , realizada por bactérias fermentativas, também designada como nitrificação reversa (COLE & BROWN 1980). O NH_4^+ produzido é, por sua vez, utilizado por bactérias nitrificantes que, na presença de oxigênio, oxidam o NH_4^+ a NO_2^- para fixação de CO_2 .

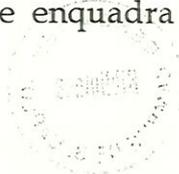
O acúmulo de NH_4^+ observado abaixo de 24 m entre setembro e dezembro (Fig. 11 A) fortalece a hipótese de que as bactérias nitrificantes deixaram de agir em função da permanência da camada anóxica nesse local (Fig. 9B), visto que o NH_4^+ é o produto primário de oxidação dessas bactérias. Apesar do NO_3^- não ter sido escolhido como uma das variáveis independentes responsáveis pela variabilidade da atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas na análise de regressão múltipla passo a passo, o NH_4^+ entrou como uma das variáveis significativas inversamente relacionadas na análise, cuja contribuição foi de 15,1 % da explicação da variável dependente (Tabela 9). Esta relação inversa entre a atividade desnitrificante das bactérias aderidas e o NH_4^+ reflete a interrupção da regeneração de nitrito e nitrato pelas bactérias nitrificantes causada pela anoxia, resultando no acúmulo de NH_4^+ no hipolímnio.

Entre outubro e novembro, nas camadas um pouco acima (entre 22 e 24 m), verificou-se a ocorrência de atividade desnitrificante em níveis significativos (Fig. 12 A), atribuída principalmente às bactérias de vida livre (Fig. 12C), responsáveis por 61 a 95 % da atividade da comunidade total (Tab. 7). As bactérias de vida livre encontraram nesta camada

condições propícias para desnitrificar, tais como a existência de NO_3^- e NO_2^- em níveis consideráveis (Fig. 10 A e 10 B), bem como níveis suficientemente baixos de oxigênio dissolvido (Fig. 9B). Além disso, as bactérias de vida livre estiveram presentes em grande número nessa camada ($3,12 \times 10^6$ a $5,28 \times 10^6$ células.ml⁻¹), se comparadas às bactérias aderidas às partículas ($0,44 \times 10^6$ a $2,17 \times 10^6$ células.ml⁻¹) (Tabela 7). A presença do maior número de bactérias de vida livre em relação às bactérias aderidas se deve, entre outros fatores, à menor taxa de afundamento das primeiras em razão do menor tamanho das células, o que lhes confere a capacidade de permanecer em suspensão na coluna de água por um longo período. Segundo PEDRÓS-ALIÓ & MAS (1993), as bactérias de vida livre possuem uma taxa de afundamento de aproximadamente 0,1 cm por dia, assumindo-se que as células possuem diâmetros entre 0,5 e 1 μm , e densidade de 1,08, ou seja, uma taxa de afundamento insignificante. A baixa atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas nessas profundidades deveu-se, provavelmente, ao menor número de células em função da menor quantidade das partículas. SUGIURA E HANDA (1979) já haviam verificado que o número de partículas ricas em carbono no Lago Kizaki diminui de outubro a dezembro, se comparado aos valores observados entre agosto e setembro.

Os padrões de variação de NO_2^- (Fig. 10B) e de N_2O (Fig. 10 C) observados no hipolímnio do Lago Kizaki se assemelham muito ao padrão

de variação da atividade desnitrificante máxima da comunidade total (Fig. 12 A), e principalmente ao padrão de variação da atividade máxima da desnitrificação das bactérias de vida livre (Fig. 12 C). O acúmulo de NO_2^- e de N_2O no hipolímnio já fora observado por DOWNES (1988) no lago Rotoiti, Nova Zelândia, e por YOH et al. (1990) no Lago Kizaki, que atribuíram o local desse acúmulo como a região a qual ocorre o acoplamento entre a nitrificação e a desnitrificação, ou seja, o local onde os processos de nitrificação e desnitrificação estariam ocorrendo concomitantemente. DOWNES (1988) sugeriu uma hipótese para descrever esse acoplamento da seguinte forma. Para concentrações de oxigênio dissolvido superiores a $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, o NH_4^+ é transformado em NO_2^- e este a NO_3^- . Esse processo é predominante no metalímnio, onde o NH_4^+ e NO_2^- são supridos pelo processo de difusão a partir do hipolímnio, fornecendo substrato para as bactérias nitrificantes. Nas camadas onde o oxigênio varia entre $0,2$ a $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, o NH_4^+ é transformado em NO_2^- , porém, sem que haja oxidação de NO_2^- a NO_3^- devido à baixa concentração de oxigênio que impede essa transformação. Ocorre então o acoplamento da desnitrificação, sendo o NO_2^- utilizado pelas bactérias desnitrificantes para a formação de N_2O . Em concentrações de oxigênio inferiores a $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, ocorre a desnitrificação completa, ou seja, o NO_2^- é reduzido a N_2O e este a N_2 . O segundo caso, ou seja, a transformação do NH_4^+ a NO_2^- pelas bactérias nitrificantes e a transformação NO_2^- a N_2O pelas bactérias desnitrificantes, se enquadra muito bem aos resultados



observados neste trabalho, principalmente com relação às bactérias de vida livre. Pela análise de regressão múltipla passo a passo, verificou-se que a variável dependente atividade desnitrificante das bactérias de vida livre teve sua variabilidade atribuída principalmente à variável dependente nitrito (Tabela 9), responsável por 62,5 % da explicação, o que alimenta ainda mais a hipótese do acoplamento nitrificação-desnitrificação. A outra variável que também se relacionou significativamente com a atividade desnitrificante das bactérias de vida livre foi o carbono orgânico dissolvido (COD), responsável por 8,2 % da explicação, visto que o substrato orgânico também é necessário para o processo. O COD não se relacionou significativamente à atividade desnitrificante das bactérias aderidas, possivelmente porque elas se supriram do substrato orgânico presente nas próprias partículas em que se mantiveram aderidas. A variável independente COP não foi incluída na análise de regressão, visto que nela estariam embutidas não apenas as partículas mortas, mas também as partículas vivas, muitas das quais, as próprias bactérias, que teriam interferido na análise.

Com relação ao acúmulo de N_2O observado, evidenciou-se claramente pela análise de regressão múltipla passo a passo que a desnitrificação foi a principal causa desse acúmulo (Tabela 9), sendo a atividade desnitrificante das bactérias de vida livre a variável que mais contribuiu para a variabilidade do N_2O , responsável por 58,9 % de explicação, e a variável desnitrificação das bactérias aderidas, por sua vez,

responsável por 25,0 % de explicação. A alta contribuição da atividade desnitrificante para a variabilidade da concentração de N_2O *in situ* no hipolímnio é um fato óbvio, porém, estes dados fornecem uma explicação nítida da influência de cada forma de vida bacteriana sobre as transformações do nitrogênio. Verificou-se assim, que as bactérias de vida livre apresentaram maior influência na variabilidade do N_2O *in situ*, se comparadas às bactérias aderidas às partículas, cujo resultado demonstra a grande importância das bactérias de vida livre no ciclo do nitrogênio na região pelágica de sistemas lacustres.

Por outro lado, foi realizado um cálculo para se avaliar a taxa absoluta de liberação de N_2O pela desnitrificação em todo o período estudado, a partir dos valores de atividade desnitrificante integrados na coluna de água mostrados na tabela 12. Montou-se assim, um gráfico indicando a contribuição das bactérias aderidas às partículas e das bactérias de vida livre para a desnitrificação na coluna de água, conforme a figura 13. Posteriormente, calculou-se a área de cada uma das curvas obtidas que forneceram a quantidade de nitrogênio produzido pela desnitrificação durante todo o período estudado, entre 22 de agosto a 13 de dezembro de 1996, conforme indica a tabela 13. Verificou-se que, em termos absolutos, as bactérias aderidas às partículas produziram 4,76 $mmol.m^{-2}$ de N_2O no período estudado, o equivalente a 56 % de todo o N_2O produzido pela desnitrificação, e as bactérias de vida livre, 3,79 $mmol.m^{-2}$, o equivalente a 44 % do total. Portanto, a contribuição de cada

uma das formas de vida na formação de N_2O foi praticamente equivalente, apesar de atuarem em épocas e em camadas distintas do hipolímnio.

4.2. Contagem de bactérias

Os estudos comparativos entre bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre no Lago Kizaki já têm sido realizados desde o final da década passada. KATO & SAKAMOTO (1981) verificaram que, durante a estratificação térmica de verão, as bactérias de vida livre predominam no epilímnio do Lago Kizaki, sendo que no hipolímnio, as bactérias aderidas foram predominantes. KATO (1985) acredita que, apesar da ocorrência dos constituintes da comunidade bacteriana e dos mecanismos relacionados à adesão das bactérias às partículas em suspensão serem de extrema complexidade mesmo em ambientes lacustres, o número e a atividade das bactérias de vida livre e das bactérias aderidas às partículas são governadas pela disponibilidade de partículas apropriadas para a colonização, bem como pela concentração de nutrientes dissolvidos.

Em todos os dias amostrados, a maior densidade de células bacterianas foi observada na parte mais profunda do hipolímnio, entre 25

e 26 m de profundidade, superando 10^7 células por ml (Tab. 7). Tanto as bactérias de vida livre como aderidas às partículas foram mais abundantes também nessa camada, que apresentou-se anóxica em praticamente todo o período estudado (Fig. 9B). Com relação às bactérias aderidas, foi mencionada anteriormente que a grande abundância de células em agosto pode estar relacionada ao maior fluxo de partículas provenientes da zona eufótica nesse período, após o florescimento fitoplanctônico no verão e servindo como habitats para as bactérias. Os valores de COD observados no hipolímnio estiveram sempre na faixa entre 1,26 e 2,61 mg.l^{-1} (Tabela 7), demonstrando que este composto sempre esteve presente no ambiente e, portanto, disponível às bactérias de vida livre, o que explica a alta abundância desta forma de vida durante todo o período estudado.

Com relação à maior abundância de bactérias na camada mais profunda do hipolímnio, sabe-se que, apesar de haver descrições sobre protozoários que vivem ativamente em ambientes anóxicos (FENCHEL et al. 1990), a pressão de "grazing" muitas vezes pode ser reduzida nessas condições. COLE et al. (1993), realizando estudos comparativos sobre abundância e morfologia de bactérias em uma série de 20 lagos, verificaram que tanto a abundância como o tamanho das células bacterianas eram consistentemente maiores em ambientes anóxicos em comparação aos ambientes óxicos. ABE et al. (1998)* realizaram

* ABE, D. S.; G-TOTH, L.; KATO, K. (1998). (Universidade de Shinshu, Japão) / Trabalho a ser submetido para publicação/

experimentos em paralelo ao presente trabalho, submetendo amostras do hipolímnio do Lago Kizaki a condições óxicas e anóxicas para se medir a taxa de ingestão de bactérias de vida livre por organismos menores do que 3,0 μm . Os autores verificaram que o decréscimo do número de células bacterianas ocorreu apenas em amostras submetidas às condições óxicas (Fig. 14), concluindo que a pressão de "grazing" em condições anóxicas não foi significativa no hipolímnio do Lago Kizaki. Portanto, a maior densidade bacteriana no hipolímnio provavelmente esteve relacionada à menor pressão de "grazing" nesse local.

4.3. Análise da comunidade bacteriana

A eficiência de hibridização em torno de 50 % em relação às células coradas com DAPI obtida neste trabalho (Tabela 8) e não de 100 %, se deve ao fato de as bactérias que vivem em ambientes oligotróficos e mesotróficos lacustres possuírem, em geral, quantidade reduzida de cópias de rRNA em suas células se comparadas, por exemplo, às células que se desenvolvem em ambientes eutróficos, visto que a quantidade de rRNA contida na célula está relacionada à quantidade de ribossomos que, na maioria dos casos, está relacionada à atividade metabólica das células (AMANN et al. 1995). Havendo poucas moléculas de rRNA na célula, o número de hibridizações e, conseqüentemente, a quantidade de

fluorocromo no interior da célula serão também pequenos, dificultando a sua visualização ao microscópio. Além disso, a técnica empregada possui limitações quando usadas para bactérias gram-positivas, por possuírem uma parede celular espessa que dificulta a permeabilidade dos oligonucleotídeos para o interior das células. No caso das bactérias gram-positivas, torna-se necessário o uso de etanol para fixação no lugar de paraformaldeído, bem como o uso de enzimas como, por exemplo, a lisozima-EDTA para atacar a parede celular, tornando-as mais permeáveis aos oligonucleotídeos fluorescentes (HAHN et al. 1992). Esta técnica não foi empregada no presente trabalho pois seria necessário um tratamento à parte para bactérias gram-positivas, visto que a lisozima destrói bactérias gram-negativas, o que tornaria o trabalho muito dispendioso. De acordo com TERAÍ (1979), a grande maioria das bactérias desnitrificantes por ele caracterizadas no lago Kizaki é pertencente ao grupo das gram-negativas, informação esta que nos fez optar pela caracterização apenas deste grupo. Além disso, o tratamento com lisozima-EDTA não é perfeitamente eficaz na permeabilização da parede celular das bactérias gram-positivas (AMANN et al. 1992).

O uso da câmera colorida de alta resolução Hamamatsu C5810 acoplada a um analisador de imagens foi de fundamental importância para a melhoria da detecção das células hibridizadas. Com este equipamento, tornou-se possível aumentar a captação da emissão das células hibridizadas com o aumento do tempo de exposição da imagem e

o armazenamento desta na memória do computador, possibilitando uma análise minuciosa e prolongada no monitor de vídeo, sem a preocupação com o problema de descoloração que normalmente ocorre durante as contagens feitas diretamente na lâmina ao microscópio de epifluorescência. Outro aspecto importante com relação ao uso do equipamento refere-se à sobreposição das duas imagens obtidas a partir do mesmo campo microscópico, após ser iluminado com a luz de excitação para TRITC e para DAPI, permitindo a distinção entre partículas que fluoresceram na mesma faixa do TRITC com células verdadeiramente hibridizadas (ver figura 8). Dentre as partículas fluorescentes que interferem na imagem, destacam-se as partículas orgânicas auto-fluorescentes e cristais de TRITC contidos na solução impura de oligonucleotídeos fluorescentes.

Os resultados da análise da comunidade microbiana mostraram variação das proporções entre os diferentes grupos de bactérias aderidas às partículas detectadas ao longo do tempo. A mudança da atividade das bactérias aderidas às partículas, de valores extremamente altos entre agosto e setembro para valores baixos entre outubro e dezembro (Figura 12 B), foi acompanhada por uma nítida mudança na composição da comunidade bacteriana. Entre 22 de agosto e 21 de setembro, as bactérias aderidas foram compostas principalmente por membros da subclasse beta da classe *Proteobacteria* (Fig. 16). De 19 de outubro a 13 de dezembro, apesar de as bactérias da subclasse beta estarem presentes em números

significativos, houve um visível aumento na proporção de outros grupos, como as subclasses alfa e delta, bem como do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. O aumento do número de bactérias aderidas da subclasse alfa e delta, principalmente nas amostras entre 25 e 26 m de profundidade, era um fato esperado, visto que houve diminuição da concentração de SO_4^- nesse local (Figura 11B), um indicativo da atividade de bactérias redutoras de SO_4^- . De acordo com AMANN et al. (1992) a subclasse delta é composta principalmente por bactérias redutoras de SO_4^- , e o oligonucleotídeo ALFA utilizado neste trabalho, específico ao rRNA das bactérias da subclasse alfa, é específico também a alguns membros da subclasse delta (ver tabela 5). Portanto, o aumento do número de células pertencentes às subclasses alfa e delta indicam o aumento do número de bactérias redutoras de sulfato, em razão das condições anóxicas que foram observadas no local. Este resultado reforça a hipótese de que as bactérias desnitrificantes nas camadas abaixo de 24 m de profundidade foram prejudicadas em parte pela competição ocorrida entre elas e as bactérias redutoras de sulfato. A proporção significativa de ocorrência de membros do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* entre as bactérias aderidas às partículas (média de 17 %)(Tabela 10) era um fato esperado. DeLong et al. (1993), que caracterizaram a comunidade de bactérias de vida livre e bactérias aderidas a agregados orgânicos de ambiente marinho, verificaram que grande parte das bactérias aderidas (55 % do total) era composta por

membros do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, o mesmo não acontecendo com relação às bactérias de vida livre. Este grupo caracteriza-se por possuir espécies de bactérias adaptadas às condições de vida na forma aderida, como motilidade por deslizamento e a habilidade de degradar uma grande variedade de compostos de alto peso molecular, incluindo proteínas, polissacarídeos, quitina e ácidos nucleicos.

As bactérias de vida livre, por outro lado, foram dominadas pelos membros da subclasse beta em praticamente todas as amostras (Figura 18), e também pelas bactérias do domínio *Bacteria* que não pertencem a nenhum dos grupos analisados neste trabalho, categorizadas como "outras". Em algumas das amostras, estas bactérias representaram até 67 % das bactérias do domínio *Bacteria* (Tabela 10). Este dados mostram que a caracterização geral da comunidade bacteriana, utilizando-se apenas 5 grupos filogenéticos intermediários, é ainda insuficiente, pelo menos para as bactérias de vida livre. DELONG et al. (1993) e FUHRMAN et al. (1994), que realizaram um estudo filogenético das bactérias de ambientes marinhos utilizando-se a técnica de amplificação (PCR), clonagem e sequenciamento gênico de moléculas de rRNA, verificaram que a vasta maioria das bactérias de vida livre eram pertencentes a grupos não descritos filogeneticamente. Portanto, pouco se conhece ainda a respeito das bactérias, principalmente de vida livre, e muitas das técnicas de detecção desenvolvidas até o momento não são ainda suficientes para uma ampla caracterização da comunidade bacteriana em ambientes naturais.

A dominância das bactérias da subclasse beta já fora observada em outros ambientes de água doce, como em partículas agregadas do Lago Constance na Alemanha (WEISS et al. 1996), em amostras de água e de gelo de um lago de alta montanha da Áustria (ALFREIDER et al. 1996), e em biofilmes de sistema de tratamento terciário de água em alta atividade desnitrificante (NEEF et al. 1996). Os dados observados no presente trabalho reforçam a hipótese de que a subclasse beta da classe *Proteobacteria* possui um papel significativo em ambientes de água doce.

Tornou-se evidente, portanto, que as bactérias da subclasse beta dominaram em agosto e setembro, justamente na época em que se observaram as maiores taxas de desnitrificação das bactérias aderidas (Tabela 7). Com relação às bactérias de vida livre, verificou-se também que a subclasse beta foi o grupo dominante principalmente nas amostras em que foram observadas as mais altas taxas de desnitrificação (Figura 18). Esses dados sugerem que as bactérias desnitrificantes, tanto aderidas às partículas como de vida livre, eram pertencentes principalmente à subclasse beta da classe *Proteobacteria*. Dentre os gêneros de bactérias desnitrificantes descritos por INGRAHAM (1981) pertencentes à subclasse beta, destacam-se *Alcaligenes*, *Neisseria* e *Chromobacterium*, sendo o gênero *Alcaligenes* tido como o segundo mais representativo numericamente em lagos (GAMBLE et al. 1977). Segundo MOBARRY et al. (1996), a subclasse beta compõe também a maioria das bactérias amônio-oxidantes, ou seja, a

parcela das bactérias nitrificantes responsável pela regeneração de NO_2^- a partir de NH_4^+ . Pela análise de regressão múltipla passo a passo, foi observada uma forte ligação entre o consumo de NH_4^+ e a atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas (Tabela 9), e principalmente entre o acúmulo de NO_2^- e a atividade desnitrificante das bactérias de vida livre, sugerindo a existência de um acoplamento entre nitrificação e desnitrificação. Portanto, é muito provável que a abundância de bactérias pertencentes à subclasse beta nas amostras em que foram observadas as mais altas atividades desnitrificantes se deva, além da existência de bactérias desnitrificantes pertencentes à esta subclasse, também à existência de bactérias amônio-oxidantes.

O gênero *Pseudomonas*, pertencente à subclasse gama da classe *Proteobacteria*, é citado em diversos trabalhos como sendo o grupo que inclui o maior número de espécies de bactérias desnitrificantes isoladas de amostras de solo, de sedimentos marinhos e de sedimentos lacustres (GAMBLE et al. 1977; HEITZER & OTTOW 1976), e citado também como numericamente abundante nesses ambientes. TERAÍ (1979) realizou um estudo taxonômico das bactérias desnitrificantes do Lago Kizaki, estimadas pelo método de contagem pelo número mais provável (MPN) em meio Giltay, e classificou a grande maioria (34 espécies entre 44) como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Porém, no presente trabalho, as bactérias da subclasse gama foram muito pouco representativas, tanto como bactérias de vida livre em todas as amostras analisadas, como para

as bactérias aderidas referentes às amostras de agosto e setembro, quando se verificou a maior atividade desnitrificante desta forma de vida no período estudado (Tabela 10). Em outros trabalhos realizados em ambientes pelágicos de sistemas lacustres, verificou-se também que as bactérias da subclasse gama são as menos representativas entre outras subclasses da classe Proteobacteria (ALFREIDER et al. 1996; WEISS et al. 1996), bem como em biofilmes de sistema terciário de tratamento de água enriquecidos com metanol, onde ocorre intensa atividade desnitrificante (NEEF et al. 1996). Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a baixa representatividade das bactérias pertencentes à subclasse gama da classe *Proteobacteria* normalmente observada em ambientes de água doce. Estes resultados sugerem que as bactérias do gênero *Pseudomonas* não são numericamente tão representativas em ambientes lacustres como normalmente são referidas.

5

CONCLUSÕES

- As bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre apresentam padrões de distribuição da atividade desnitrificante distintos ao longo do tempo, sendo as primeiras mais ativas nos estágios iniciais da anoxia (entre agosto e setembro) nas profundidades próximas ao fundo (abaixo de 26 m), e as últimas apresentaram-se mais ativas entre outubro e novembro, nas profundidades intermediárias do hipolímnio (entre 22 e 24 m de profundidade).
- A atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas esteve muito influenciada pelo número de bactérias aderidas, ligada provavelmente à abundância de partículas bem colonizadas, e a atividade das bactérias de vida livre esteve influenciada principalmente pela concentração de nitrito dissolvido na água, resultante possivelmente, do processo de nitrificação.
- A contribuição das bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre para a produção absoluta de N_2O no hipolímnio foi praticamente

equivalente em todo o período estudado (56% e 44 %, respectivamente), apesar de atuarem em épocas e em camadas distintas.

- As bactérias aderidas às partículas foram geralmente compostas pelas subclasses alfa e beta da classe *Proteobacteria*, e pelo grupo *Cytophaga/Flavobacterium*, e as bactérias de vida livre foram dominadas pela subclasse beta *Proteobacteria* e por bactérias não caracterizadas.

- As amostras que apresentaram atividade desnitrificante máxima tiveram como subclasse dominante as *Proteobacteria* beta. Este resultado sugere que as bactérias desnitrificantes do hipolímnio do Lago Kizaki são compostas principalmente por bactérias pertencentes à subclasse beta da classe *Proteobacteria*, ou então, sugere a presença também de bactérias nitrificantes pertencentes a esta subclasse vivendo em conjunto com bactérias desnitrificantes, realizando o acoplamento entre a nitrificação e a desnitrificação.

- A alta porcentagem de bactérias de vida livre do domínio *Bacteria*, porém, não pertencentes a nenhum dos 5 grupos estudados, sugere a necessidade do uso de oligonucleotídeos específicos também a outros grupos intermediários, para uma caracterização geral da comunidade bacteriana.

6

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os métodos de detecção e identificação de microorganismos baseados em técnicas de biologia molecular têm contribuído muito para a maior compreensão da dinâmica e diversidade microbianas em seu próprio nicho. Porém, pouco se conhece ainda a esse respeito das bactérias desnitrificantes em sistemas naturais. Além da dificuldade de detecção em razão da sua enorme diversidade, as bactérias desnitrificantes atuam tanto como bactérias aeróbias convencionais, oxidando a matéria orgânica com a redução de oxigênio, como desnitrificantes propriamente ditas, reduzindo óxidos de nitrogênio e liberando N_2O e N_2 . Assim, mesmo que se observe a existência de bactérias desnitrificantes em um determinado sistema deficiente em oxigênio dissolvido, isso não indica necessariamente que ali esteja ocorrendo desnitrificação, visto que elas podem estar utilizando o pouco do oxigênio que resta no ambiente. Portanto, torna-se necessária uma outra forma de

detecção, baseada não apenas na filogenia, mas também na funcionalidade das bactérias a serem detectadas *in situ*. A abordagem mais promissora para a detecção funcional das bactérias baseia-se na detecção do RNA mensageiro (mRNA) bacteriano, que dá uma indicativa da transcrição gênica e produção protéica de uma determinada atividade metabólica. Os métodos atuais de detecção são ainda ineficazes para a detecção dessas moléculas *in situ*, dada a sua escassez e instabilidade no interior das células. Porém, com o advento de novas técnicas progressivamente mais sensíveis de detecção, o uso desta abordagem tornar-se-á possível em um futuro próximo. O uso de técnicas baseadas em moléculas específicas de rRNA em paralelo a técnicas baseadas em moléculas de mRNA forneceria correlações entre composição da comunidade, relações espaciais entre diferentes membros e atividade específica *in situ* de populações definidas de bactérias em ambientes aquáticos. Esta seria, portanto, uma das perspectivas para um estudo futuro.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a grande importância das bactérias nas transformações dos compostos nitrogenados no ambiente pelágico lacustre. Apesar do Lago Kizaki apresentar um hipolímnio com temperaturas relativamente baixas, em torno de 7°C, essas transformações foram muito evidentes. No caso de sistemas aquáticos tropicais, muitos dos quais situam-se no território brasileiro, as transformações são virtualmente maiores em razão da alta temperatura das águas e da grande diversidade de

espécies normalmente observadas nesses sistemas, que abrem perspectivas futuras para estudos nesses sistemas.

7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFREIDER, A. et al. (1996). Community analysis in the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2138-2144.
- AMANN, R. (1995). In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Microbial Ecology Manual*, v. 3.3.6, p.1-15.
- AMANN, R. I. et al. (1990). combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing Mixed Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.1919-1925.
- AMANN, R. I. et al. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.614-623.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, p.143-169.
- AZAM, F.; FUHRMAN, J. A. (1984). Measurement of bacterioplankton growth in the sea and its regulation by environmental conditions. In: Hobbie, J. E.; Williams, P. J. IeB. eds., *Heterotrophic Activity in the Sea*. NATO Conference Series, Plenum Press, New York, p.179-196.

- BREZONIK, P.L.; LEE, G.F. (1968). Denitrification as a nitrogen sink in Lake Mendota, Wis. *Environ. Sci. Technol.*, v.2, p.120-125.
- BROSIUS, J. et al. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, v.61, p.107-127.
- CARON, D. A. et al. (1982). Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. *Science*, v.218, p.795-797.
- CAVARI, B.Z.; PHELPS, G. (1977). Denitrification in Lake Kinneret in the presence of oxygen. *Freshwater Biol.*, v.7, p.385-391.
- CHALAMET, A. (1985). Effects of environmental factors on denitrification. In: Golterman, H. L. ed., *Denitrification in the Nitrogen Cycle*. Plenum Press, New York, p.7-9.
- CHAN, Y.K.; CAMPBELL, N.E.R. (1980). Denitrification in Lake 227 during summer stratification. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, v.37, p.506-512.
- COLE, J. A.; BROWN, C. M. (1980). Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a shortcircuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, v.7, p.65-72.
- COLE, J.J.; PACE, M. L.; STEINHART, G.; CARACO, N. F. (1993). Bacterial abundance and cell sizes are greatest in anoxic lakes. *Limnology and Oceanography*, v.38, p.1627-1632.
- DAVIDSON, E. A. (1991). Fluxes of nitrous oxide and nitric oxide from terrestrial ecosystems. In: Rogers, J. E.; Whitman, W. B. eds, *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p.219-235.
- DELONG, E. F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, v.243, p.1360-1363.
- DELONG, E. F.; FRANKS, D.G.; ALLDREDGE, A. L. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography*, vol.38, p.924-934.

- DOWNES, M. T. (1988). Aquatic nitrogen transformations at low oxygen concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, p.172-175.
- DRAPER, N. R.; SMITH, H. (1966). *Applied Regression Analysis*. John Wiley and Sons, New York, 491 p.
- FENCHEL, T.; KRISTENSEN, L.D.; RASMUSSEN, L. (1990). Water column anoxia: Vertical zonation of planktonic protozoa. *Marine Ecology Progress Series*, v.62, p.1-10.
- FERGUSON, R. L.; RUBLEE, P. (1976). Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnology and Oceanography*, vol.21, p.141-144.
- FERGUSON, R. L.; BUCKLEY, E. N.; PALUMBO, A. V. (1984). Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology*, v.18, p.265-273.
- FUHRMAN, J. A.; LEE, S. H.; MASUCHI, Y.; DAVIS, A. A.; WILCOX, R. M. (1994). Characterization of marine prokaryotic communities via DNA and RNA. *Microbial Ecology*, v.28, p.133-145.
- FUKAMI, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. (1981). Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v.55, p.171-184.
- GAMBLE, T. N.; BETLACH, M. R.; TIEDJE, J. M. (1977). Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v.33, p.926-939.
- GOERING, J. J.; DUGDALE, V. A. (1966). Estimates of the rates of denitrification in a subarctic lake. *Limnology and Oceanography*, v.11, p.113-117.
- HAHN, D. et al. (1992). Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.*, v.138, p.879-887.
- HANSEN, J. I.; HENRIKSEN, K.; BLACKBURN, T. H. (1981). Seasonal distribution of nitrifying bacteria and rates of denitrification in coastal marine sediments. *Microbial Ecology*, v.7, p.297-304.
- HEITZER, R. D.; OTTOW, J. C. G. (1976). New denitrifying bacteria isolated from Red Sea sediments. *Marine Biology*, v. 37, p.1-10.

- HOBBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S. (1977). Use of nuclepore filter for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v.33, p.1225-1228.
- HYNES, R. K.; KNOWLES, R. (1978). Inhibition by acetylene of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 4: 319-321.
- ILEC (International Lake Environment Committee Foundation, United Nations Environment Programme). (1993). *Compact-size Edition of Data Book of World Lake Environments - A Survey of the State of World Lakes - 1. Asia and Oceania*. International Lake Environment Committee Foundation, Kusatsu, p.293-297.
- INGRAHAM, J. L. (1981). Microbiology and genetics of denitrifiers. In: Delwiche, C. C. ed. *Atmospheric nitrous oxide*. John Wiley, New York, p.45-65.
- JASSBY, A. D. (1975). The ecological significance of sinking to planktonic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 21, p. 270-274.
- KATO, K. (1985). Ecology of aquatic Organisms. I. Microbes. A concept on the structure and function of bacterial community in aquatic ecosystems. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* , v.22, p.2739-2743.
- KATO, K. (1996). *Bacteria - a link among ecosystem constituents*. *Res. Population Ecology*, v.38, p.185-190.
- KATO, K.; SAKAMOTO, M. (1981). Vertical distribution of free-living and attached heterotrophic bacteria in Lake Kizaki. *Japanese Journal of Limnology*, v.42, p.154-159.
- KEENEY, D.R. (1973). The nitrogen cycle in sediment-water systems. *J. Environ. Qual.*, v.2, 15-29.
- KIRCHMAN, D.; MITCHELL, R. (1982). Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, p.200-209.
- KNOWLES, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Review*, v.46, p.43-70.

- KOGURE, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria *Canadian Journal of Microbiology*, v.25, p.415-420.
- KOGURE, K.; SIMIDU, U.; TAGA, N. (1980). Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Canadian Journal of Microbiology*, v.26, p.318-323.
- KUENEN, J. G.; ROBERTSON, L. A. (1987). Ecology of nitrification and denitrification. In: J. A. Cole & S. J. Ferguson eds. *The Nitrogen and Sulphur Cycles*. Cambridge University Press, pp. 161-218.
- LATHE, R. (1985). Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. *Journal of Molecular Biology*, v.183, p.1-12.
- MAIDAK, B. L. et al. (1996). The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Research*, v.24, p.82-85.
- MANZ, W. et al. (1992). Phylogenetic Oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *System. Applied Microbiol.*, v.15, p.593-600.
- MATSUBARA, T.; MORI, T. (1968). Studies on denitrification. IX - Nitrous oxide, its production and reduction to nitrogen. *The Journal of Biochemistry*, v. 64, p. 863-871.
- MOBARRY, B. K. et al. (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2156-2162.
- NEEF, A. et al. (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.4329-4339.
- NIRA (National Institute for Research Advancement) (1982). *Data Book of World Lakes*. National Institute for Research Advancement, Japan, pp.124-130.
- NOMMIK, H. (1956). Investigations on denitrification in soil. *Acta Agric. Scand.*, v.6, p.195-228.

- PAERL, H. M.; MERKEL, S. M. (1982). Differential phosphorous assimilation in attached vs. unattached microorganisms. *Archiv für Hydrobiologie*, v.93, p.125-134.
- PAYNE, W. A. (1973). Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriological Reviews*, v.37, 409-452.
- PEDRÓS-ALIÓ, C.; BROCK, T.D. (1983). The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Archiv für Hydrobiologie*, v.98, p.354-379.
- PEDRÓS-ALIÓ, C.; MAS, J. (1993). Bacterial sinking losses. in: Kemp, P.F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. & Cole, J. J. eds. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Tokyo, 777 p.
- PRAKASAM, T.B.S.; LOEHR, R.C. (1972). Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Eater Res.*, v.6, p.859-869.
- RAMSING, N.B. et al. (1996). Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.1391-1404.
- RIEMANN, M. (1978). Differentiation between heterotrophic and photosynthetic plankton by size fractionation, glucose uptake, ATP and chlorophyll content. *Oikos*, v.31, p. 358-367.
- RYTHER, J. H.; DUNSTAN, W. M. (1971). Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, v.171, p.1008-1013.
- SCHRAMM, A. et al. (1996). Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.4641-4667.
- SEITZINGER, S. P. (1988). Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography*, v.33, p.702-724.
- SHAFFER, G.; RÖNNER, U. (1984). Denitrification in the Baltic proper deep water. *Deep Sea Research*, v.31, p.197-220.

- SIMON, M. (1987). Biomass and production of small and large free-living and attached bacteria in Lake Constance. *Limnology and Oceanography*, v.32, p.591-607.
- SIMON, M.; ALLDREDGE, A. L.; AZAM, F. (1990). Bacterial carbon dynamics on marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, v.65, p.205-211.
- SLATER, J. M.; CAPONE, D. G. (1989). Nitrate requirement for acetylene inhibition of nitrous oxide reduction in marine sediments. *Microbial Ecology*, v.36, p.139-143.
- SØRENSEN, J. (1978). Denitrification rate in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique. *Applied and Environmental Microbiology*, v.36, p.139-143.
- STAHL, D. A.; AMANN, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. eds, *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, p. 205-248.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. (1972). A practical handbook of sea water analysis. 2nd. ed. *Bulletin of Fish Research Bd. Canada* 167, 310 pp.
- SUGIURA, T.; HANDA, N. (1979). Determination of vertical flux of particulate organic matter in Lake Kizaki. *Chikyu-kagaku*, vo. 13, p. 56-60 (em japonês).
- TAM, T. Y.; KNOWLES, R. (1979). Effects of sulfide and acetylene on nitrous oxide reduction by soil and by *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, p.1133-1138.
- TERAI, H. (1979). Taxonomic study and distribution of denitrifying bacteria in Lake Kizaki. *Japanese Journal of Limnology*, v.40, p.81-92.
- TERAI, H. (1987). Studies on denitrification in the water column of Lake Kizaki and Lake Fukami-ike. *Japanese Journal of Limnology*, v.48, p.257-264.
- TERAI, H.; YOH, M.; SAIJO, Y. (1987). Active denitrification in the hypolimnetic water column in Lake Kizaki. *Japanese Journal of Limnology*, v.48, p.219-224.

- TERAI, H.; YOH, M. (1996). Denitrification and N_2O production in Lake Kizaki. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, v.25, p.97-104.
- TUNDISI, J. G.; SAIJO, Y. (1997). *Limnological Studies on the Rio Doce Valley Lakes, Brazil*. Academia Brasileira de Ciências, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, 513p.
- UCHIDA, O. (1995). *Shimpan Kuusatsukazangaido*. Series 9: Yari, Hotaka, Jonen-dake (Guia de Montanhismo com Fotos Aéreas, série 9: Montes Yari, Hotaka e Jonen). Yama to Keikoku (em japonês), p.7.
- VINCENT, W.F.; DOWNES, M.T.; VINCENT, C.L. (1981). Nitrous oxide cycling in Lake Vanda, Antarctica. *Nature*, v.292, p.618-620.
- WAGNER, M.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K.H. (1993). Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.1520-1525.
- WALTER, H. M. ; KEENEY, D. R.; FILLEY, I.R. (1979). Inhibition of nitrification by acetylene. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.43, p.195-196.
- WARD, B. B. (1996). Nitrification and denitrification: Probing the nitrogen cycle in aquatic environments. *Microbial Ecology*, v.32, p.247-261.
- WEISS, R. F. (1974). Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of non-ideal gas. *Marine Chemistry*, v.2, p.203-215.
- WEISS, R. F.; PRICE, B. A. (1980). Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry*, v.8, p.347-359.
- WEISS, P. et al. (1996). Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (Lake Snow). *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.1998-2005.
- WHITAKER, V. A. (1993). Área alagada da represa do Lobo (Itirapina-SP) - Os processos ecológicos associados ao potencial de desnitrificação dos sedimentos. 137 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- WIJLER, J.; DELWICHE, C.C. (1954). Investigations on the denitrifying process in soil. *Plant Soil*, v. 5, p.155-169.
- WOESE, K. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, p.221-271.
- YE, R. W.; AVERILL, B. A.; TIEDJE, J. M. (1994). Denitrification: production and consumption of nitric oxide. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, 1053-1058.
- YOH, M. (1992). Marked variation in lacustrine N₂O accumulation level and its mechanism. *Japanese Journal of Limnology*, v.53, p.75-81.
- YOH, M.; TERAJ, H.; SAIJO, Y. (1983). Accumulation of nitrous oxide in the oxygen deficient layer of freshwater lakes. *Nature*, v.301, p.327-329.
- YOH, M.; TERAJ, H.; SAIJO, Y. (1988). Nitrous oxide in freshwater lakes. *Arch. Hydrobiol.*, v.113, p.273-294.
- YOH, M.; YAGI, A.; TERAJ, H. (1990). Significance of low-oxygen zone for nitrogen cycling in a freshwater lake: production fo NO₂- and N₂O by simultaneous denitrification and nitrification. *Japanese Journal of Limnology*, v.51, p.163-171.
- YOSHINARI, T.; HYNES, R.; KNOWLES, R. (1977). Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v.9, p.177-183.
- YUNG, Y. L.; WANG, W. C.; LACIS, Q. A. (1976). Greenhouse effect due to nitrous oxide. *Geophysical Research Letters*, v.3, p.619-621.

FIGURAS

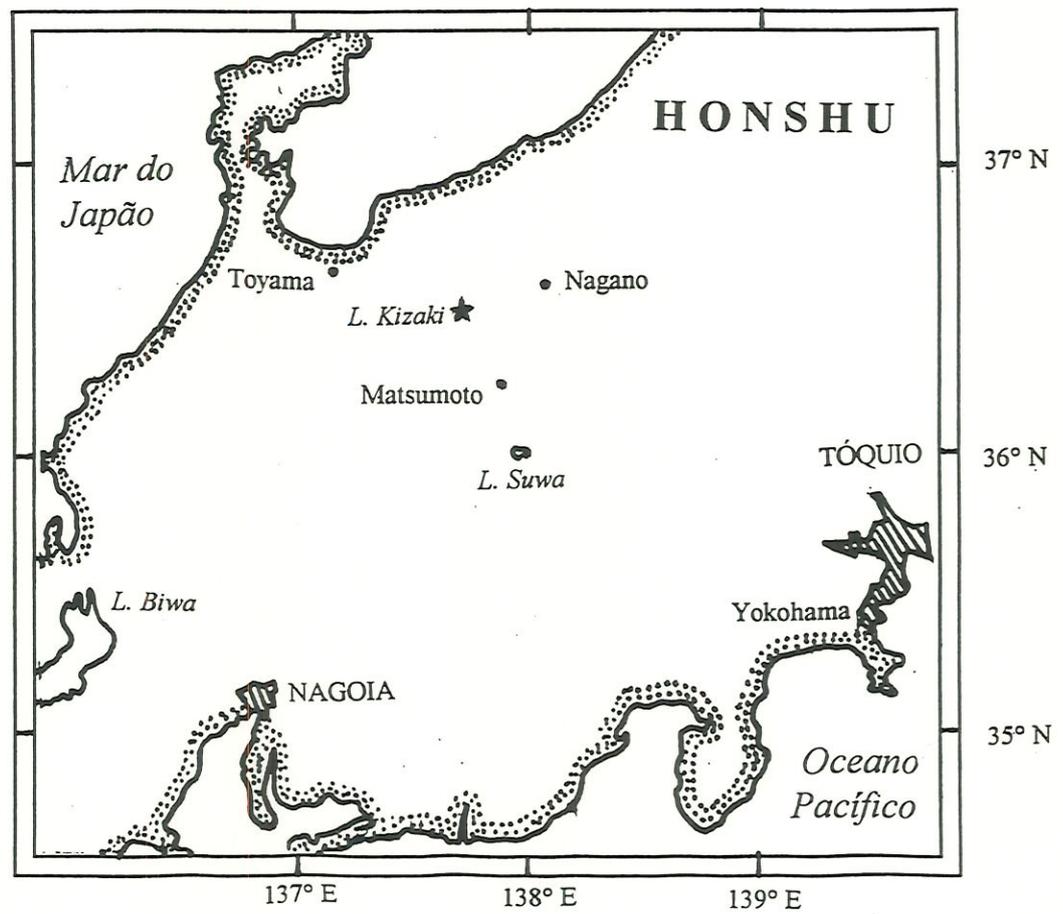
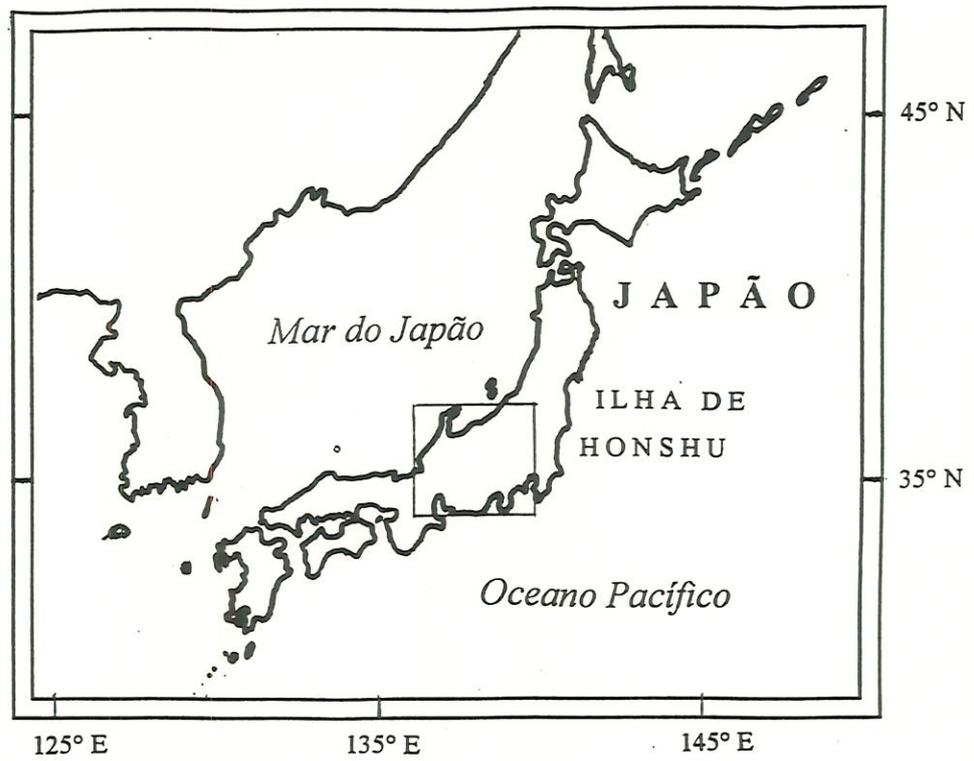


FIGURA 1 - Localização do Lago Kizaki, Japão.

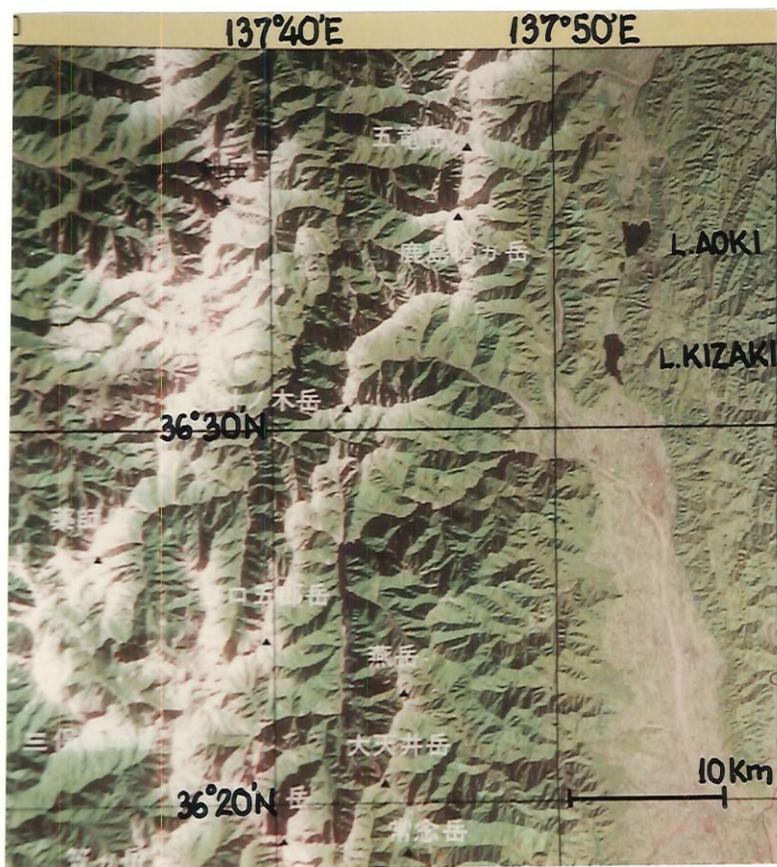


FIGURA 2 - Imagem de satélite da área onde está situado o Lago Kizaki. Extraído de UTIDA (1995).

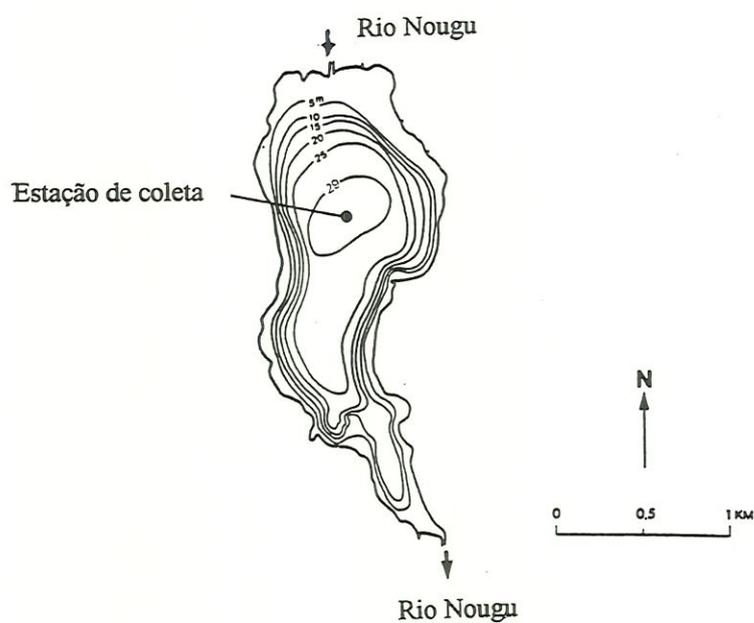


FIGURA 3 - Mapa batimétrico do Lago Kizaki, indicando a estação de coleta. Extraído de ILEC (1993).

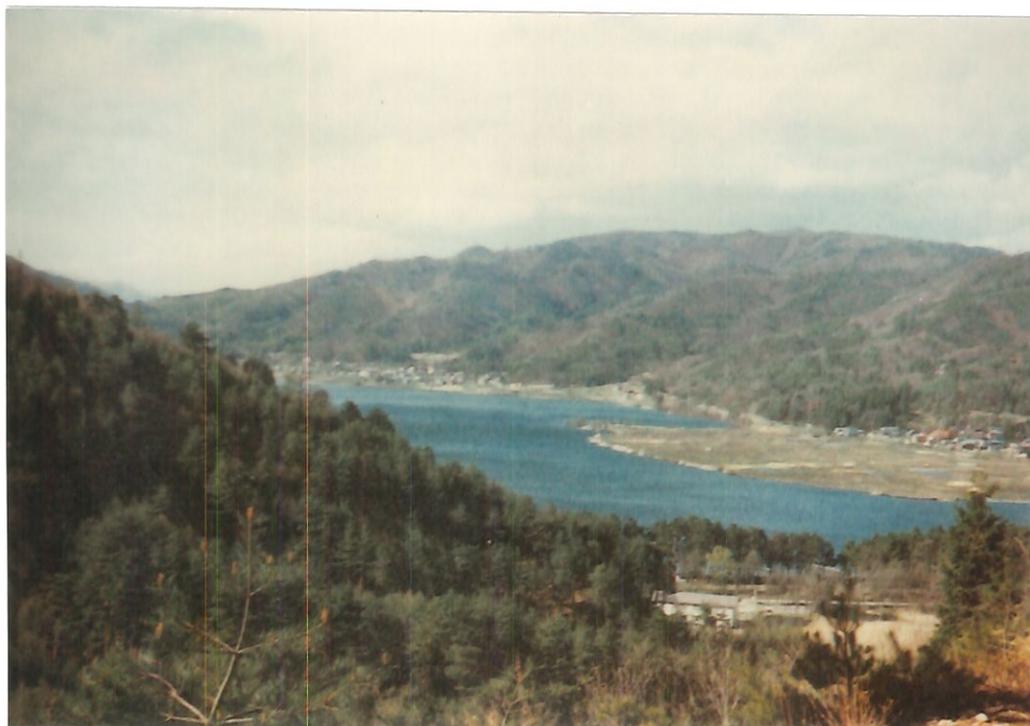


FIGURA 4 - Vista geral do Lago Kizaki. Foto de T. Sugiura, extraída de NIRA (1984).



FIGURA 5 - Momento da coleta de amostra de água no Lago Kizaki em outubro de 1996.

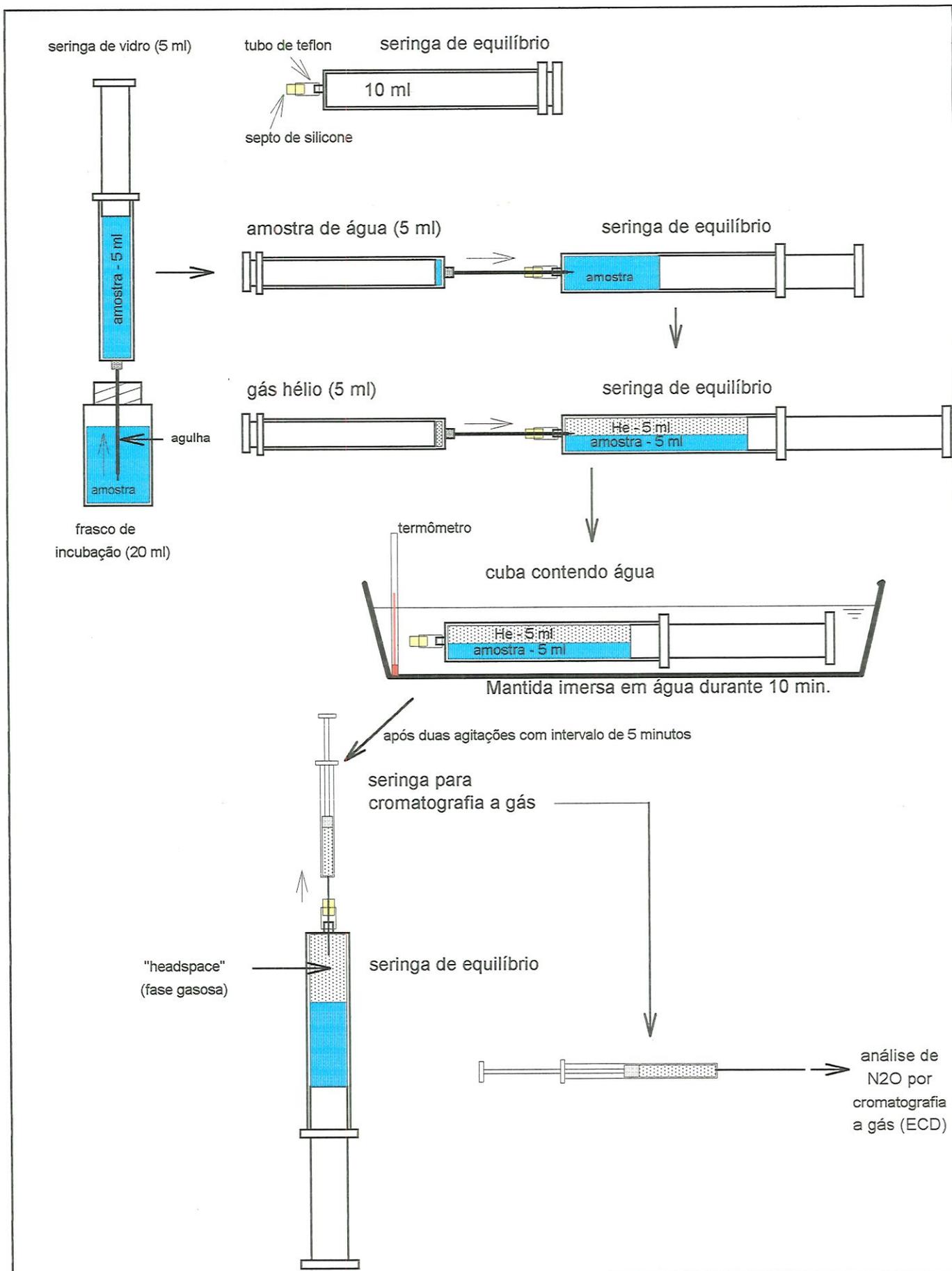


FIGURA 6 - Amostragem para análise de N₂O por cromatografia a gás, baseada na metodologia de Yoh et al. (1990).

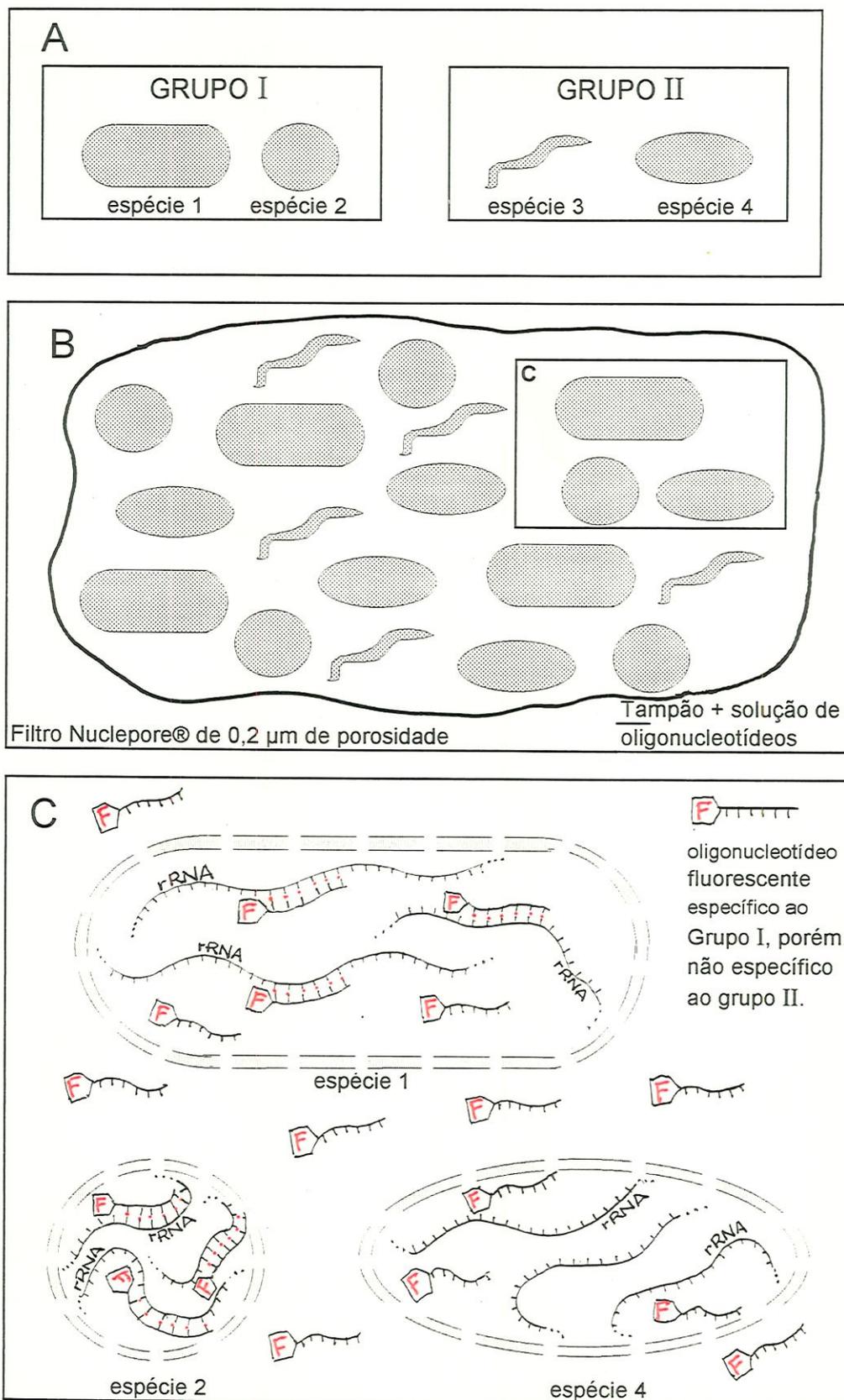


FIGURA 7 - Ilustração simplificada da técnica de hibridização fluorescente in situ. A) Dois grupos imaginários de bactérias compostos por espécies de diferentes morfotipos; B) Células sobre filtro em contato com oligonucleotídeos específicos ao Grupo I; C) Quadro ampliado de células com rRNA, ilustrando as espécies 1 e 2 hibridizadas (Grupo I) e espécie 4 não hibridizada (Grupo II).

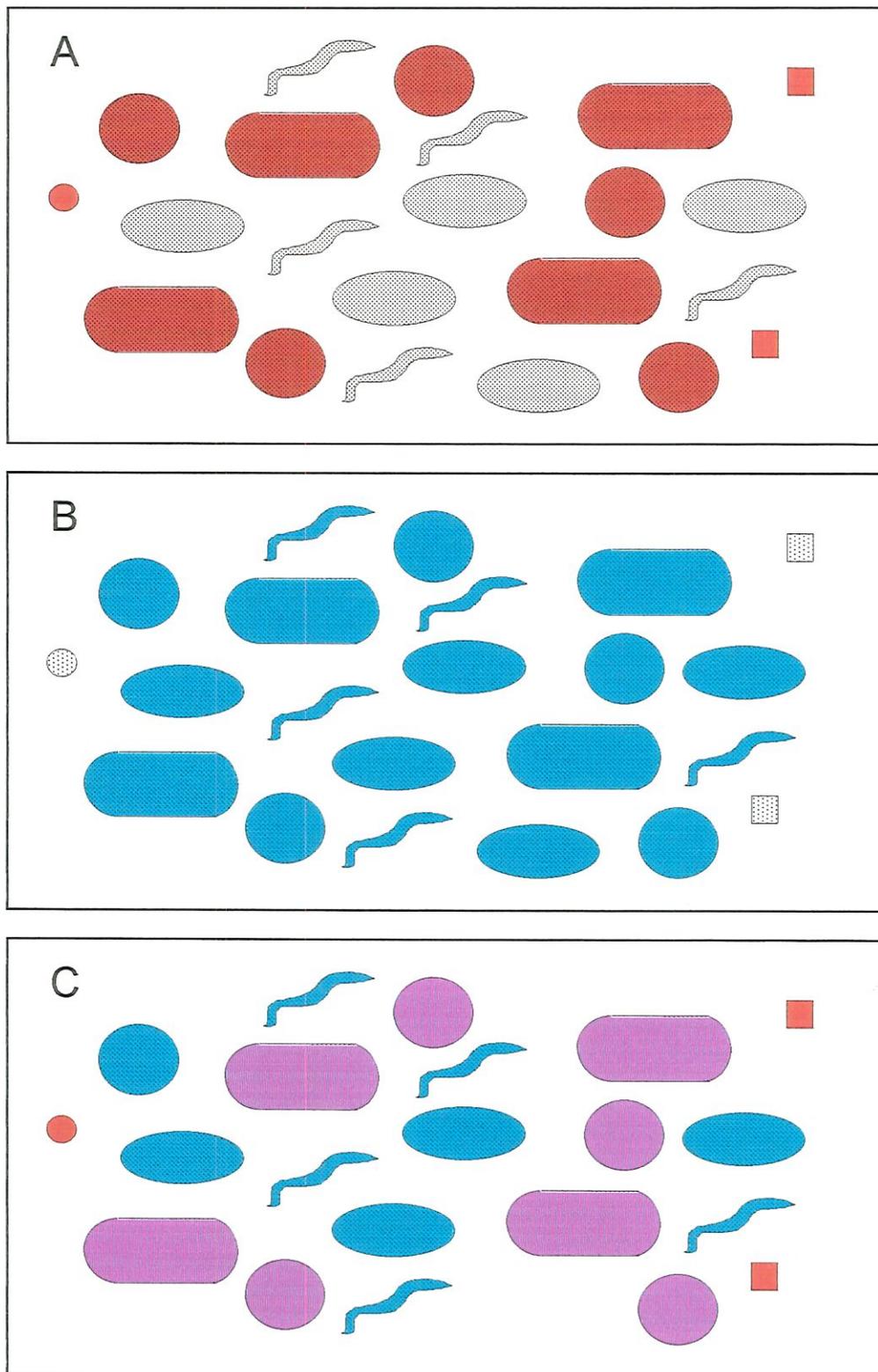


FIGURA 8 - Células bacterianas sobre filtro após ser tratadas para hibridização com oligonucleotídeos fluorescentes específicos ao rRNA do Grupo I e posteriormente coradas com DAPI. A) excitadas com luz específica para TRITC, indicando células hibridizadas em vermelho; B) excitadas com luz específica para DAPI, indicando a totalidade das células em azul; C) imagens de A e B sobre postas no monitor de vídeo, indicando a existência de partículas fluorescentes de origem não-celular em vermelho.

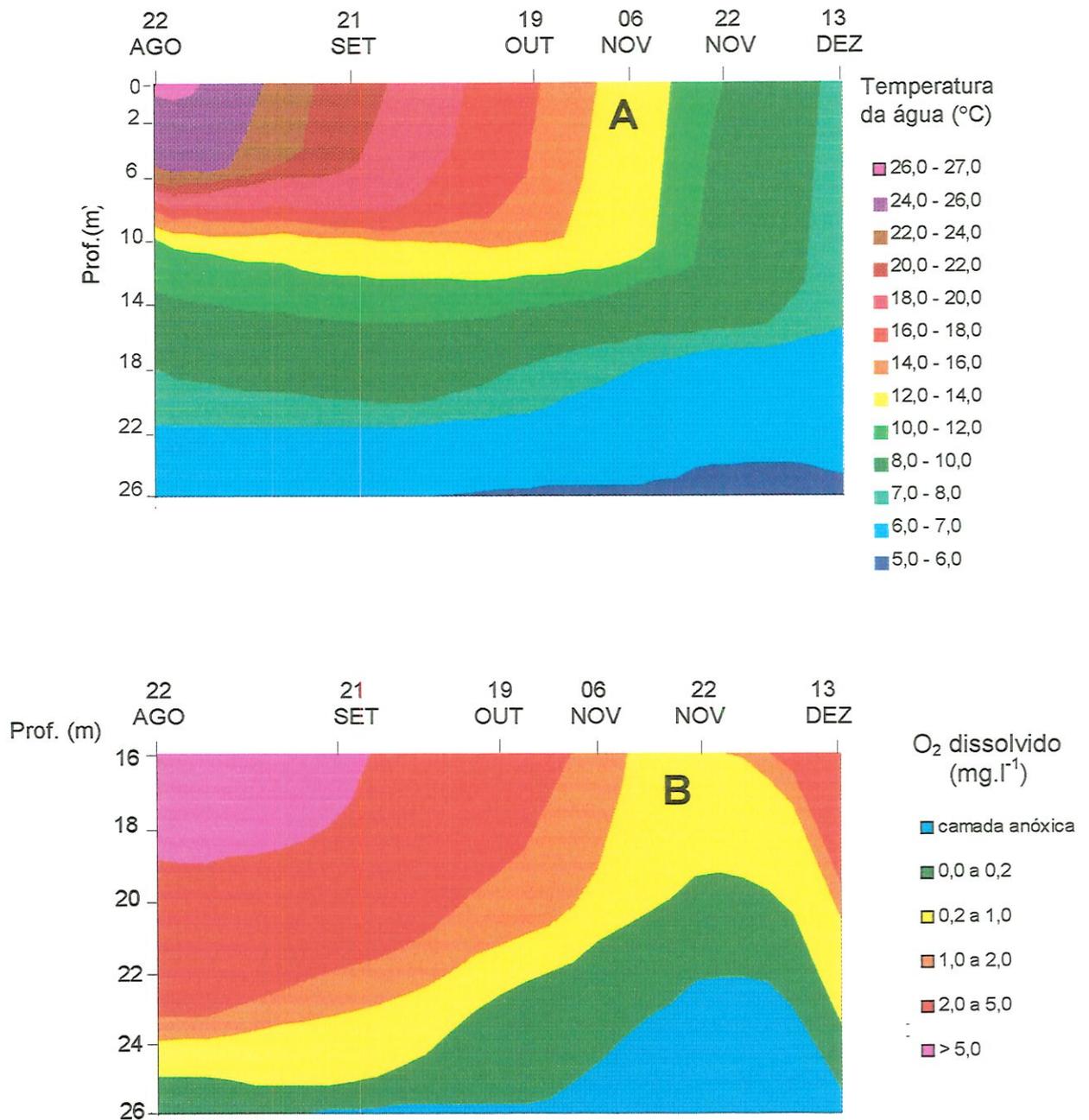


FIGURA 9 - Variação temporal da temperatura (A) e da concentração de oxigênio dissolvido (B) no hipolímnio do Lago Kizaki, no período de agosto a dezembro de 1996.

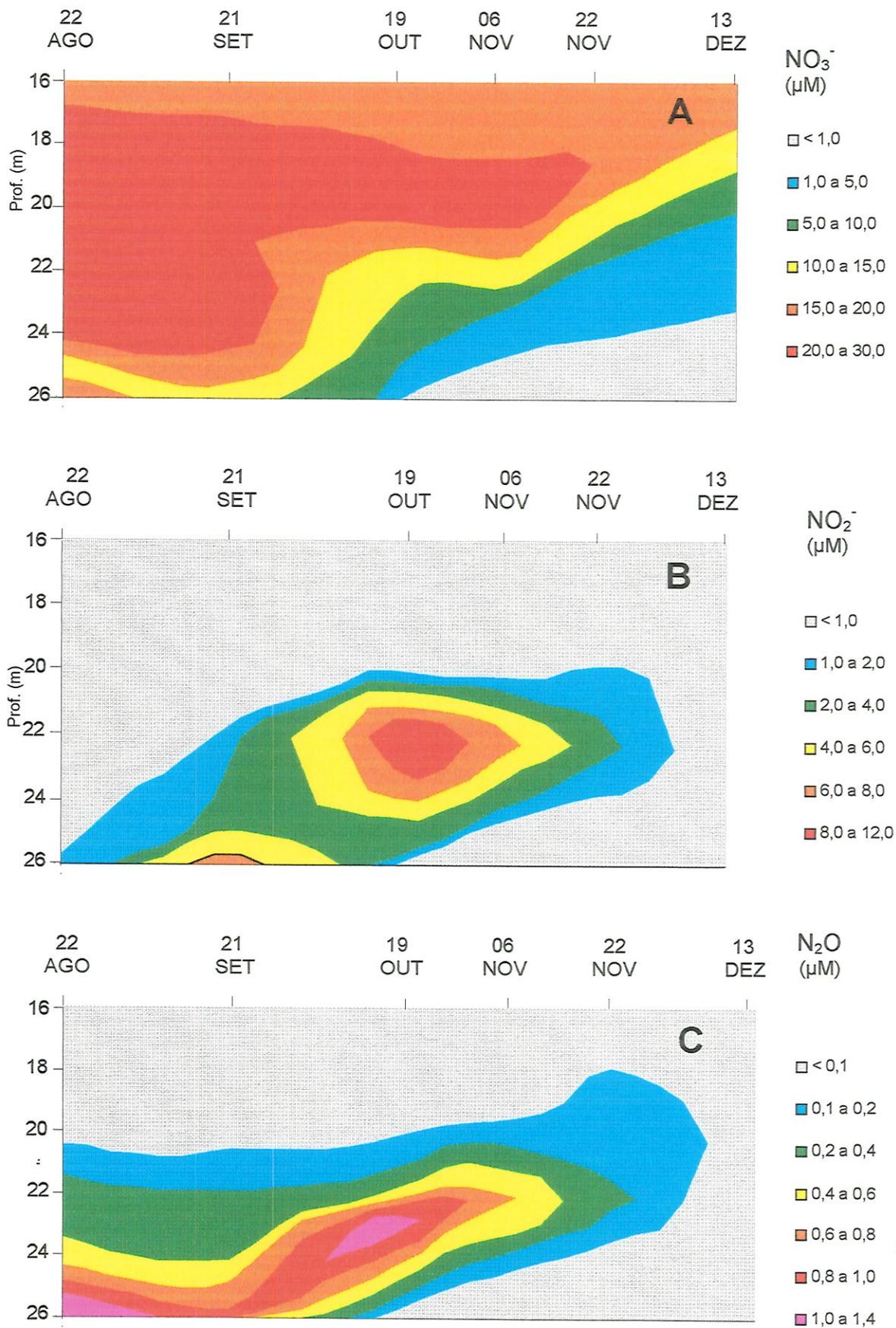


FIGURA 10 - Variação temporal de NO₃⁻ (A), NO₂⁻ (B) e N₂O (C) no hipolímnio do Lago Kizaki, no período de 22 de agosto a 13 de dezembro de 1996.

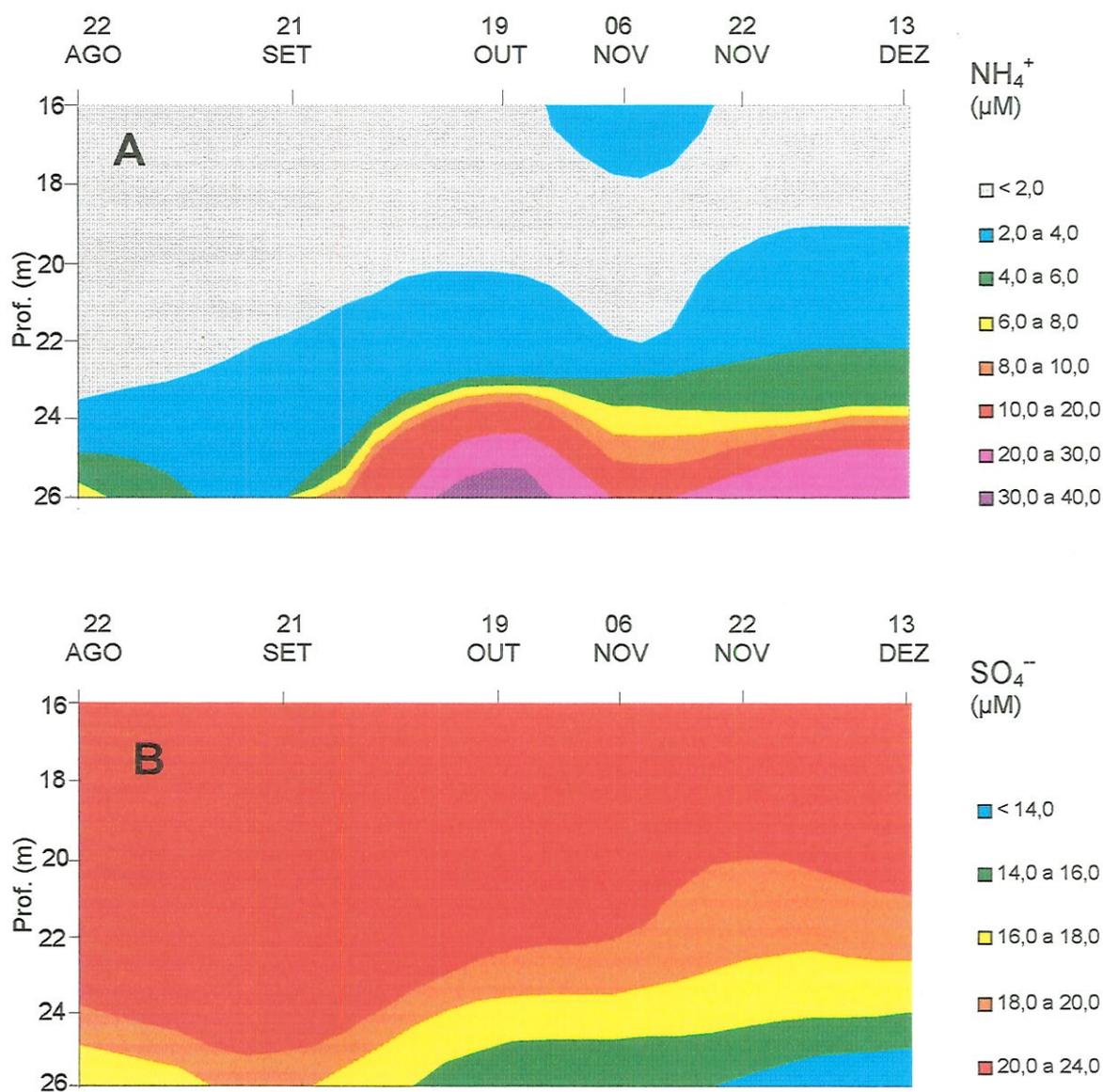


FIGURA 11 - Variação temporal de NH_4^+ (A) e SO_4^- (B) no hipolímnio do Lago Kizaki, no período de agosto a dezembro de 1996.

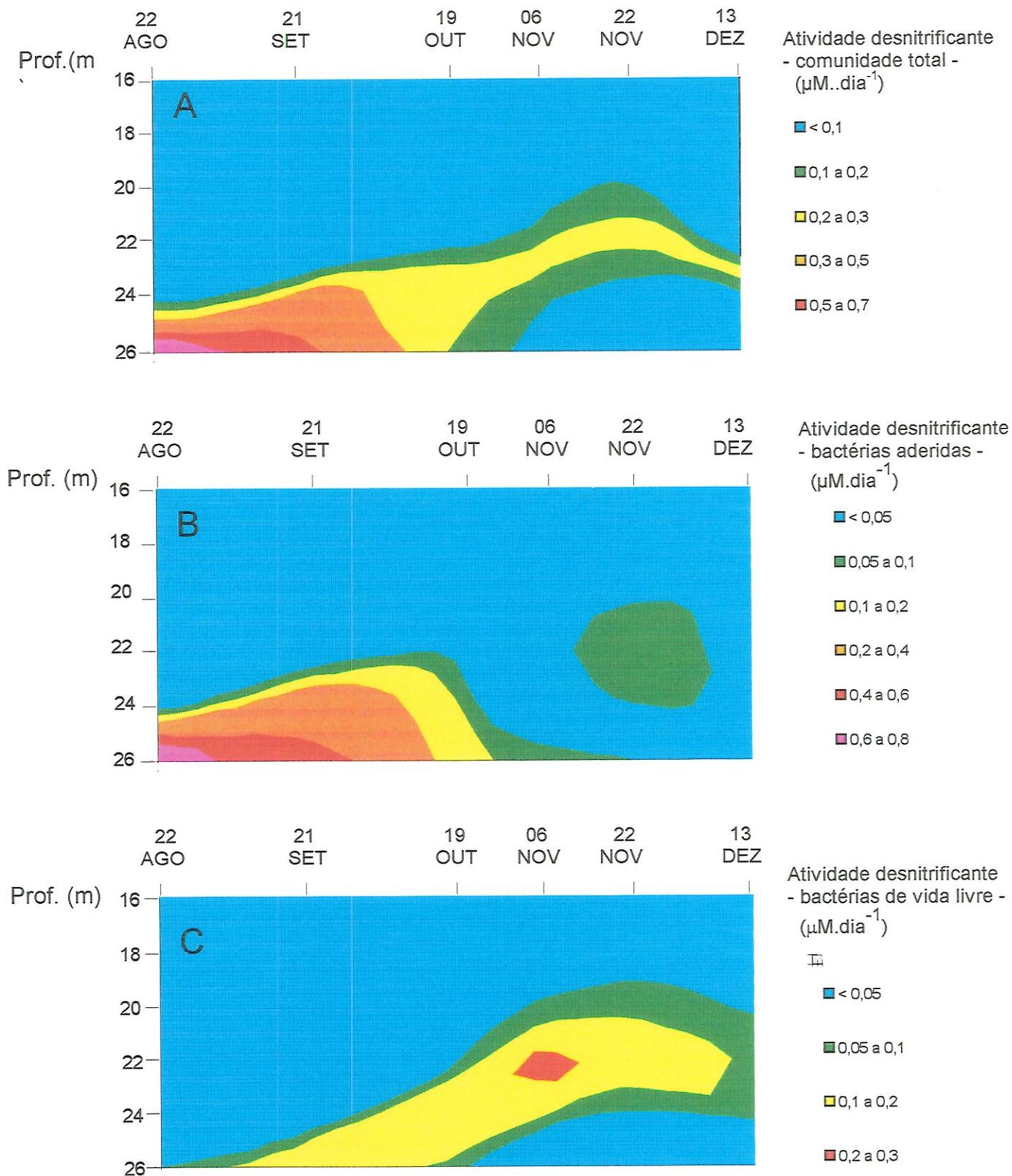


FIGURA 12 - Variação temporal da atividade desnitrificante da comunidade total (A), das bactérias aderidas às partículas (B) e bactérias de vida livre (C) no hipolímnio do Lago Kizaki, no período entre agosto e dezembro de 1996.

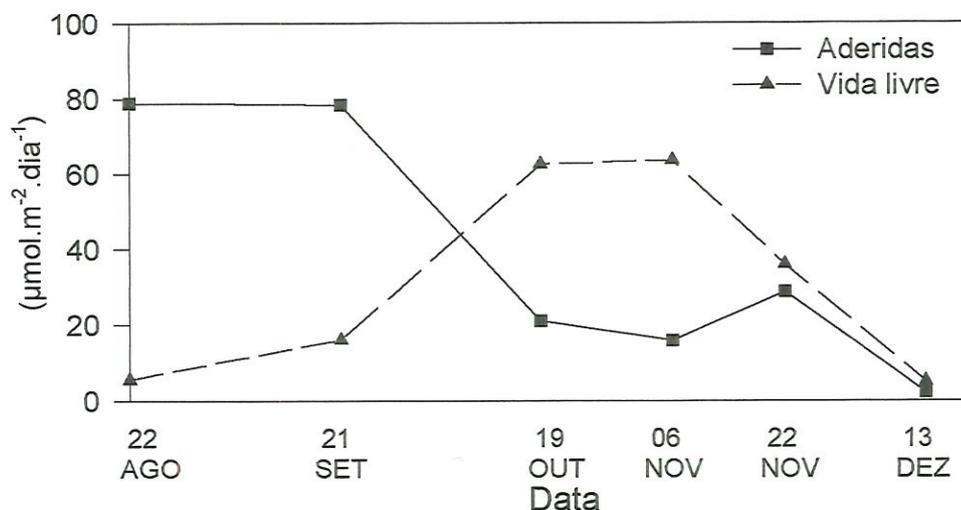


FIGURA 13 - Variação temporal da atividade desnitrificante integrada na coluna de água do Lago Kizaki, correspondente às bactérias aderidas às partículas e às bactérias de vida livre, no período entre agosto e dezembro de 1996.

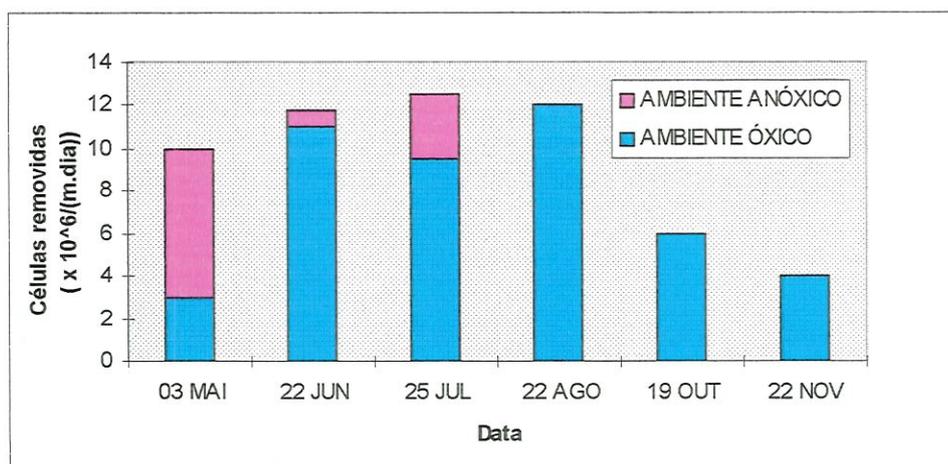


FIGURA 14 - Taxa de remoção de células bacterianas em condições óxicas (azul) e anóxicas (rosa) realizada por “grazers” menores do que $3,0\ \mu\text{m}$ de diâmetro em amostras coletadas no Lago Kizaki. Extraído de ABE et al. (1998)*.

* ABE, D.S.; G-TOTH, L.; KATO, K. (Universidade de Shinshu, Japão).
/A ser submetido para publicação/.

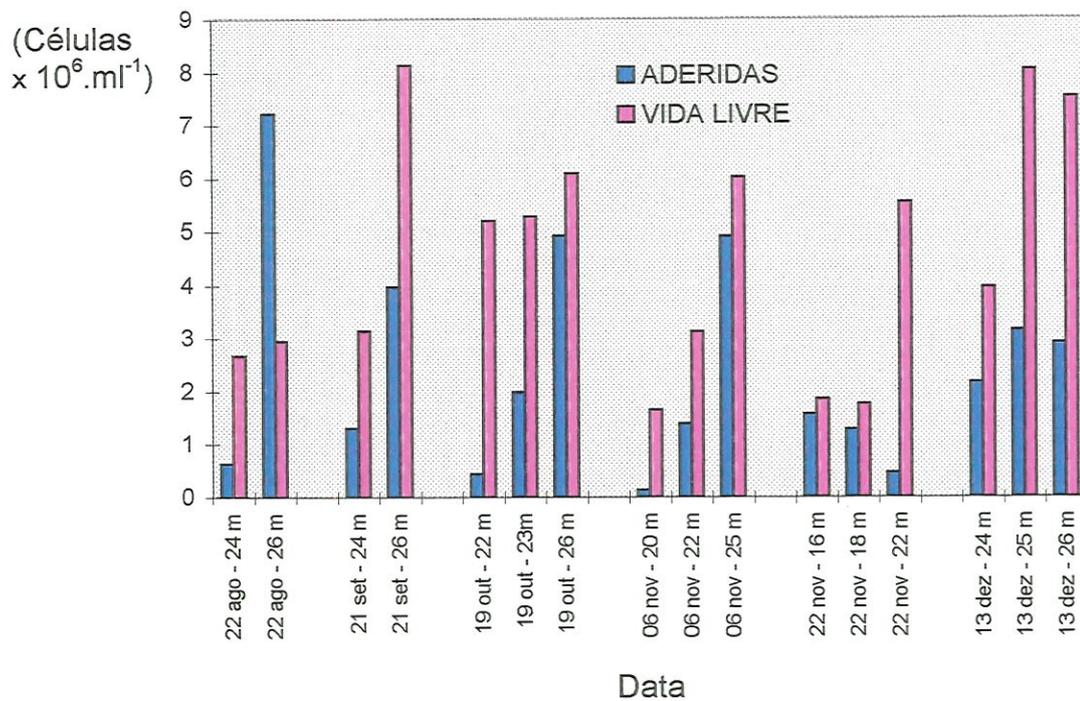


FIGURA 15 - Número de bactérias aderidas às partículas (azul) e de bactérias de vida livre (rosa) em amostras coletadas no hipolímnio do Lago Kizaki, entre agosto e dezembro de 1996.

BACTÉRIAS ADERIDAS

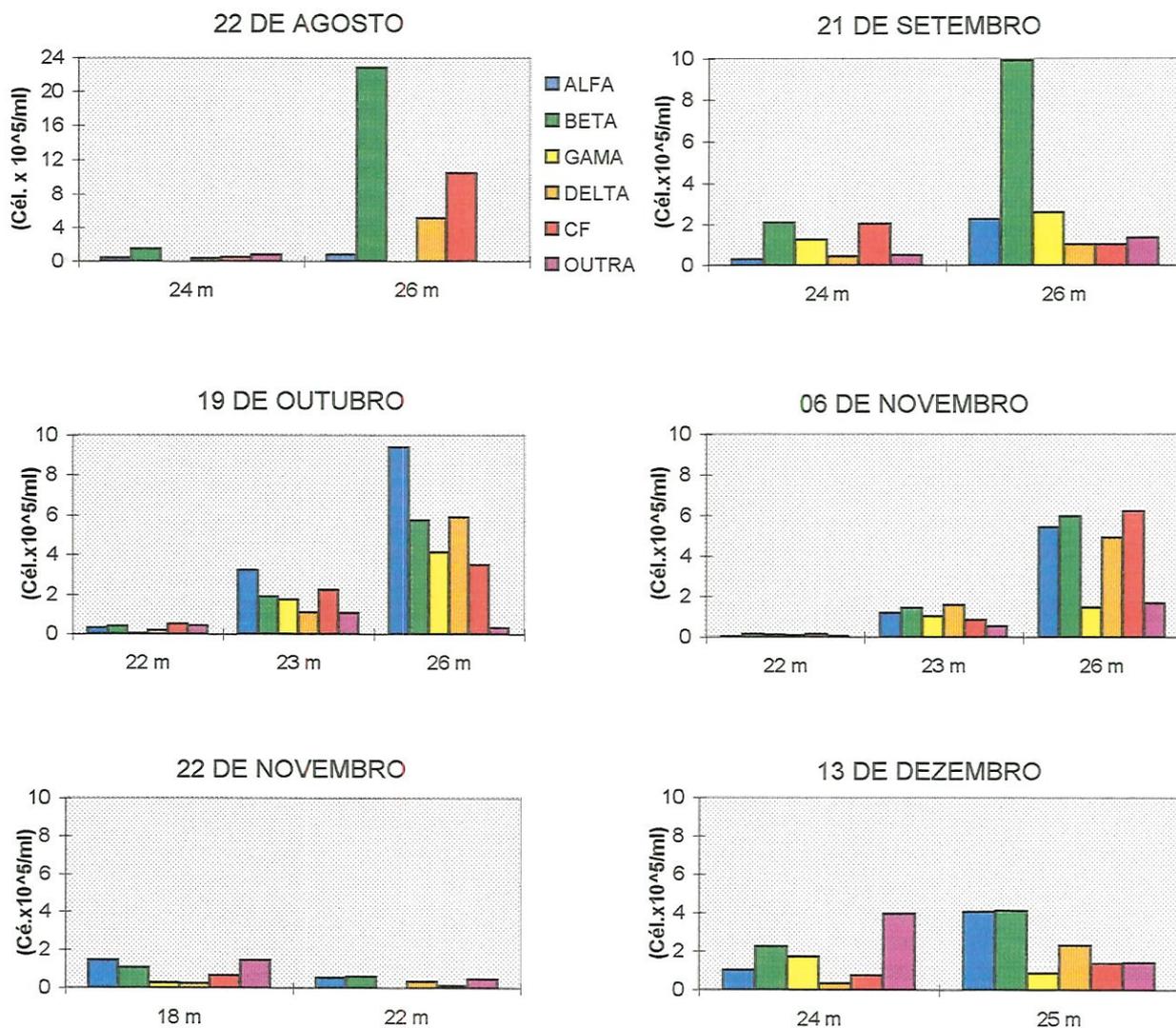


FIGURA 16 - Ocorrência de bactérias aderidas às partículas correspondentes aos grupos filogenéticos estudados pela técnica de hibridização fluorescente in situ em amostras do hipólímnio do Lago Kizaki, no período de agosto a dezembro de 1996.

ALFA: subclasse alfa da classe Proteobacteria; BETA: subclasse beta da classe Proteobacteria; GAMA: subclasse gama da classe Proteobacteria; DELTA: subclasse delta da classe Proteobacteria; CF: grupo Cytophaga/Flavobacterium; OUTRAS: células pertencentes ao domínio Bacteria, porém, não pertencentes a nenhum dos grupos estudados.

BACTÉRIAS ADERIDAS

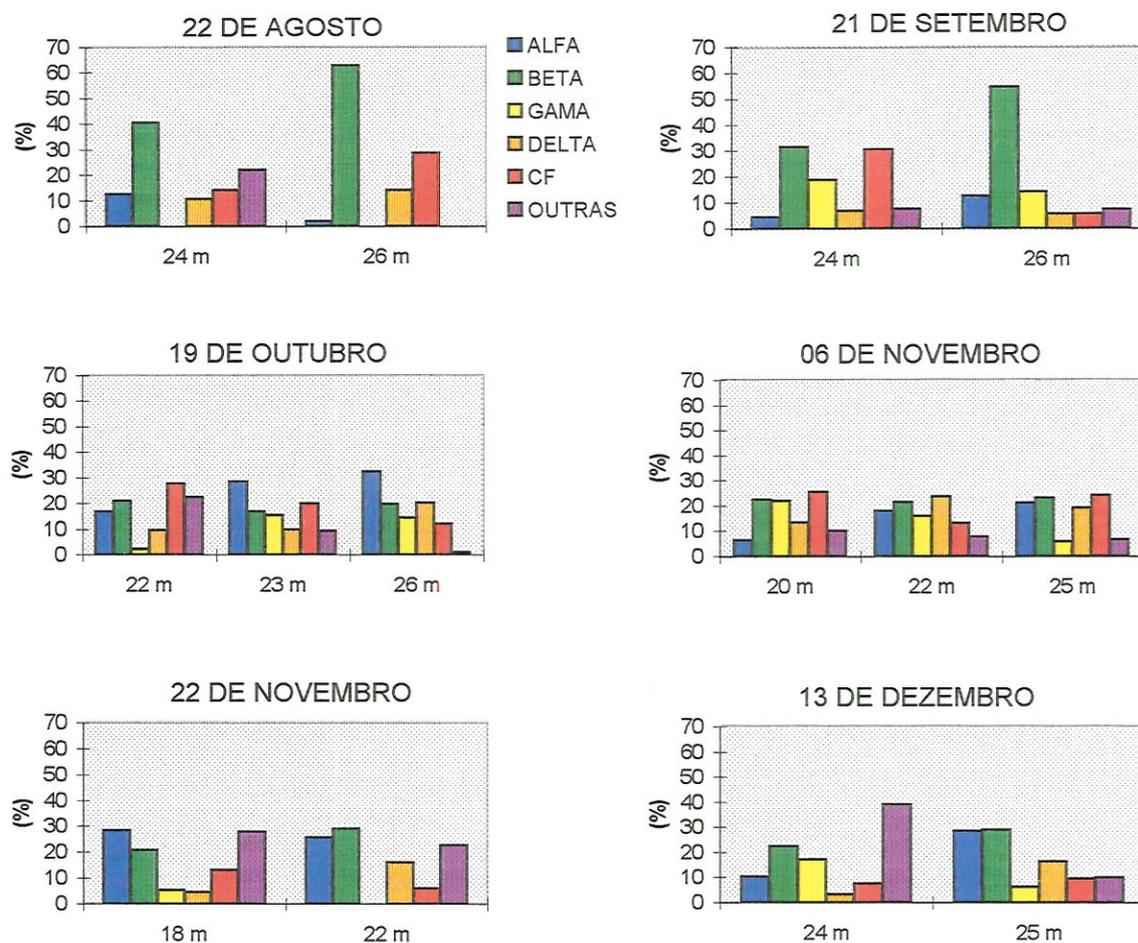


Figura 17 - Porcentagem de ocorrência dos grupos de bactérias aderidas às partículas detectados pela técnica de hibridização *in situ* em amostras do Lago Kizaki, 1996.

ALFA: subclasse alfa da classe Proteobacteria; BETA: subclasse beta da classe Proteobacteria; GAMA: subclasse gama da classe Proteobacteria; DELTA: subclasse delta da classe Proteobacteria; CF: grupo Cytophaga/Flavobacterium; OUTRAS: células pertencentes ao domínio Bacteria, porém, não pertencentes a nenhum dos grupos estudados.

(%): porcentagem em relação às células detectadas com oligonucleotídeos específicos ao domínio *Bacteria*

BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE

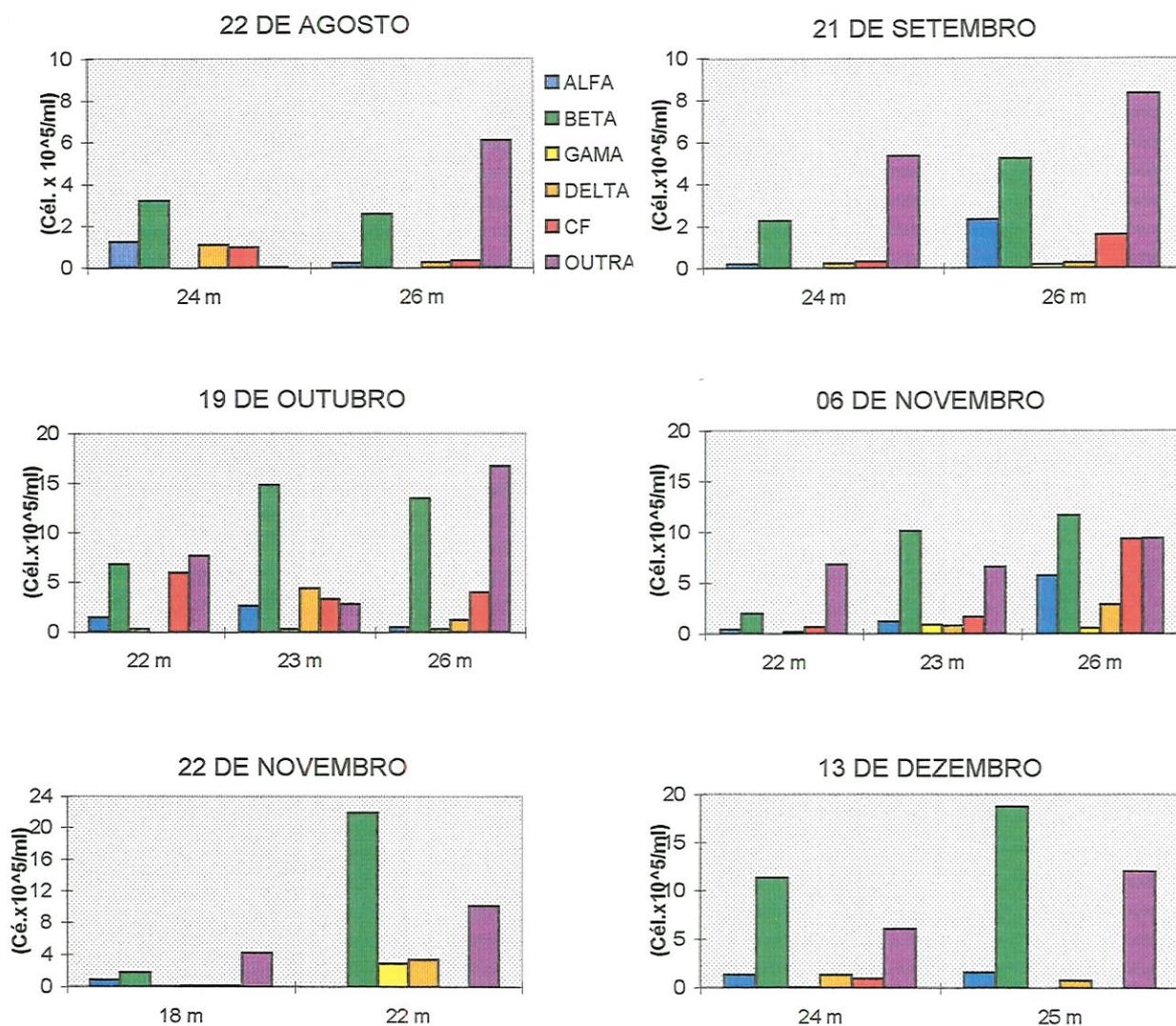


FIGURA 18 - Ocorrência de bactérias de vida livre correspondentes aos grupos filogenéticos estudados pela técnica de hibridização fluorescente in situ em amostras do hipolímnio do Lago Kizaki, no período de agosto a dezembro de 1996.

ALFA: subclasse alfa da classe Proteobacteria; BETA: subclasse beta da classe Proteobacteria;
 GAMA: subclasse gama da classe Proteobacteria; DELTA: subclasse delta da classe Proteobacteria;
 CF: grupo Cytophaga/Flavobacterium; OUTRAS: células pertencentes ao domínio Bacteria, porém, não pertencentes a nenhum dos grupos estudados.

BACTÉRIAS DE VIDA LIVRE

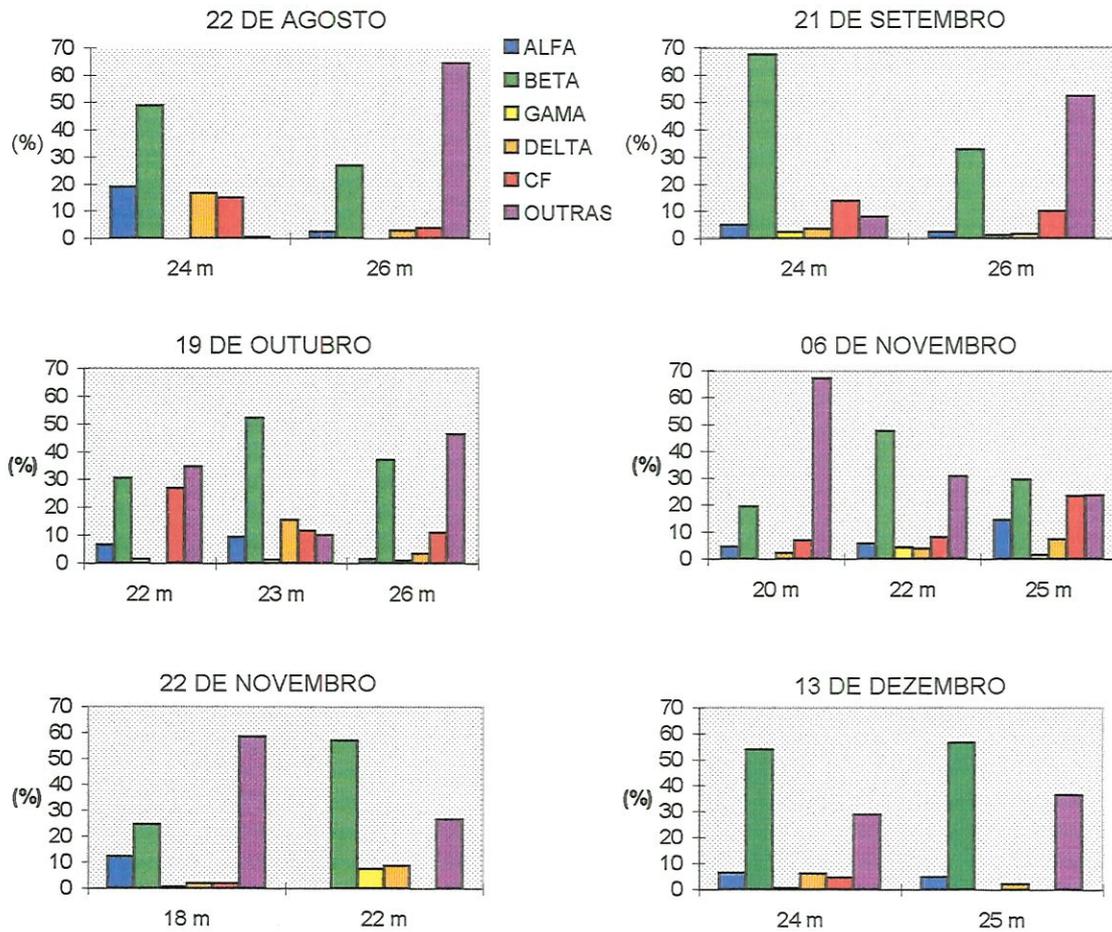
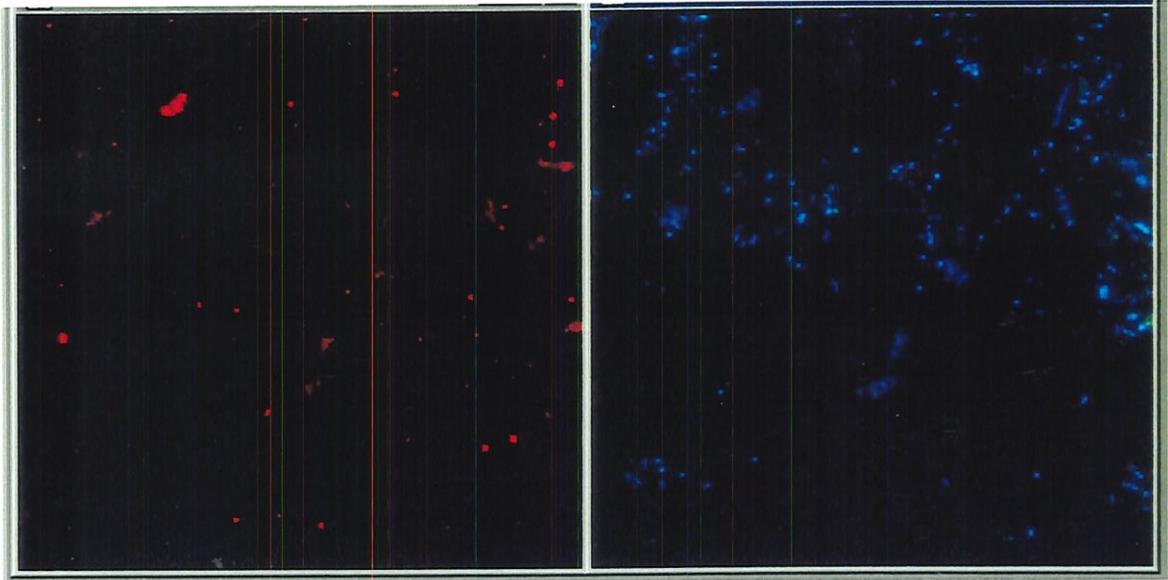


Figura 19 - Porcentagem de ocorrência dos grupos de bactérias de vida livre detectados pela técnica de hibridização *in situ* em amostras do Lago Kizaki, 1996.

ALFA: subclasse alfa da classe Proteobacteria; BETA: subclasse beta da classe Proteobacteria; GAMA: subclasse gama da classe Proteobacteria; DELTA: subclasse delta da classe Proteobacteria; CF: grupo Cytophaga/Flavobacterium; OUTRAS: células pertencentes ao domínio Bacteria, porém não pertencentes a nenhum dos grupos estudados.

(%) : porcentagem em relação às células detectadas com oligonucleotídeos específicos ao domínio *Bacteria*

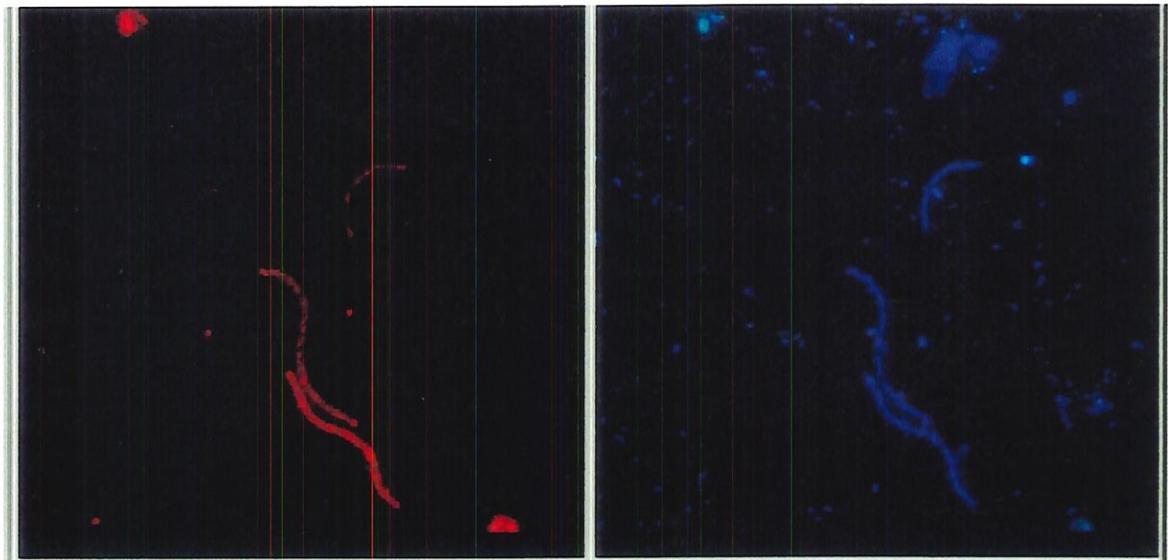
22 DE AGOSTO DE 1996 - 26 m



alfa Proteobacteria

DAPI

22 DE AGOSTO DE 1996 - 26 m



beta Proteobacteria

DAPI

FIGURA 20 - Imagens obtidas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ*. Esquerda: células hibridizadas (em vermelho); direita: células coradas com DAPI (em azul).

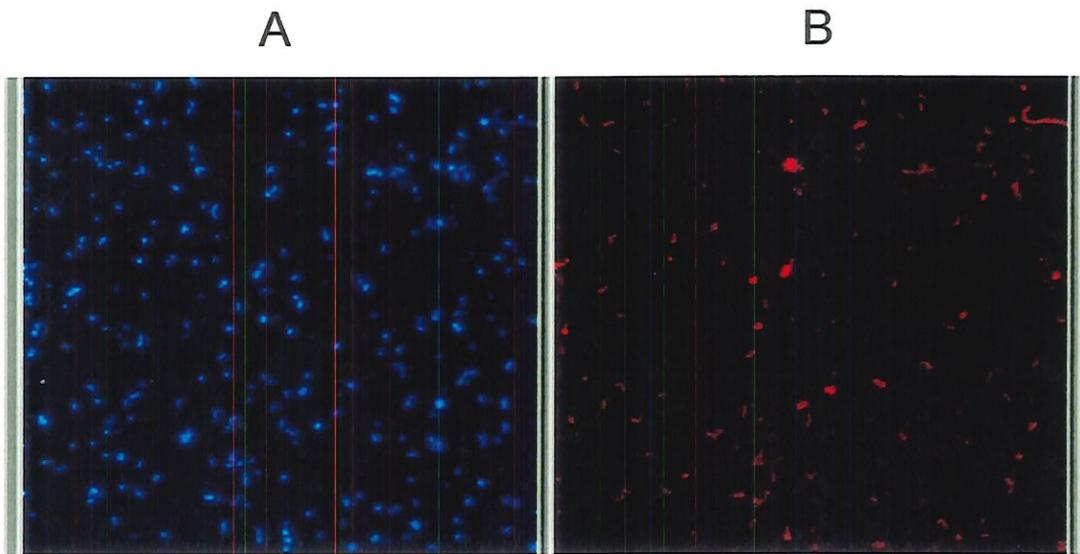


FIGURA 21 - Imagens de bactérias de vida livre coradas com DAPI (azul; A) e hibridizadas com oligonucleotídeos específicos ao domínio *Bacteria* marcados com TRITC (vermelho; B), correspondentes ao mesmo campo microscópico. Amostra do Lago Kizaki coletada a 22 m de profundidade no dia 22 de novembro de 1996.

TABELAS

Tabela 1 - Dados mensais de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, nitrogênio total, fósforo total e carbono orgânico dissolvido (COD) na subsuperfície (0,5 m) e fundo (29 m) do lago Kizaki, referentes ao ano de 1985. Extraído de ILEC (1993).

Mês	Prof.(m)	Temper. (°C)	pH	O ₂ Diss. (mg.l ⁻¹)	N - total (mg.l ⁻¹)	P - total (mg.l ⁻¹)	COD (mg.l ⁻¹)
Janeiro	0,5	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-
Fevereiro	0,5	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-
Março	0,5	-	-	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	-	-
Abril	0,5	11,5	7,4	11	0,47	0,012	2,3
	29	6,8	6,6	8,5	0,71	0,009	1,5
Maio	0,5	14,4	7,3	10	0,49	0,015	2,1
	29	5,4	6,6	8,6	0,72	0,009	1,1
Junho	0,5	19,7	9,2	9,9	0,36	0,007	3,0
	29	5,7	6,5	6,1	0,90	0,015	1,8
Julho	0,5	20,7	7,2	9,6	0,27	0,005	1,2
	29	5,8	6,4	3,1	0,88	0,011	1,3
Agosto	0,5	28,0	7,5	8,5	0,29	0,035	1,6
	29	5,8	7,6	0,8	0,58	0,005	0,8
Setembro	0,5	21,1	7,4	8,6	0,19	0,006	1,3
	29	5,9	6,4	0,9	0,56	0,010	1,1
Outubro	0,5	16,1	7,7	9,4	0,14	0,005	< 0,5
	29	5,9	6,5	1,0	0,44	< 0,003	1,6
Novembro	0,5	9,9	7,8	9,5	0,15	0,004	1,0
	29	5,9	7,8	0,2	1,2	0,057	2,3
Dezembro	0,5	5,9	6,8	8,9	0,44	0,008	0,9
	29	5,7	6,8	6,2	0,47	0,008	1,0

Tabela 2 - Variações mensais de clorofila na coluna de água do Lago Kizaki. Dados obtidos em 1981. Extraído de ILEC (1993).

Prof.(m)	Concentração de clorofila ($\mu\text{g.l}^{-1}$)											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
0	-	-	-	-	0,5	-	0,5	2,1	6,4	7,8	0,4	2,1
2	-	-	-	-	1,0	-	1,8	1,7	6,0	14,6	1,0	2,0
5	-	-	-	-	0,9	-	4,4	0,9	1,8	1,3	1,2	2,2
10	-	-	-	-	0,5	-	2,7	0,9	0,5	0,6	0,7	2,1
20	-	-	-	-	0,5	-	1,0	0,3	0,4	1,1	0,5	1,0

Tabela 3 - Variações anuais de temperatura e precipitação na região do Lago Kizaki. Dados referentes ao período entre 1972 a 1980 (ILEC 1993).

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Anual
Temperatura média ($^{\circ}\text{C}$)	-3,5	-3,4	0,2	7,1	13,0	17,1	21,0	21,5	17,1	11,0	4,8	-0,5	8,8
Precipitação (mm)	184	171	148	160	136	218	180	179	164	112	144	157	1953

Tabela 4 - Principais entradas de nitrogênio e fósforo no Lago Kizaki. Dados referentes ao ano de 1982 (ILEC 1993).

	Fontes (toneladas/ano)			Total
	Industriais	Naturais	Outras	
N total	0	7,2	11,29	18,49
P total	0	0,34	0,66	1,00

TABELA 5 - Principais membros e ocorrência dos grupos de bactéria caracterizados pela técnica de hibridização *in situ* no presente trabalho.

Grupo	Principais membros	Ocorrência
Alfa Proteobacteria	Família Rhizobiaceae, gêneros <i>Paracoccus</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> (Weiss et al. 1996). Alguns membros da subclasse delta da classe <i>Proteobacteria</i> .	Em ambientes marinhos: como bactérias de vida livre (Pacífico Norte Central; DeLong et al. 1993). Em macroagregados do Lago Constance: 11 a 25% de Bacteria (Weiss et al. 1996). Em lodo ativado: 10% de Bacteria (Wagner et al. 1993). Em lago de alta montanha: 8 a 16 % de Bacteria (Alfreider et al. 1996).
Beta Proteobacteria	Gêneros <i>Comamonas</i> , <i>Hydrogenophaga</i> e <i>Acidovorax</i> (todos previamente tidas como pertencentes ao gênero <i>Pseudomonas</i>); <i>Alcaligenes</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Chromobacterium</i> , maioria das bactérias amônio-oxidantes (Weiss et al. 1996).	Em lodo ativado: 42 % de Bacteria (Wagner et al. 1993). Em biofilmes de sistemas de tratamento de água (Neef et al. 1996). Em macroagregados do Lago Constance: 27-42% de Bacteria (Weiss et al. 1996). Em lago de alta montanha: 6,5 a 11,6 % de Bacteria (Alfreider et al. 1996).
Gama Proteobacteria	Gêneros <i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Legionella</i> , <i>Vibrio</i> , família Enterobacteriaceae e as verdadeiras <i>Pseudomonadas</i> (Weiss et al. 1996).	Em ambiente marinho: como bactérias de vida livre e bactérias agregadas (DeLong et al. 1993) Em biofilmes de sistemas de tratamento de água (Neef et al. 1996). Em macroagregados do lago Constance: 9 a 33 % de Bacteria (Weiss et al. 1996). Em lodo ativado: 34 % de Bacteria (Wagner et al. 1993). Em lago de alta montanha: 0.4 a 1.3 % de Bacteria (Alfreider et al. 1996).
Delta Proteobacteria	Maioria das bactérias redutoras de sulfato (<i>Desulfomonas</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacterium</i>) (Amann et al. (1992).	células em forma de longos bastonetes na parte superior da termoclina de um fiorde estratificado, e células grandes elipsóides nas partes mais profundas (Ramsing et al. 1996). Em biofilmes de sistema de tratamento de água (Amann et al. 1992).
Grupo Cytophaga/ Flavobacterium	Gêneros <i>Cytophaga</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Flexibacter</i> , <i>Flexithrix</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Riemerella</i> , <i>Saprospira</i> (Manz et al. (1996).	Principais bactérias aderidas às partículas em ambientes marinhos (DeLong et al. 1993). Lago de alta montanha: 5 - 9 % de Bacteria (Alfreider et al. 1996).

TABELA - 6. Seqüência de bases dos oligonucleotídeos, sítios do rRNA, especificidade e concentrações de formamida empregadas na técnica de hibridização fluorescente in situ, para amostras de bactérias do hipolímnio do Lago Kizaki, Japão.

Oligo-nucleotídeo	Seqüência de bases†	sítio do rRNA*	Especificidade	Concentração de formamida
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355	Domínio <i>Bacteria</i> (controle positivo)	20
ALFA	CGTTCGYTCTGAGCCAAG	16S, 19-35	Subclasse alfa da classe <i>Proteobacteria</i> , vários membros da subclasse delta da classe <i>Proteobacteria</i> , vários <i>Spirochetas</i>	20
BETA	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	Subclasse beta da classe <i>Proteobacteria</i>	35
GAMA	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	Subclasse gama da classe <i>Proteobacteria</i>	35
DELTA	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S, 385-402	Maioria dos membros da subclasse delta da classe <i>Proteobacteria</i> , algumas bactérias gram-positivas	35
CF	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	Grupo Cytophaga-Flavobacterium do filo CRB	35
NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	-	controle negativo	20

† Seqüências de base obtidas em AMANN et al. (1995).

* Numeração baseada no rRNA de *E. coli*, de acordo com BROSIUS et al. (1981).



TABELA 7 - Variáveis físicas, químicas, atividade desnitrificante e número de bactérias no Lago Kizaki, 1996.

Data	Prof. (m)	OD (mg/l)	pH	Cond. ($\mu\text{S/cm}$)	DOC (mg/l)	POC (mg/l)	NH ₄ ⁺ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)	NO ₃ ⁻ (μM)	N ₂ O (μM)	SO ₄ ⁻ (μM)	PO ₄ ⁻ (μM)	Atividade desnitrificante ($\mu\text{mol-N.l}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)				Número de bactérias (células.10 ⁶ .ml ⁻¹)					
													total	aderidas	(%)	vida liv. (%)	total	aderidas	(%)	vida liv. (%)		
22 ago	24	0,58	6,15	53	2,15	0,72	2,14	0,19	21,85	0,438	20,07	0,54	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	3,31	0,64	19	2,67	81
	26	0,20	6,11	60	1,88	1,34	6,59	1,26	6,41	1,399	17,76	0,43	0,844	0,788	93	0,056	7	10,16	7,22	71	2,94	29
21 set	24	0,41	6,20	50	1,26	0,86	3,09	2,37	22,5	0,383	20,44	0,32	0,372	0,360	97	0,012	3	4,44	1,30	29	3,14	71
	26	0,32	6,03	53	1,56	1,23	2,62	6,88	14,43	0,862	19,78	0,43	0,572	0,424	74	0,148	26	12,10	3,97	33	8,13	67
19 out	22	0,66	5,88	49	1,60	0,39	4,03	10,13	10,35	0,287	20,17	0,27	0,054	0,006	11	0,048	89	5,64	0,44	8	5,20	92
	23	0,34	5,89	51	1,69	0,62	1,83	8,99	8,33	1,212	19,68	0,22	0,244	0,012	5	0,232	95	7,27	1,99	27	5,28	73
	26	0,00	6,10	73	2,61	0,65	41,32	0,34	0,29	0,096	14,76	0,32	0,214	0,122	57	0,092	43	11,01	4,92	45	6,09	55
06 nov	20	1,16	6,35	50	1,74	0,54	1,78	0,02	21,94	0,069	20,80	0,27	0,088	0,024	27	0,064	73	1,79	0,13	7	1,65	93
	22	0,47	6,13	52	1,68	0,91	1,78	6,57	13,58	0,782	20,16	0,27	0,268	0,044	16	0,224	84	4,59	1,39	30	3,12	70
	25	0,00	6,1	81	2,57	1,47	11,77	0,11	0,16	0,047	14,30	0,43	0,024	0,016	67	0,008	33	10,93	4,91	45	6,02	55
22 nov	16	0,69	5,87	49	1,67	0,62	0,99	0,03	17,26	0,069	21,29	0,32	0,020	0,012	60	0,008	40	3,42	1,57	46	1,85	54
	18	0,60	5,82	50	1,80	0,24	1,57	0,08	19,41	0,131	21,11	0,38	0,024	0,008	33	0,016	67	3,04	1,28	42	1,76	58
	22	0,19	5,83	56	1,65	0,52	3,92	2,4	3,24	0,222	18,51	0,32	0,248	0,096	39	0,152	61	6,01	0,47	8	5,54	92
13 dez	24	0,22	6,13	-	1,62	1,00	7,63	0,01	0,11	0,028	16,50	0,27	0,092	0,024	26	0,068	74	6,13	2,17	35	3,96	65
	25	0,04	6,08	-	1,71	0,99	21,55	0,04	0,14	0,016	14,42	0,49	0,018	0,006	33	0,012	67	11,18	3,15	28	8,03	72
	26	0,00	6,07	-	2,05	1,12	26,31	0,00	0,17	0,020	11,92	1,03	0,016	0,008	50	0,008	50	10,43	2,91	28	7,52	72

OD: oxigênio dissolvido, determinado pelo método de Winkler; Cond: condutividade elétrica da água;
n.d.: não detectada.

TABELA 8 - Eficiência de hibridização do controle positivo (EUB338) e porcentagem de hibridizações não-específicas com o controle negativo (NON338) obtidas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* aplicada às amostras do hipolímnio do Lago Kizaki coletadas em 1996.

Data	Prof.(m)	EUB338 (% DAPI)				NON338 (% DAPI)			
		aderidas	D.P.	vida livre	D.P.	aderidas	D.P.	vida livre	D.P.
22 Ago	24	57,1	13,6	24,7	5,6	3,3	2,5	2,0	1,2
	26	50,2	7,8	32,2	3,8	2,3	0,5	2,2	0,7
21 Set	24	50,7	2,0	26,4	5,3	1,4	0,2	1,5	0,7
	26	45,7	1,6	19,6	1,3	1,3	0,0	2,2	0,4
19 Out	22	43,6	8,9	42,5	4,3	1,7	0,9	0,7	0,0
	23	56,4	3,3	53,6	2,2	1,1	0,3	0,6	0,3
	26	58,9	1,1	59,4	4,4	2,4	0,0	0,5	0,0
06 Nov	20	46,7	4,8	61,4	3,3	1,4	0,3	0,0	0,0
	22	47,9	1,6	68,0	0,0	1,2	0,0	0,4	0,2
	25	52,4	3,0	65,7	2,9	1,6	0,0	0,3	0,1
22 Nov	18	40,7	0,6	40,8	0,6	1,8	0,9	1,2	0,1
	22	45,5	2,2	69,3	0,7	1,6	0,9	2,6	0,1
13 Dez	24	46,4	3,5	53,2	0,9	1,6	0,2	1,2	0,3
	25	45,1	5,0	41,3	0,7	1,4	0,4	1,9	0,5

D.P.: desvio padrão; EUB338: porcentagem de células detectadas pelo oligonucleotídeo EUB338 (controle positivo) em relação às células coradas com DAPI; NON338: porcentagem de células detectadas pelo oligonucleotídeo NON338 (controle negativo); em relação às células coradas com DAPI..

TABELA 9 - Análise de regressão múltipla passo a passo com as variáveis obtidas no Lago Kizaki entre agosto e dezembro de 1996. GL = 13.

Variável dependente: Atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas

passo	variável independente	coef.	r^2	p	% explicação
1	bactérias aderidas	+	0,527	0,01	52,7
2	NH ₄ ⁺	-	0,678	0,0004	15,1

Variável dependente: Atividade desnitrificante das bactérias de vida livre

passo	variável independente	coef.	r^2	p	% explicação
1	NO ₂ ⁻	+	0,625	0,0002	62,5
2	COD	+	0,707	0,0002	8,2

Variável dependente: concentração de N₂O "in situ"

passo	variável independente	coef.	r^2	p	% explicação
1	desnitr. vida livre	+	0,589	0,0003	58,9
2	desnitr. aderidas	+	0,839	< 0,0001	25,0

desnitr. aderidas: atividade desnitrificante das bactérias aderidas às partículas.

desnitr. vida livre: atividade desnitrificante das bactérias de vida livre.

r^2 : coeficiente de determinação múltipla; p: nível de significância.

GL: grau de liberdade.

TABELA 10 - Análise da comunidade de bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre do hipolímio do Lago Kizaki, 1996.

Data	Prof. (m)	ALFA				BETA				GAMA				DELTA				CF				OUTRAS			
		ADERIDAS		VIDA LIVRE		ADERIDAS		VIDA LIVRE		ADERIDAS		VIDA LIVRE		ADERIDAS		VIDA LIVRE		ADERIDAS		VIDA LIVRE		ADERIDAS		VIDA LIVRE	
		cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)	cél.10 ⁵ .ml ⁻¹	(%)								
22 Ago	24	0.46	12.7	1.25	18.9	1.48	40.5	3.22	48.9	0.00	0.0	0.00	0.0	0.39	10.7	1.10	16.7	0.51	14.0	0.99	15.0	0.81	22.1	0.03	0.4
	26	0.76	2.1	0.22	2.3	22.76	62.8	2.56	27.0	0.00	0.0	0.00	0.0	5.11	14.1	0.26	2.7	10.44	28.8	0.35	3.7	0.00	0.0	6.09	64.3
21 Set	24	0.28	4.3	0.19	4.8	2.08	31.6	2.24	67.5	1.25	18.9	0.00	2.4	0.45	6.9	0.22	3.6	2.02	30.6	0.31	13.7	0.51	7.7	5.33	8.0
	26	2.27	12.5	0.37	2.3	9.92	54.7	5.23	32.8	2.58	14.2	0.18	1.1	1.02	5.6	0.27	1.7	1.02	5.6	1.59	10.0	1.34	7.4	8.30	52.1
19 Out	22	0.32	16.9	1.44	6.5	0.40	21.0	6.76	30.6	0.04	2.2	0.31	1.4	0.19	9.7	0.00	0.0	0.53	27.6	5.92	26.8	0.43	22.6	7.67	34.7
	23	3.20	28.5	2.66	9.4	1.89	16.8	14.80	52.3	1.73	15.4	0.31	1.1	1.11	9.9	4.39	15.5	2.24	20.0	3.31	11.7	1.06	9.4	2.83	10.0
	26	9.39	32.4	0.51	1.4	5.74	19.8	13.46	37.2	4.14	14.3	0.29	0.8	5.91	20.4	1.23	3.4	3.48	12.0	3.98	11.0	0.32	1.1	16.71	46.2
06 Nov	20	0.04	6.4	0.45	4.4	0.14	22.5	1.98	19.5	0.13	22.1	0.00	0.0	0.08	13.5	0.21	2.1	0.15	25.5	0.69	6.8	0.06	10.0	6.80	67.1
	22	1.20	18.0	1.19	5.6	1.43	21.5	10.10	47.6	1.05	15.8	0.91	4.3	1.58	23.7	0.78	3.7	0.87	13.1	1.70	8.0	0.53	7.9	6.53	30.8
	25	5.45	21.2	5.70	14.4	5.99	23.3	11.67	29.5	1.47	5.7	0.59	1.5	4.91	19.1	2.89	7.3	6.23	24.2	9.29	23.5	1.67	6.5	9.37	23.7
22 Nov	18	1.47	28.3	0.87	12.1	1.08	20.8	1.77	24.7	0.28	5.4	0.04	0.5	0.24	4.6	0.14	2.0	0.68	13.1	0.14	2.0	1.45	27.8	4.21	58.6
	22	0.55	25.7	0.00	0.0	0.62	29.2	21.92	57.1	0.00	0.0	2.92	7.6	0.35	16.2	3.38	8.8	0.13	6.2	0.00	0.0	0.49	22.7	10.17	26.5
13 Dez	24	1.04	10.3	1.33	6.3	2.26	22.4	11.33	53.8	1.73	17.2	0.08	0.4	0.34	3.4	1.31	6.2	0.76	7.5	0.97	4.6	3.95	39.2	6.05	28.7
	25	4.06	28.6	1.59	4.8	4.12	29.0	18.77	56.6	0.88	6.2	0.00	0.0	2.33	16.4	0.76	2.3	1.38	9.7	0.00	0.0	1.43	10.1	12.04	36.3
média		2.18	17.7	1.27	6.7	4.28	29.7	8.99	41.8	1.09	9.8	0.40	1.5	1.72	12.4	1.21	5.4	2.17	17.0	2.09	9.8	1.00	13.9	7.29	34.8

% : porcentagem de células em relação às células do domínio *Bacteria* ;

ALFA: subclasse alfa da classe *Proteobacteria*; BETA: subclasse beta da classe *Proteobacteria*; GAMA: subclasse gama da classe *Proteobacteria*;

DELTA: subclasse delta da classe *Proteobacteria*; CF: grupo *Cytophaga/Flavobacterium*; OUTRAS: bactérias pertencentes ao domínio *Bacteria*, porém, não pertencentes a nenhum dos grupos estudados.

TABELA 11 - Atividade desnitrificante na coluna de água de vários lagos e no Mar Báltico, sob condições de anoxia. Extraída de Seitzinger (1988), Terai & Yoh (1996) e Knowles (1982).

Local	Atividade desnitrificante ($\mu\text{M}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Técnica	Referência
Lago Mendota	0,6 - 1,9	$^{15}\text{NO}_3^-$	Brezonik & Lee (1968)
Lago Kinneret	3 - 36	$^{15}\text{NO}_3^-$	Cavari & Phelps (1977)
Lago 227	0,2 - 1,6	$^{15}\text{NO}_3^-$	Chan & Campbell (1980)
Lago ártico	1,1	$^{15}\text{NO}_3^-$	Goering & Dugdale (1966)
Mar Báltico	0,1	$^{15}\text{NO}_3^-$	Shaffer & Rönner (1984)
Lago antártico	0,0 - 0,25	$^{15}\text{NO}_3^-$	Vincent et al. (1981)
Lago Kizaki	0,04 a 1,789	C_2H_2	Terai & Yoh (1996)
Lago Kizaki	0,0 - 0,844	C_2H_2	presente trabalho

TABELA 12 - Atividade desnitrificante integrada na coluna de água do Lago Kizaki, 1996, em uma estação com 29,5 m de profundidade.

Data	Atividade desnitrificante ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$)		
	Total	Aderidas	Vida livre
22 AGO	84.4	78.8	5.6
21 SET	94.4	78.4	16.0
19 OUT	83.6	21.0	62.6
06 NOV	79.4	15.8	63.6
22 NOV	64.8	28.8	36.0
13 DEZ	7.2	2.2	5.0

TABELA 13 - Valores absolutos de N_2O produzido na coluna de água pelas bactérias aderidas às partículas e bactérias de vida livre na estação mais profunda do Lago Kizaki, em todo o período amostrado, entre 22 de agosto a 13 de dezembro de 1996.

Forma de vida	N_2O produzido ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}$)	% do total
Aderidas	4,76	56
vida livre	3,79	44
Total	8,55	100