



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Saulo Machado de Souza Jacques

**Influência da Redução das Chuvas na Dinâmica da Comunidade
Microbiana em Ecossistemas Aquáticos**

Rio de Janeiro

2017

Saulo Machado de Souza Jacques

**Influência da Redução das Chuvas na Dinâmica da Comunidade Microbiana em
Ecossistemas Aquáticos**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.º Dr. Vinicius Fortes Farjalla

Coorientador: Prof.º Dr. André Megali Amado

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

J19 Jacques, Saulo Machado de Souza.
Influência da redução das chuvas na dinâmica da comunidade microbiana em ecossistemas aquáticos/ Saulo Machado de Souza Jacques. – 2017.
98 f. : il.

Orientador: Vinicius Fortes Farjalla
Coorientador: André Megali Amado
Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Ecologia aquática - Teses. 2. Microbiologia aquática - Teses. I. Farjalla, Vinicius Fortes. II. Amado, André Megali. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 574.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Saulo Machado de Souza Jacques

**Influência da Redução das Chuvas na Dinâmica da Comunidade Microbiana em
Ecossistemas Aquáticos**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Vinicius Fortes Farjalla (Orientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dr. Luciana de Oliveira Vidal
Universidade Estadual do Norte-Fluminense

Prof. Dr. Albert Luiz Suhett
Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof. Dr. Timothy Peter Moulton
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jean Remy Davée Guimarães
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Antes de começar a escrever a tese já pensava nos agradecimentos. No fundo me assombrava mais o que colocaria entre a primeira letra e o último ponto do texto dessa tese. Ao fim do mestrado foi bem difícil pensar como preencheria ao menos uma página com nomes. Ainda conhecia poucas pessoas e havia pesquisado “em casa”, apenas com os mais próximos no Laboratório de Limnologia. Dessa vez eu não sabia (ainda mal sei) como começar esse agradecimento sem que esquecesse o nome de todas as pessoas que participaram desse processo. Do REHIBRA, com pessoas já amigas e conhecidas do mestrado na UFJF, até o Pronex, onde não conhecia nem metade da equipe. Nessas duas oportunidades pude aprender muito, e o que sabia de bancada, vi que muito ainda precisava aprender de campo.

Muitas vezes somos tentados ao egoísmo na academia, mas o que não me faltaram oportunidades cooperativas para me afastar desse mal. E o presente estudo, mesmo não sendo o plano original de que o REHIBRA e o Pronex fariam parte, também contou com muitas parcerias que não se limitaram a eventual recurso humano recrutado eventualmente para mutirão científico. De filtro para metabolismo bacteriano vindo com urgência do laboratório de ecologia aquática da UFJF, contornando um atraso na entrega, até trilha sonora que ia de Mercedes Sosa a Supergrass para, algumas vezes, ativar os ânimos quando o café não era suficiente.

Nunca tive dúvidas de que esse trabalho só foi possível pela ajuda intelectual, o apoio logístico e estímulo de todas as pessoas presentes no Laboratório de Limnologia da UFRJ, no Laboratório de Traçadores W.C. Pfeiffer e nos Laboratórios

de Ecologia Aquática do Nupem e da UFJF. Em particular agradeço ao meu coorientador, André Megali, pela ajuda fundamental na estruturação do experimento e ao longo das discussões, pelos “toques” em relação aos possíveis processos e fatores que explicariam os resultados e pela ajuda fundamental na reta final. Ao professor Marcos Paulo, Thiago Benevides, Roberto, Alice, Juliana, Aliny, Nicholas, Joseph, Paloma, Pedro Junger, Nathalia Noyma, Guilherme, Lucy, Izabela, Rafaela, lamê.

Esse experimento foi crucial para decidir pelo sandwich no laboratório da professora Diane Srivastava, da UBC, onde pude explorar melhor dados que já havia obtido e finalizar as análises das amostras moleculares com Stilianos. Esse já um período intenso de aprendizado, de amadurecimento profissional e de imersão em pesquisa. De abertura de horizontes em pensar novas possibilidades acadêmicas ou não. De passar semanas quebrando cabeça transcrevendo e readaptando scripts de análises que, a princípio, não tinha ideia de onde chegariam. Desse período algumas pessoas surgiram e se tornaram queridas. Mark, pelas aulas de inglês em troca das minhas aulas de R. Sue, por me mostrar que andar de bicicleta por Vancouver não era tão perigoso como no Rio. Annie, pelas caminhadas temáticas sobre serviços ambientais. Stilian, pela ajuda em todo o processo de análises moleculares e senso de humor alemão, e Andrew, que me fez parar de comer burritos por um bom tempo após semanas sem variação no cardápio.

Voltar desse período de sandwich com lenço, documento, mas sem apoio financeiro, foi a fase mais dura para organizar as ideias e ter equilíbrio para terminar esse trabalho. E é esse espaço onde finalmente posso formalmente agradecer à pessoas que me ajudaram a não jogar a toalha: Pedro Barbosa, Thiago Benevides, Ellen, Clarice, Anderson “Taff” e meu irmão, Tiago. Mas de um tempo para cá (e em

grande parte por causa dessas pessoas) venho seguindo o conselho de Eric Idle e termino essa fase “looking on the bright side of life”.

E é com esse ânimo que revisito as experiências vivenciadas nesses anos de doutorado, onde pude conviver e trabalhar com equipes diversas, e que muitas vezes, correndo de um lado para outro, nem nos damos conta do quão isso é valioso. Das altas madrugadas com João “Minhoca” ainda cantando e processando material tranquilamente, ou os devaneios de Pedro Junger, passando horas pensando em como um experimento poderia funcionar melhor.

O texto desse trabalho oficializa o fim de um ciclo iniciado em 2008 quando bati à porta do Laboratório de Limnologia da UFRJ e comecei minhas conversas, ainda por e-mail, com Vinicius Farjalla. Admito que é “assustador” quando penso que já se passaram quase 9 anos! De pensar projetos, desfazê-los e refazê-los, descartar ideias e depois retomá-las, fomos caminhando e me sinto sortudo por tudo vivido no Lab Limno esse período sob orientação dele. De fato, se fosse relatar cada caso, curiosidade, elogios ou DRs aqui, tomaria mais algumas linhas e vejo que já passei de duas páginas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ por todo apoio e paciência durante esse período, nominalmente à Sônia e Verusca.

Também agradeço à professora Mariana Moncassim Vale pela revisão deste trabalho e as sugestões apontadas. Além da professora Luciana de Oliveira Vidal, professores Timothy Peter Moulton, Albert Luiz Suhett, Jean Remy Davée Guimarães, Reinaldo Luiz Bozelli e professora Eugenia Zandoná por aceitarem participar da banca avaliadora.

Para finalizar me sinto no compromisso de dedicar esse trabalho também às funcionárias e aos funcionários do Estado do Rio de Janeiro que são vítimas de um

governo cooptado por interesses privados e que sucateou todo o sistema público estadual, incluindo uma das mais importantes universidades do país.

Que tenhamos mais utopias nesses tempos interessantes que vivemos.

If scientists, who have the weight of empirical evidence to consider, still fall into equilibrium or balance-of-nature thinking, how much easier is it for nonscientists to do so?

Steward Pickett

RESUMO

JACQUES, S. M. S. *Influência da redução das chuvas na dinâmica da comunidade microbiana em ecossistemas aquáticos*. 2017. 99 f.. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Ecossistemas aquáticos são reconhecidos como importantes estoques de carbono, onde a comunidade microbiana tem papel central na degradação da matéria orgânica dissolvida. Tal comunidade pode ser influenciada por alterações de origem antrópica no clima do planeta, como aquelas relacionadas aos regimes de precipitação, com reflexos ainda pouco compreendidos para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Compreender os impactos dessas alterações climáticas sobre a comunidade microbiana e, conseqüentemente, sobre o metabolismo da matéria orgânica é, portanto, um dos pontos centrais em ecologia microbiana e ecologia de ecossistemas. Baseado em dados preditivos de redução nas precipitações, o presente estudo avaliou como estas reduções podem influenciar a dinâmica microbiana em relação aos seus processos metabólicos, papel funcional, composição e diversidade, utilizando bromélias-tanque como unidades amostrais por suas características de maior realismo e alta replicabilidade. Para testar como essas alterações influenciam a dinâmica da comunidade microbiana aquática foram definidos quatro cenários de precipitação, considerando a alteração na frequência e volume das chuvas. Os resultados revelaram alterações nos perfis funcionais da comunidade bacteriana, e aumento de certos parâmetros relacionados ao seu metabolismo (produção bacteriana e eficiência de crescimento bacteriana) em função da diminuição no volume e/ou frequência dos eventos de chuva, porém sem relação direta com alterações da composição da comunidade bacteriana. Estes resultados indicam que as mudanças nas chuvas alteram o ambiente biogeoquímico bacteriano, “selecionando” determinadas funções de acordo com a disponibilidade de substratos e reagentes para as reações biogeoquímicas. Os grupos microbianos, por sua vez, apresentam alta plasticidade nas funções testadas, podendo explicar as alterações nos perfis funcionais sem relação com as alterações na composição da comunidade bacteriana. Conclui-se, portanto, que alterações nos regimes pluviométricos podem afetar o metabolismo microbiano aquático, alterando, potencialmente, os processos mediados pelos micro-organismos, o fluxo de energia nas cadeias aquáticas e a ciclagem de elementos nos ecossistemas, porém sem grande modificação na estrutura das comunidades microbianas.

Palavras-chave: Mudanças Climáticas, Comunidade Microbiana, Papel Funcional, Diversidade Genética, Ciclagem de Matéria Orgânica.

ABSTRACT

JACQUES, S. M. S. *Influence of rainfall reduction on the microbial community dynamics in aquatic ecosystems*. 2017. 99 f.. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Aquatic ecosystems are recognized as important carbon stocks, where the microbial community plays a central role in the degradation of dissolved organic matter. Such communities may be influenced by changes in the planet's climate, such as those related to precipitation regimes, with consequences still poorly understood for the functioning of aquatic ecosystems. Understanding the impact of climate change on microbial community and consequently on the metabolism of organic matter is therefore central to microbial ecology and ecosystem ecology. Based on predictive data on rainfall reduction, the present study evaluated how these reductions can influence microbial dynamics in relation to their metabolic processes, functional role, composition and diversity. The experiment was built using tank bromeliads as sampling units due to their realistic characteristics and high replicability, and considered four different scenarios of rain to test how these changes influence the dynamics of the aquatic microbial community, considering the change in frequency and volume of rainfall. The results revealed changes in the functional profiles of the bacterial community, and increase of certain parameters related to its metabolism (bacterial production and bacterial growth efficiency) due to the decrease in volume and /or frequency of rain events, although without direct relation with changes of the composition of the bacterial community. These results indicate that changes in rainfall alter the bacterial biogeochemical environment by "selecting" metabolic pathways according to the availability of substrates and reagents for the biogeochemical reactions. On the other hand microbial groups could have high plasticity in the functions tested, explaining why the changes in the functional profiles were not related to changes in the composition of the bacterial community. Therefore, changes in pluviometric regimes may affect aquatic microbial metabolism, potentially altering microorganism-mediated processes, energy flow in aquatic chains and cycling of elements in ecosystems without major changes in the structure of microbial communities.

Keywords: Climate Change, Microbial Community, Functional Diversity, Genetic Diversity, Organic Matter Cycle.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 MATERIAIS E MÉTODOS	22
1.1 Unidades Experimentais e Área	22
1.2 Experimento e Amostragens	24
1.2.1 <u>Desenho Experimental</u>	24
1.2.2 <u>Preparação e Montagem do Experimento</u>	25
1.2.3 <u>Amostragem e Processamento do Material</u>	28
1.3 Métodos Analíticos	29
1.3.1 <u>Análise de Nutrientes</u>	29
1.3.2 <u>Análises de Metabolismo Bacteriano</u>	30
1.3.3 <u>Densidade e Atividade Bacteriana</u>	31
1.3.4 <u>Diversidade Metabólica Bacteriana</u>	32
1.3.5 <u>Diversidade Genética Bacteriana</u>	34
1.4 Análises Estatísticas	35
1.4.1 <u>Variáveis Baseadas na Temperatura e Profundidade</u>	35
1.4.2 <u>Influência dos Tratamentos de Precipitação nas Variáveis Abióticas</u>	36
1.4.3 <u>Metabolismo Bacteriano</u>	36
1.4.4 <u>Perfil e Diversidade Funcional da Comunidade Microbiana</u>	37
1.4.5 <u>Composição e Diversidade Genética Microbiana</u>	38
2 RESULTADOS	40
2.1 Variáveis Abióticas	40
2.2 Metabolismo Bacteriano	42
2.2.1 <u>Influência da alteração na precipitação</u>	42
2.3 Variáveis abióticas e processos metabólicos	50
2.3.1 <u>Influência das Variáveis de Temperatura Sobre Metabolismo Bacteriano</u>	50

2.3.2	<u>Biomassa e Atividade Bacteriana</u>	51
2.4	Perfil Metabólico da Comunidade Microbiana	56
2.5	Diversidade Genética	64
2.5.1	<u>Análise de Variância das Classes, Filos e OTU</u>	73
3	DISCUSSÃO	75
	REFERÊNCIAS	87

INTRODUÇÃO

O planeta passa por um período de grandes alterações climáticas, onde eventos ambientais extremos já são observados e têm previsão de se tornarem cada vez mais frequentes (BAILEY; VAN DE POL, 2016; DILLON et al., 2016; IPCC, 2013). Alterações na temperatura, na circulação atmosférica e no balanço hidrológico estão levando ao aumento da ocorrência de ondas de calor, grandes secas e inundações, com consequências ainda pouco conhecidas sobre organismos e ecossistemas (LEVINTON et al., 2011; WALTHER et al., 2002; WRONA et al., 2006).

O aumento da temperatura do planeta foi relatado pela primeira vez por Broecker em 1975 em um trabalho que utilizou um modelo climático simples considerando os ciclos climáticos naturais e o aumento esperado na emissão de CO₂ (BROECKER, 1975). As previsões do estudo de Broecker são notáveis por estabelecer valores de acúmulo de CO₂ na atmosfera próximos aos observados empiricamente nas décadas seguintes (BROECKER, 1975; IPCC, 2013). A temperatura ainda é a principal variável considerada em estudos ecológicos abordando o papel das forçantes climáticas sobre processos ecossistêmicos e a dinâmica da biota (HEGERL et al., 2006; HUGHES et al., 2003; KRITZBERG; DUARTE; WASSMANN, 2010). O aumento médio da temperatura na superfície atmosférica intensifica a capacidade de retenção de vapor d'água, com aumento da umidade atmosférica em cerca de 7% para cada 1 °C de aumento na temperatura. O aumento destes dois fatores resulta em alterações no movimento ascendente, na convergência da umidade e na precipitação, com reflexo no balanço entre evaporação e precipitação (IPCC, 2013; TRENBERTH, 2011; ZEPPEL; WILKS; LEWIS, 2014). Nas últimas décadas, contudo, o aumento de estudos considerando também as mudanças nos padrões de precipitações resultou em avanços na compreensão da complexidade dos efeitos das alterações climáticas (CHADWICK; BOUTLE; MARTIN, 2012; KNAPP et al., 2015; ZEPPEL; WILKS; LEWIS, 2014).

As alterações nos padrões de precipitação se caracterizam pela intensificação na ocorrência de eventos extremos tais como secas prolongadas – resultante da redução das chuvas associadas ao aumento da evaporação – e inundações de grandes áreas, resultantes de uma intensa precipitação em um curto período de

tempo (HOOVER; KNAPP; SMITH, 2014; SMITH; KNAPP; COLLINS, 2009). Estas intensificações na alteração do ciclo hidrológico levarão ao desaparecimento de alguns climas e o surgimento de condições climáticas totalmente distintas das observadas atualmente (WILLIAMSON et al., 2008). Embora seja difícil definir um panorama global de precipitação devido às variações em escala regional, estudos mostraram que houve tendência de aumento do percentual de área terrestre atingida por eventos de seca desde 1950, porém com aumento também na frequência de chuvas nas últimas décadas (IPCC, 2013), o que por si caracterizaria a intensificação da ocorrência de eventos climáticos extremos.

A definição de eventos climáticos extremos (ECE) pode ser feita segundo uma abordagem climatológica ou uma abordagem biológica. No caso da abordagem climatológica, um ECE é definido quando uma condição climática que exceda a média esperada em condições tidas como normais (i.e. chuvas torrenciais ou ondas de calor) se torna mais rara, ocorrendo com frequências igual ou inferior a 5% dos casos (EASTERLING et al., 2000). Contudo, os ECEs estão se tornando cada vez menos raros e a definição climatológica para os eventos extremos deve ser considerada com cautela, levando-se em conta particularidades regionais na avaliação (BAILEY; VAN DE POL, 2016; IPCC, 2013).

A partir de um ponto de vista biológico, um ECE é toda nova condição climática que resulte em forte resposta fisiológica e/ou comportamental de aclimação que seja estatisticamente diferentes das respostas observadas dentro de um intervalo de condições climáticas normais (GUTSCHICK; BASSIRIRAD, 2003). Esta abordagem difere da climatológica por considerar ECE apenas o evento climático que resulte em respostas biológicas que se distanciem do intervalo esperado. Assim, um ECE, pode levar tanto a extinção de uma população ou a adaptação à nova condição, de modo que a resposta biológica não será tão pronunciada e o evento então não será mais considerado como extremo (BAILEY; VAN DE POL, 2016). Segundo o exposto, um mesmo evento pode ser considerado extremo para determinados organismos, mas não para todos. Esta influência com intensidades distintas entre os organismos resulta em alterações metabólicas, aumento do risco da extinção de espécies e a consequente alteração na composição e estrutura de comunidades presentes em um ambiente (HOOVER; KNAPP; SMITH, 2014; SMITH, 2011).

Ecossistemas aquáticos continentais podem ser considerados sistemas indicadores de alterações climáticas por integrarem processos atmosféricos e terrestres e por estarem intimamente conectados a ambientes terrestres e ao transporte e armazenamento de água, nutrientes e poluentes (WILLIAMSON et al., 2008). Os efeitos de um evento climático podem ser ainda mais críticos para ecossistemas aquáticos rasos devido à alta razão superfície/volume, o que confere a estes ambientes maior vulnerabilidade a grandes dinâmicas no volume d'água, intensificada pelas alterações nos padrões de chuva e evapotranspiração (HAVENS; STEINMAN, 2015).

O aumento da evapotranspiração sem que ocorra, concomitantemente, o aumento nos eventos de chuva pode reduzir não apenas o volume de água superficial, como também a reserva de água subterrânea que abastece um dado ecossistema (HAVENS; STEINMAN, 2015), alterando as regiões litorâneas e pelágicas destes ecossistemas. Além disso, a redução da precipitação reflete em impacto sobre aspectos físico-químicos da água, resultando em alterações na concentração de nutrientes, temperatura, salinidade, acidificação e potencial deterioração da qualidade da água (CARUSO, 2002; MOSLEY et al., 2014; VAN VLIET; ZWOLSMAN, 2008). A redução nos padrões de precipitações pode resultar no comprometimento do estoque de água de ecossistemas rasos, alterando seu perfil de ambiente permanente para uma nova condição de ecossistema temporário, com impacto não só para sua dinâmica, mas também para toda a biota aquática (LAKE, 2011; SILVER; VAMOSI; BAYLEY, 2012). Ecossistemas temporários e permanentes possuem dinâmicas diferentes, com impactos bem conhecidos sobre as comunidades biológicas (BROCK et al., 2003; LAKE, 2003; SILVER; VAMOSI; BAYLEY, 2012; SIMON et al., 2016).

A comunidade microbiana (bactérias, arqueas e fungos) possui um papel-chave no funcionamento de ecossistemas por constituir o principal grupo envolvido na ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica (BUCHAN et al., 2014; COTNER; BIDDANDA, 2002). O metabolismo de matéria orgânica dissolvida (MOD) por esta comunidade representa a principal via para o fluxo de carbono dentro de um ecossistema (AZAM; MALFATTI, 2007; COTNER; BIDDANDA, 2002), seja pela remineralização da MOD ou pela incorporação desta em biomassa. A respiração bacteriana (RB) é um importante processo envolvido na

redisponibilização de nutrientes para produtores primários e pode representar mais de 65% da respiração planctônica total em lagos (COTNER; BIDDANDA, 2002). Além disso, a comunidade microbiana pode remineralizar até 60% do carbono orgânico dissolvido (COD) em lagos temperados (JONSSON et al., 2001). Por outro lado, a incorporação do carbono dissolvido em biomassa pelo processo de produção bacteriana (PB) e a eventual predação por microflagelado, constitui uma via alternativa de entrada de energia e matéria para a cadeia trófica conhecida como cadeia trófica microbiana (AZAM et al., 1983; FENCHEL, 2008; WEISSE, 2003).

Estes processos metabólicos microbianos são extremamente sensíveis a variações nas condições ambientais do meio (BERGGREN, 2010; SCOFIELD et al., 2015) e mesmo pequenas alterações na disponibilidade de nutrientes (APPLE; SMITH; BOYD, 2008; COMTE; GIORGIO, 2011; VREDE, 2005) e na variação de temperatura (POMEROY; WIEBE, 2001) podem influenciar significativamente a atividade microbiana. Por exemplo, o aumento dos custos metabólicos da comunidade frente a um evento extremo resultaria em aumento relativo dos processos catabólicos (FLYNN, 2005; KEIBLINGER et al., 2010; SARMENTO et al., 2010), refletindo na resposta de aclimação celular à condição limitante do meio. Este desequilíbrio metabólico resultaria também no aumento da demanda microbiana por carbono (DBC, demanda total de processos catabólicos e anabólicos), com tendência de redução na eficiência do crescimento bacteriano (ECB, relacionada à proporção alocação de recursos nos processos anabólicos).

Os estudos sobre a influência das alterações climáticas em comunidades microbianas aquáticas em sua maioria avaliam as alterações da temperatura como principal fator causador de alterações nos processos metabólicos e da dinâmica da comunidade (FREY et al., 2013; SARMENTO et al., 2010; SCOFIELD et al., 2015). Estes estudos fornecem evidências de que alterações da temperatura que excedam os limites tolerados pela comunidade microbiana resultam em mudanças nas estruturas celulares (i.e. o aumento ou redução da fluidez membranar) na atividade enzimática e, conseqüentemente, em possível perda de eficiência do uso de substratos pelos organismos (D'AMICO et al., 2006; MANSILLA et al., 2004; NEDWELL, 1999; WERTZ et al., 2007). Estas alterações na atividade metabólica e na dinâmica populacional também podem ser observadas em eventos de seca, com impactos pouco conhecidos porém fundamentais para o funcionamento de

ecossistemas (BÉRARD et al., 2011; GRIFFITHS et al., 2001). O estudo da atividade metabólica como indicadora de uma ou mais alteração ambiental na comunidade microbiana é fundamental para entender os limites metabólicos dos organismos e os custos resultantes do impacto (GARCIA et al., 2014), porém fornece informações limitadas sobre a dinâmica da comunidade microbiana e não corresponde, necessariamente, a possíveis mudanças na composição, estrutura e no papel funcional da comunidade (COMTE; DEL GIORGIO, 2009).

Estudos recentes elucidaram, embora ainda parcialmente, a diversidade microbiana e o quanto desta diversidade representa o total da diversidade biológica do planeta (FIERER; LENNON, 2011). A adoção de novas técnicas moleculares, como a baseada no sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal (DNAr), detectaram que a diversidade microbiana de ambientes aquáticos são várias ordens de magnitude acima do estimado anteriormente utilizando outras técnicas (RAPPÉ; GIOVANNONI, 2003; WARD; WELLER; BATESON, 1990). O volume de dados disponíveis sobre os filotipos – ou unidades taxonômicas operacionais (OTU) – compondo e estruturando a comunidade, também permite compreender cada vez mais os processos ecológicos que moldam a comunidade e o funcionamento de ecossistemas (BELL et al., 2005). Contudo, a avaliação estritamente taxonômica da comunidade fornece uma visão limitada e enviesada em relação à dinâmica da comunidade e sua relação com o seu ambiente (LOUCA et al., 2016).

A avaliação do papel funcional, considerando a composição e estrutura filogenética da comunidade microbiana fornece importantes evidências não apenas do perfil funcional da comunidade, como também da diversidade funcional em um ecossistema (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002). O perfil funcional corresponde à atividade catabólica “real”, enquanto que a diversidade funcional refere-se à atividade catabólica “potencial” da comunidade. Ou seja, a diversidade funcional indicaria o potencial de adaptação metabólica da comunidade frente a uma variação abiótica do ecossistema, levando em conta também a composição e o tamanho das populações que compõem a comunidade (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002). Dentre as técnicas utilizadas para avaliação do potencial funcional de uma comunidade microbiana, a técnica de degradação de diferentes tipos de substratos vem sendo largamente aplicada (BUTTON et al., 2015; CHRISTIAN; LIND, 2006) se baseia na capacidade da

comunidade em degradar as 31 diferentes fontes de carbono presentes em uma microplaca (CHRISTIAN; LIND, 2006).

Considerando a estrutura metabólica e filogenética de uma comunidade microbiana, a ocorrência de um ECE pode levar a dois tipos de respostas dos organismos que compõem as comunidades microbianas: alteração do metabolismo não associada a uma alteração na composição da comunidade ou alteração do metabolismo associada a uma alteração na composição da comunidade. No primeiro caso, comunidades compostas por filotipos dominantes mais generalistas e com alta plasticidade serão mais tolerantes a variações ambientais (COMTE; GIORGIO, 2011), sem grandes alterações na composição da comunidade, mas com uma reorganização das atividades e distribuição celulares entre filotipos com possibilidade de alteração da estrutura fisiológica e metabólica da comunidade (ALLISON; MARTINY, 2008; COMTE; GIORGIO, 2011). Por outro lado uma variação ambiental que extrapole os limites de resistência de filotipos dominantes, estes serão eliminados, resultando em uma estrutura fisiológica e metabólica da comunidade diferente da encontrada antes da ocorrência do ECE (ALLISON; MARTINY, 2008). Neste caso a composição da comunidade microbiana determinará o nível de estabilidade da comunidade e, conseqüentemente, se a resposta à alteração ambiental ocorrerá pela alteração dos filotipos dominantes ou pela substituição de filotipos extintos (COMTE; GIORGIO, 2011). Isso quer dizer que distúrbios atuam como filtros ambientais reestruturando os perfis composicionais e funcionais da comunidade e, conseqüentemente, podendo conferir maior estabilidade diante de futuros distúrbios antes críticos para comunidades microbianas (BÉRARD et al., 2012; RENSLOW; LINDEMANN; SONG, 2016). Vale ressaltar que comunidades presentes em ambientes previamente expostos a situações de intensa seca tendem a ser menos susceptíveis aos eventos futuros de seca e ondas de calor (BÄR et al., 2002; BÉRARD et al., 2012; DEGENS et al., 2001). A presença de espécies capazes de manter os processos ecossistêmicos após um evento climático sugerem a compensação do efeito negativo que a variação possa causar em uma população sensível. Assim, as particularidades funcionais de táxons de uma comunidade podem levar à oscilação de abundância destes, dependendo das condições ambientais (COMTE; FAUTEUX; DEL GIORGIO, 2013).

Compreender os impactos da redução das precipitações sobre os processos metabólicos, considerando a grande plasticidade metabólica e a redundância funcional da comunidade microbiana aquática é fundamental para avanços dos estudos dos impactos das mudanças climáticas sobre estes organismos e o funcionamento de ecossistemas. Estudos deste tipo até então focaram exclusivamente em comunidades microbianas de ambientes terrestres e avaliaram, em sua maioria, a redução das precipitações sem considerar os fatores frequência e volume de chuva (CLARK et al., 2009; PLACELLA; BRODIE; FIRESTONE, 2012; SORENSEN; GERMINO; FERIS, 2013; ZHAO et al., 2016). Estes dois fatores podem apresentar influências distintas sobre a comunidade microbiana resultante do diferente tempo de retenção da água no ecossistema, potencial de dessecação, alteração da concentração de nutrientes e da qualidade da matéria orgânica disponível. Dada a importância de microrganismos para a realização de processos ecossistêmicos, avaliar separadamente tais fatores é fundamental para futuros estudos considerando o reflexo da variação dos padrões da chuva nestes processos mediados pela atividade da comunidade microbiana.

Dessa forma, foi elaborado para o estudo um experimento de campo utilizando quatro diferentes cenários de redução da precipitação, constituídos por dois diferentes níveis de frequência e volume de chuva, separadamente. O objetivo foi identificar a influência de cada um destes fatores na dinâmica da comunidade microbiana aquática utilizando, para isso, um fitotelmata aquático (bromélia-tanque) como microcosmos natural. O uso de bromélias-tanque se justifica por estas apresentarem estrutura trófica constituída por comunidades microbianas e de macroinvertebrados, além das dinâmicas físico-químicas do sistema, que conferem aos estudos experimentais um importante perfil realístico, inexistente em outros estudos que utilizam modelos não biológicos (LEVINS, 1966; SRIVASTAVA et al., 2004). Finalmente, visto que um ECE afeta o equilíbrio metabólico microbiano (BERGGREN; DEL GIORGIO, 2015; BOUSKILL et al., 2016; HUMPHRIES; BALDWIN, 2003; PALOMO; MEILE; JOYE, 2012), e considerando o alto grau flexibilidade metabólica e tolerância fisiológica de vários grupos dessa comunidade frente a alterações ambientais (COMTE; FAUTEUX; DEL GIORGIO, 2013; EVANS; HOFMANN, 2012; LENNON; JONES, 2011; MEYER et al., 2004; SCHIMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007, 2007), é esperado para este estudo que a variação

da precipitação resulte em maiores alterações do papel funcional da comunidade e intensificação dos processos metabólicos de respiração e produção bacteriana, porém com pouca alteração na composição da comunidade.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Unidades Experimentais e Área

O experimento utilizou bromélias-tanque como unidades experimentais, por representarem um sistema caracterizado por estruturas foliares imbricadas que possibilitam o acúmulo de água da chuva no seu interior, servindo de recurso e habitat para diversas espécies animais (KITCHING, 2001). A escolha pela *Neoregelia cruenta* (Figura 1) foi baseada em sua estrutura, com folhas mais abertas que permitem maior capacidade de acúmulo de água e de detritos por ocorrer em áreas mais vegetadas. Esta também é uma das bromélias-tanque mais abundantes na área de estudo, no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

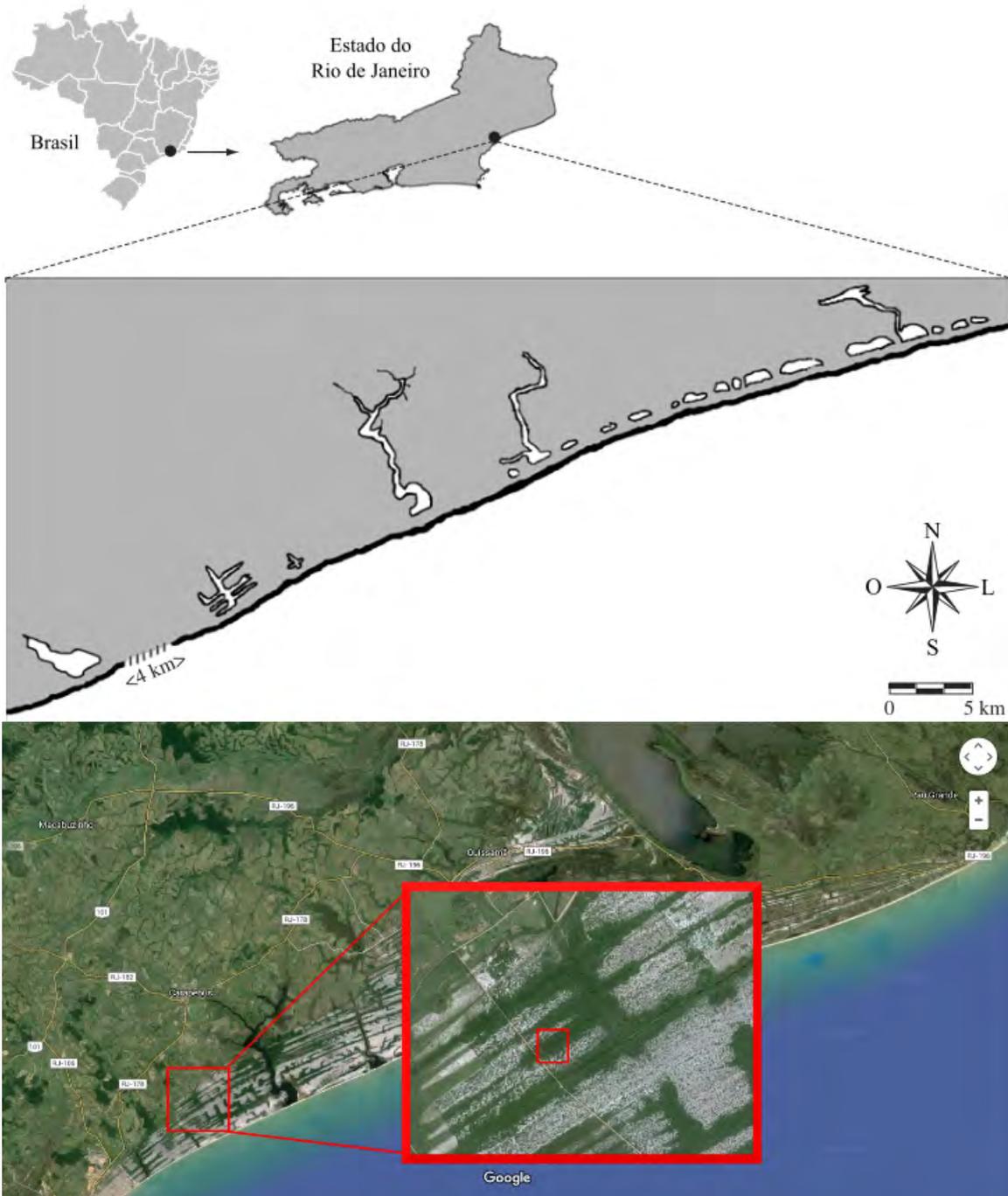
Figura 1 – Bromélia utilizada como unidade experimental no estudo



Legenda: Exemplar de *Neuregelia cruenta*, utilizada no experimento. A escolha se baseou na maior capacidade dessas bromélias em captar água e acumular detritos alóctones em regiões mais vegetadas.

Foto: Saulo Jacques.

Figura 2 – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba



Legenda: O mapa acima ilustra a localização geográfica do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Fonte: Caliman et al. 2010), onde foi desenvolvido o estudo. Abaixo imagem de satélite com destaque da área de montagem do experimento (Fonte: Google).

O experimento foi realizado no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA Jurubatiba) entre os meses de Março e Junho de 2014. O Parque Nacional corresponde a uma extensa área com total de 148,6 km² localizada entre as

coordenadas 22°00'-22°23'S e 41°15'-41°45'W, na região Norte do Estado do Rio de Janeiro (Figura 2). A região apresenta temperatura anual média é de 22 °C e a média anual da precipitação é de 1.300 mm, com forte sazonalidade interanual onde a precipitação pode variar entre 40 mm (de xx a xx) e 190 mm e a temperatura média entre 17 e 30 °C, nos meses de Junho e Dezembro, respectivamente (CPTEC/INPE).

1.2 Experimento e Amostras

1.2.1 Desenho Experimental

O experimento foi realizado utilizando um desenho bifatorial, com os fatores “frequência de precipitação” (K) e “volume de precipitação” (Mu), apresentando 2 níveis cada (ver abaixo como estes fatores foram obtidos), expressos em mm. A partir da definição destes fatores, foi estabelecido o cronograma de precipitação para cada tratamento.

Para elaboração do cronograma de precipitação do experimento, foram utilizados os registros de precipitação para a região de estudo, considerando o mesmo período do ano da realização do experimento, de acordo com protocolo de experimento escrito por McDonald e Srivastava (2015), e os dados de precipitações dos anos 2007 a 2012, que foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Os registros dos volumes (mm) e frequência de precipitação foram modelados através de uma distribuição binomial negativa, na qual os volumes de precipitação foram arredondados para números inteiros e, em seguida a frequência (K) e o volume (Mu) dos eventos de chuva foi estimada para cada ano (2007-2012) de acordo com a máxima verossimilhança. Por último, foram utilizadas as médias destes parâmetros nos 6 anos avaliados (Mu= 3,72 e K= 0,13) para obter a distribuição da chuva do ambiente (cenário controle).

A partir do controle (Mu1K1), foram estabelecidos os cenários de redução da precipitação multiplicando o valor de Mu por 0,1 e o valor de K por 0,5. Desta forma, Mu1K0.5 mantém o volume, reduzindo pela metade a frequência das precipitações, Mu0.1K1 apresenta o seu volume reduzido a 1/10 em relação controle e Mu0.1K0.5 representa o cenário mais extremo, onde o volume é reduzido a 1/10 e a frequência

é reduzida à metade da média de precipitação esperada. Embora essa redução possa ser considerada drástica, considerando os modelos preditivos existentes, ela foi adotada com objetivo de avaliar como a mudança intensa (de acordo com a definição de ECE na Introdução) em um sistema aquático altera a comunidade microbiana.

Para cada um dos quatro tratamentos foi estabelecido um calendário de rega de acordo com a precipitação esperada dentro de um período de 60 dias (tempo total de duração do experimento). O valor da precipitação bimensal foi a base do cálculo e o volume captado pela bromélia foi calculado utilizando a partir da área média das bromélias (1202 cm²) e um fator combinado de correção de 0,27 (27%), que corresponde à perda pela deflação na cobertura da copa e na folha da bromélia (Tabela 1).

Tabela 1 - Detalhe dos tratamentos de precipitação utilizados no experimento. Redução no volume de precipitação (Mu) e frequência de precipitações (K), em relação ao cenário controle (Mu1K1).

Cenário de Precipitação	Número de Eventos de Chuva	Total de Chuva Simulada no Experimento (mm)	Número de Dias Sem Chuva
Mu1K1	17	179.76	44
Mu0.1K1	8	17.91	53
Mu1K0.5	11	169.63	50
M0.1K0.5	5	16.76	56

1.2.2 Preparação e Montagem do Experimento

A seleção das bromélias a serem utilizadas no experimento foi realizada *in situ* a partir dos indivíduos que apresentaram semelhanças na distância entre as folhas mais externas, altura e volume total (medidas que melhor definem o tamanho e a capacidade de armazenamento de cada planta). Nessa etapa as bromélias foram retiradas do solo com auxílio de uma cavadeira preservando sua integridade e

o conteúdo interno, e armazenadas em sacos plásticos até chegarem ao laboratório de Ecologia Aquática, localizado no Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Socioambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ). Toda a água contida em cada planta foi amostrada e o volume medido ainda no campo. No Laboratório, foram realizados procedimentos de triagem da comunidade aquática, tanto na água coletada quanto na planta propriamente dita.

A água de cada uma das bromélias foi filtrada através de duas peneiras com malhas de 850 μm e 100 μm para separação de sedimento e de macroinvertebrados da amostra de água. A água filtrada de cada bromélia foi misturada dando origem a uma amostra única (pool) com objetivo de eliminar o efeito da comunidade microbiana. Esta amostra única foi acondicionada em garrafa previamente identificada com o número de cada bromélia, que, por sua vez, foram mantidas em temperatura constante de 4 °C, por 48 horas, até o momento da montagem do experimento.

Ao fim desta etapa, cada uma das bromélias foi minuciosamente lavada com todo o conteúdo de “enxágue” peneirado e levado para a triagem. Os organismos retidos nas peneiras de 850 μm e 100 μm , bem como aqueles já previamente coletados na etapa anterior, foram então separados para redistribuição da comunidade de invertebrados de forma homogênea entre as bromélias, mantendo a mesma estrutura entre as bromélias no início do experimento. O mesmo ocorreu com os detritos retidos em cada uma das peneiras, que foram divididos entre “detrito grosso” e “detrito fino”. Ambos foram congelados até o dia anterior do início do experimento para eliminar eventuais macroinvertebrados que eventualmente não tenham sido separados anteriormente. Finalizadas todas estas etapas, as bromélias foram levadas para o PARNA Jurubatiba, onde foram replantadas na área previamente selecionada como sítio do experimento (Figura 3A). Para cada um dos quatro cenários criados, foram selecionadas 10 réplicas, totalizando 40 unidades experimentais.

Após o replantio, cada bromélia recebeu 1.270 mL do “pool” da água das bromélias, as comunidades de invertebrados aquáticos e 1,9 g de detritos fino e 8 g de detrito grosso, que foram triados e redistribuídos de forma homogênea. em relação à comunidade de macroinvertebrados, essa foi redistribuída igualmente,

baseada na média calculada para cada um deles, da seguinte forma: 3 Chironomidae, 10 Ceratopogonidae, 6 Scirtidae, 1 Odonata, 1 Tipulidae, 2 Culicidae.

As bromélias utilizadas no experimento foram protegidas da influência das chuvas naturais e da entrada de detritos com a instalação de tendas individuais (Figura 3B). Essas estruturas não impediram, contudo, eventual entrada de comunidade de macroinvertebrados.

A manipulação da chuva foi realizada adicionando o volume previsto para cada cenário apenas no copo central das bromélias, onde também foram realizadas as amostragens ao longo do experimento.

Figura 3 – Sítio de montagem do experimento

(A)

(B)



Legenda: Imagem mostra o local onde o estudo foi realizado com as tendas instaladas sobre as bromélias (A), e (B) o momento de amostragem da água para análises.

Durante todo o experimento, as variações da temperatura e do volume da coluna d'água no copo central foram avaliadas continuamente. A temperatura foi avaliada a cada 10 minutos utilizando pequenos dataloggers (iButtons[®]), dispositivos com capacidade de medições em tempos preestabelecidos por longo período e com grande vantagem sobre outras técnicas por seu tamanho reduzido. O dispositivo foi instalado no fundo do copo central de cada uma das bromélias a partir do início do experimento. O volume de água em cada planta foi avaliado diariamente utilizando um paquímetro para medir a profundidade do copo central em cada uma das

bromélias. Posteriormente, com estes dados, foram calculados diversos parâmetros hidrológicos de cada um dos sistemas.

A dinâmica da comunidade microbiana foi avaliada através da respiração bacteriana (RB) e produção bacteriana (PB) como processos metabólicos. Também foram avaliadas a densidade e atividade, a composição da comunidade e o perfil funcional da comunidade microbiana. As amostragens para análises de metabolismo bacteriano, densidade bacteriana e nutrientes ocorreram em 5 diferentes tempos durante o experimento (dias após o início do experimento: 38, 43, 50, 58 e 63).

Para as análises de diversidade funcional e diversidade filogenética, as amostragens foram realizadas em dois momentos: no início do experimento, utilizando o pool com água de todas as bromélias selecionadas, e ao final do experimento (63º dia após o início da incubação), junto com as demais amostragens citadas anteriormente. Logo, o presente estudo focou na variação temporal do metabolismo bacteriano e na alteração entre as condições iniciais e finais da composição e diversidade funcional microbiana diante de diferentes condições ambientais impostas pelos tratamentos de manipulação das chuvas. A comunidade microbiana avaliada ao início do experimento foi utilizada apenas como comparativa da mudança da comunidade, pois a manipulação da entrada de água no sistema alterou toda a dinâmica de entrada de nutriente e, conseqüentemente, de colonização por filotipos microbianos. Dessa forma, a comunidade do experimento foi tratada como indicadora de um eventual efeito da redução da precipitação, e não em comparação com a comunidade original.

1.2.3 Amostragem e Processamento do Material

As amostras de água contendo a comunidade bacteriana foram obtidas utilizando seringas estéreis conectadas a uma mangueira de silicone esterilizada e individuais para cada bromélia. Após a obtenção das amostras, essas foram transferidas para tubos de centrifuga (*Falcon*TM) lavados, estéreis e identificados com o número de cada bromélia.

Para as análises de densidade, as amostras foram fixadas ainda no sítio do experimento. Para cada bromélia, foram amostradas alíquota de 2 mL e adicionada

em microtubo identificado, contendo 0,2 mL de glutaraldeído. As amostras fixadas foram mantidas sob temperatura constante de 3° C durante todo o processo até a chegada ao laboratório.

No laboratório as amostras para análises de nutrientes foram filtradas através de filtro GF/F (0.7µm, Whatman®), dos quais 15 mL do filtrado foram utilizados para as análises de carbono orgânico dissolvido (COD) e nitrogênio orgânico dissolvido (NTD), e 5 mL para a análise de fósforo dissolvido. Também foram utilizadas amostras filtradas para as análises de metabolismo microbiano, e neste caso foram filtrados 25 mL das amostras através de filtro GF/C (1.2µm, Whatman®). A mesma amostra filtrada foi utilizada para as análises de PB e RB com a finalidade de evitar possível viés causado pela diferença na densidade microbiana.

Para a preparação das amostras para diversidade genética microbiana, 120 mL água de cada bromélia foram filtradas através de membrana de policarbonato com porosidade de 0.2 um (Whatman Nuclepore, 47 mm), e ao fim da filtração as membranas foram dobradas com a superfície voltadas para dentro e armazenadas em microtubos individuais, que foram congelados imediatamente à temperatura de -20° C. Posteriormente, os filtros foram liofilizados por 24 horas e mantidos em temperatura ambiente até o momento da análise.

1.3 Métodos Analíticos

1.3.1 Análise de Nutrientes

A concentração de COD da amostra foi avaliada usando um analisador de oxidação catalítica de alta temperatura TOC-V CPN (Shimadzu) e leitura em infravermelho. A concentração de NTD foi medida pela detecção quimioluminescente do monóxido de nitrogênio produzido durante a oxidação catalítica do COD utilizando a unidade TNM-1 acoplada ao TOC-V CPN. Este analisador possui vantagens em relação a outros métodos analíticos devido ao seu grau de oxidação e a precisão para analisar concentrações mínimas de COD em cerca de 0,33 µM e de NTD em cerca de 4,2 µM, utilizando volumes de cerca de 100 µL (STUBBINS; DITTMAR, 2012). A análise de fósforo dissolvido foi realizada pela

técnica de ácido molíbdico após oxidação de fosfato em solução ácida de persulfato de potássio a 120 °C (GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD, 1978).

1.3.2 Análises de Metabolismo Bacteriano

O metabolismo foi avaliado a partir das análises de respiração bacteriana (RB) e produção bacteriana (PB) e, a partir destes dados, foram calculados a demanda bacteriana por carbono (DBC) e a eficiência de crescimento bacteriano (ECB).

Para a análise de RB, amostras filtradas de cada bromélia foram divididas em 3 réplicas utilizando frascos de 6 mL com fechamento hermético (Exatainer®). A RB foi avaliada pela medida de consumo de oxigênio nas amostras de cada bromélia considerando o tempo inicial e o tempo final, após 24 horas de incubação. A incubação ocorreu em câmara previamente configurada com temperatura igual à obtida no momento da amostragem em campo e os frascos foram cuidadosamente lacrados para não formar bolha de ar em seu interior. A medida do consumo de oxigênio foi realizada utilizando um microeletrodo conectado a um picoamperímetro (PA 2000, Unisense), de acordo com Briand e colaboradores (2004). Este método foi escolhido por ser considerado de alta precisão, mais estável e com resultados em um curto intervalo de tempo (BRIAND et al., 2004). Os resultados obtidos foram convertidos em valores de carbono utilizando o coeficiente de respiração de 1,2 (BERGGREN; LAPIERRE; DEL GIORGIO, 2012).

A PB foi avaliada pela incorporação de ³H-leucina em biomassa bacteriana segundo o método de microcentrifugação descrito por Kirchman (1993). Nesta etapa a amostra filtrada de cada bromélia também foi utilizada para criar três réplicas para a análise de PB. Em cada réplica foram adicionados 1,2 mL de amostra e 20 µL de ³H-leucina (atividade específica 58.5 Ci/mmol) em microtubos levados para incubação durante 1 hora no escuro em temperatura controlada. As amostras controle foram criadas com a adição de ácido tricloroacético (TCA, concentração final de 5%) antes de adicionar a amostra e a ³H-leucina aos microtubos. Após terminada a incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA, concentração final de 5%) com objetivo de finalizar a atividade bacteriana de incorporação de biomassa, seguida pela etapa de extração de proteína (KIRCHMAN, 1993). O

processo de extração foi iniciado adicionando 60 μL de TCA (concentração final, 5%) às amostras e armazenando-as por 30 minutos no escuro. Ao fim do período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em velocidade de 14.000 rpm e conseqüente descarte do material sobrenadante. Em seguida foram realizados dois enxágues utilizando 1 mL de água ultrapura (MilliQ, Millipore™) e um enxágue com 1 mL de etanol 80%. Essas etapas de enxágue foram intercaladas por centrifugação de 10 minutos a 14.000 rpm, com descarte do sobrenadante. Ao final da extração, foi adicionado o coquetel de cintilação (Ecolite(+)TM) em cada amostra que foram, em seguida, incubadas no escuro e em temperatura ambiente por 48 horas para reduzir a quimioluminescência até serem levadas para leitura em desintegração por minuto (DPM) no contador de cintilação líquida (Beckman LS – 6500).

Os resultados da PB e da RB foram expressos em $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e a soma destes dois processos foi utilizada para calcular a demanda bacteriana de carbono (DBC), que estima o total de carbono utilizado pela comunidade para sustentar os processos metabólicos ($\text{DBC}=\text{RB}+\text{PB}$). Também foi estimada a eficiência do crescimento bacteriano (ECB) pela fórmula $\text{ECB}=\text{PB}/\text{DBC}$ (DEL GIORGIO; COLE, 1998).

1.3.3 Densidade e Atividade Bacteriana

No laboratório, as amostras já fixadas em campo foram processadas previamente para remover a grande quantidade de material particulado presente na água acumulada nas bromélias. Nesta etapa as amostras foram acondicionadas em microtubos de 2 mL e centrifugadas a 2.000 rpm durante 1 minuto (LUNAU et al., 2005). O sobrenadante contendo as bactérias foi transferido para um microtubo estéril de 2 mL e as amostras foram então coradas com adição de 10 μL do marcador fluorescente de alta sensibilidade e especificidade com ácidos nucleicos DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 10 minutos, segundo método descrito por Porter e Feig (PORTER; FEIG, 1980). Ao final do tempo de ação do corante 1 mL de cada amostra foi filtrado individualmente utilizando um sistema de filtração múltipla (1225 Sampling Manifold, Millipore®) acoplada em bomba a vácuo usando

baixa pressão (5 mm Hg) para evitar a alteração ou lise celular. Foram utilizados filtros de policarbonato escuro com porosidade de 0,2 μm (Isopore, Millipore[®]), acondicionados sobre filtro GF/C (1.2 μm , Whatman[®]) para a distribuição homogênea das células sobre o filtro.

As lâminas para a microscopia foram preparadas posicionando o filtro de policarbonato escuro de cada amostra, adicionando óleo não fluorescente sobre o filtro e cobrindo-o com lamínulas. As lâminas foram posteriormente fotografadas utilizando câmera (AxioCam105) adaptada a um microscópio de epifluorescência (Zeiss AxioPlan) com magnificação de 1000x e a contagem das células foi realizada nas imagens dos 20 campos aleatórios de cada lâmina utilizando o plugin “Cell Counter” no software ImageJ. Os resultados foram calculados considerando o número de células contadas, área do filtro e o volume filtrado. Os valores obtidos foram usados para calcular a abundância total de células estimadas para a amostra (expresso em célula mL^{-1}).

A biomassa foi calculada multiplicando o valor do carbono celular pela abundância bacteriana (célula L^{-1}), seguido pela multiplicação do resultado pelo fator de conversão de 20 fg C célula⁻¹ e expressa em $\mu\text{gC L}^{-1}$ (DUCKLOW, 2000), para bactérias não cultivadas. A atividade bacteriana foi obtida a PB pela biomassa bacteriana, de acordo com Chróst e Faust (1999), e o valor dessa razão foi utilizado para avaliar a taxa de crescimento/renovação da comunidade bacteriana entre os cenários de precipitação.

1.3.4 Diversidade Metabólica Bacteriana

A análise de diversidade metabólica bacteriana, ou diversidade funcional bacteriana, foi baseada na diferença do consumo de 31 diferentes fontes de carbono usando o Biolog Ecoplate[™]. Estas formas específicas de carbono são distribuídas na placa em triplicatas ao longo de 96 poços individuais (32 poços por amostra). A técnica se baseia na avaliação da reação redox do tetrazólio violeta como indicador do metabolismo da fonte de carbono em cada poço (31 fontes de carbono diferentes e 1 poço sem qualquer fonte de carbono, utilizado como branco) e a reação gera

uma coloração roxa aumentando a densidade ótica (DO) da amostra (CHRISTIAN; LIND, 2006; NAVARRO et al., 2008).

Nesta análise, 150 uL de amostra de água não filtrada de cada bromélia foi adicionada nos 32 poços da placa Biolog Ecoplate™ e a DO de cada poço foi analisada usando um adaptador de microplaca Varian Cary 50 Microplate Reader com comprimento de onda de 595 nm, conforme indicado pelo fabricante. As medições para acompanhar a alteração da coloração mediada pelo crescimento bacteriano em cada um dos poços foram realizadas diariamente nos 5 dias seguintes após o início da incubação.

O tempo de incubação utilizado no cálculo final da diversidade metabólica foi definido a partir dos valores da média de mudança da DO de cada poço (aqui usada a sigla em inglês, AWCD, “*Average Well Color Development*”), obtido pela fórmula $AWCD = \Sigma DO/31$, onde DO é o resultado da densidade ótica de cada poço e 31 o número de substratos da placa (IBEKWE; KENNEDY, 1998). Em seguida os valores de AWCD foram selecionados quando os valores foram iguais ou superiores a 0,75. Este valor é recomendado, pois a atividade bacteriana alcança a assíntota do desenvolvimento de cor e a resposta da comunidade bacteriana pode ser detectada na maioria dos poços (STEFANOWICZ, 2006).

As 31 formas de carbono foram agrupadas em 5 grupos principais para análise dos resultados: Aminas, Aminoácidos, Polímeros, Ácidos Carboxílicos e Carboidratos. Tanto para os tipos de carbono como para os grupos, os valores da DO igual ou maior que 0,25 foram considerados como os casos que apresentaram atividade da comunidade bacteriana e o consumo de carbono presente nos poços. No presente estudo, a DO foi abordada como um índice para a degradação do substrato pela comunidade microbiana e os valores inferiores foram considerados como sem atividade da comunidade bacteriana.

1.3.5 Diversidade Genética Bacteriana

Em laboratório, o DNA foi reidratado e extraído utilizando o kit de extração de DNA MoBio PowerSoil® de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O DNA foi amplificado a partir do gene 16S do RNAr utilizando primers 515 e 806 (*E. coli*) da

região V4 de acordo com o protocolo sugerido para o projeto “Earth Microbiome” (CAPORASO et al., 2012). Após a etapa de amplificação, o amplicon (produto da amplificação do PCR) de cada amostra foi reunido em uma única biblioteca de forma que cada um contribuísse com a mesma quantidade de DNA. As enzimas remanescentes do PCR e os dímeros de primers (primer-dimer) foram removidos da biblioteca de amplicons utilizando o kit MoBio UltraClean® PCR.

A quantificação da biblioteca foi realizada no Núcleo de Genotipagem e Sequenciamento (GenoSeq Core, Universidade da Califórnia) utilizando o analisador de alta precisão Agilent Bioanalyzer™ e o kit Kappa Biosystems' Illumina Genome Analyzer™ (KAPA SYBR FAST Roche LightCycler 480), com posterior análise da PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O Sequenciamento foi realizado também no GenoSeq Core, utilizando o sequenciador Illumina MiSeq™ e segundo o protocolo padrão do fabricante.

O sequenciamento gerou 15.090.774 sequências extremidades pareadas (*paired end*), com 2 x 300 pares de base cada. A análise destas sequências foi realizada usando o programa QIIME e as leituras das extremidades pareadas foram mescladas após o corte das leituras *forward* no comprimento 240 e das leituras *reverse* no comprimento 160. Em seguida as sequências mescladas foram filtradas qualitativamente usando configuração padrão do QIIME, gerando 9.481.315 sequências de comprimento mediano de 253. O programa *cd-hit-otu* foi utilizado para remover possíveis ruídos e reagrupar as sequências restantes. O programa agrupa marcações de RNAr em unidades taxonômicas operacionais (OTU, sigla em inglês) e possui alta velocidade dos agrupamentos e precisão na identificação de OTU (LI; XING; WU, 2012). Nesta etapa as sequências brutas (*raw sequence*) foram agrupadas em OTUs de acordo com similaridade igual ou maior que 97%, gerando 1.928 OTUs, que representou 6.977.382 sequências considerando todas as amostras. Após da definição das OTUs foi realizado o agrupamento baseado na sequência única mais abundante de cada OTU, definida como sequência representativa (ou centroides). Esta etapa de identificação taxonômica foi realizada usando o algoritmo do *uclust* baseado no banco de dados GreenGenes (MCDONALD et al., 2012). A similaridade foi definida pelos *hits* (encontros) das sequências das amostras (*query*) com o banco de dados e considerou os primeiros 20 hits com limite de similaridade igual ou maior que 90%. Assim, no caso onde

algum *query* apresentou similaridade abaixo de 90% com o banco de dados, estes foram considerados não-identificados (unassigned). O alinhamento das sequências com o banco de dados GreenGenes foi feito usando PyNAST . Ao fim do processo, foram geradas 186 OTUs com 3.307.871 sequências, considerando todas as amostras.

1.4 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Rstudio®, versão 0.99.892 (RSTUDIO TEAM, 2015), um ambiente de desenvolvimento integrado para o R versão 3.3.0 (R CORE TEAM, 2016). O estudo utilizou diversas análises com pacotes específicos que serão descritos abaixo em tópico referente a cada uma delas.

1.4.1 Variáveis Baseadas na Temperatura e Profundidade

Para organizar os resultados em variáveis que caracterizassem a dinâmica da temperatura e a dinâmica hídrica do sistema foram utilizadas as funções *mutate* e *summarise* do pacote dplyr (WICKHAM; FRANCOIS, 2016). A função *mutate* criou de novas variáveis na série de dados, enquanto a função *summarise* resumiu múltiplos valores em um valor único. Os cálculos das variáveis consideraram as variações hídricas e de temperatura durante todo o experimento, bem como as variações ocorridas até 7 dias antes (de 0 horas a 168 horas) do momento da amostragem. Esses cálculos estimaram os valores médios, mínimos e máximos de temperatura e da profundidade para os diferentes tempos anteriores ao momento da amostragem. Estas variáveis abióticas baseadas nos dados de temperatura e profundidade foram utilizadas nas análises estatísticas para testar a possível influência no metabolismo microbiano, biomassa, diversidade genética e diversidade funcional.

Os valores de profundidade de cada cenário foram utilizados para calcular as demais variáveis que caracterizaram a dinâmica hídrica em cada cenário de

precipitação. Baseados nas informações de profundidades máxima, mínima e o desvio padrão, foram calculados o grau de dessecação (razão entre a profundidade média e a profundidade máxima), amplitude de variação da profundidade (diferença entre a profundidade máxima e mínima) e dias de seca (soma dos dias em que a profundidade foi igual a zero) de cada cenário.

Os dados das temperaturas em cada cenário também foram calculados resultando nas variáveis temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura média, amplitude da temperatura (diferença entre a temperatura máxima e a temperatura mínima) e o coeficiente de variação da temperatura (razão entre o desvio padrão e a média da temperatura).

1.4.2 Influência dos Tratamentos de Precipitação nas Variáveis Abióticas

Para testar a influência dos tratamentos de precipitação nas variáveis ambientais, foi utilizado um modelo linear (LM) multivariado, considerando os dados ambientais como variáveis dependentes e os tratamentos de precipitação como variáveis independentes. Os tratamentos de precipitação foram inseridos no modelo a partir de um desenho 2x2, isto é, considerando os fatores Mu e K separadamente. Uma análise de variância (ANOVA) testou a hipótese nula de que as variáveis abióticas são idênticas ao longo dos quatro tratamentos de precipitação. A hipótese nula foi rejeitada nos resultados onde p foi igual ou menor a 0,5.

1.4.3 Metabolismo Bacteriano

Os resultados dos parâmetros bacterianos relacionados ao metabolismo (RB, PB, DBC e ECB, bem como a abundância e atividade bacteriana) foram analisados, separadamente, utilizando os LM como acima. Inicialmente, selecionamos co-variáveis abióticas (hidrologia, temperatura e nutrientes) que poderiam ajudar a explicar a variação de cada um dos parâmetros relacionados ao metabolismo bacteriano a partir de um teste da colinearidade, utilizando a função “vif” do pacote “car” (FOX; WEISBERG, 2011), seguido do melhor ajuste da distribuição do modelo em relação ao resíduo no gráfico Q-Q Plot, de acordo com as seguintes funções:

```
>normano(residuals(modelo,type="pearson"));qqline(residuals(modelo,type="pearson"))  
> vif(modelo)
```

Após a seleção das variáveis abióticas, o modelo final foi elaborado considerando, além das variáveis abióticas selecionadas acima, os dias de amostragem (i.e tempo) e os cenários de pluviosidade nos fatores Mu e K. Em seguida, a hipótese nula de que as variáveis-resposta não foram diferentes ao longo dos tratamentos de precipitação e dias de amostragem foi testada usando uma ANOVA nos modelos selecionados.

1.4.4 Perfil e Diversidade Funcional da Comunidade Microbiana

A influência da alteração da precipitação na capacidade da comunidade bacteriana degradar diferentes formas de carbono foi testada utilizando um LM aninhado considerando os valores da DO de tipos e grupos de compostos de carbono como variáveis respostas e os tratamentos como variáveis explicativas. O modelo linear aninhado testou a variação da utilização de carbono entre e dentro dos tratamentos de precipitação. Em seguida uma ANOVA foi usada para testar a variância do uso de dos tipos e grupos carbono ao longo dos tratamentos de precipitação.

Para observar o quanto cada cenário variou em relação ao consumo dos tipos e grupos, os resultados da soma da diferença entre o tratamento controle e os demais tratamentos foram divididos pelo número de tipos e grupos de carbono. Os valores obtidos foram então comparados para definir em qual cenário houve maior e menor alteração relativa no consumo dos tipos e grupos de carbonos.

As diferenças do perfil funcional da comunidade foram avaliadas usando escalonamento multidimensional *não*-métrico (NMDS) das matrizes de distância dos tipos e grupos de carbono entre os quatro cenários de precipitação (KINDT; COE, 2005). Diferente de outras técnicas de ordenação, que dependem de distâncias (principalmente Euclidiana), o NMDS usa ordens de classificação e é uma técnica considerada mais flexível para acomodar uma variedade de diferentes tipos de dados. Em seguida foi utilizada uma análise multivariada de permutação

(PERMANOVA) com a função “adonis” do pacote “vegan” (OKSANEN et al., 2016), sobre dados das matrizes de dissimilaridade (Bray-Curtis) dos tipos e grupos de carbono para testar as diferenças na função microbiana entre os cenários de precipitação. Valores $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

1.4.5 Composição e Diversidade Genética Microbiana

Os dados filogenéticos gerados foram organizados seguindo o protocolo descrito por McMurdie e Holmes (2014) para o pacote Phyloseq com adaptações no protocolo para incorporação dos dados filogenéticos gerados no R. Os dados da diversidade molecular bacteriana foram avaliados considerando os níveis taxonômicos de OTU, filo e classe microbianos como variáveis-resposta em modelos lineares testando a alteração destas ao longo dos tratamentos de precipitação. Os modelos lineares gerados foram testados com uma ANOVA, com a hipótese nula de que OTU, filo e classe microbianos não variaram ao longo dos tratamentos de precipitação. A hipótese nula foi rejeitada em valores de p iguais ou menores que 0,05.

Para avaliar a variação do número de sequências de OTU, classe e filós microbianos entre os cenários de precipitação, foi calculada a diferença entre o tratamento controle e os demais tratamentos e divididos pelo número de OTU, filo e classe. Os valores obtidos foram então comparados para definir em qual cenário houve maior e menor alteração relativa baseada na variação do número de sequências em relação ao cenário controle. A diversidade foi avaliada utilizando o índice de diversidade de Shannon (H') e as curvas de rarefação da diversidade alfa foram geradas pela subamostragem das sequências em 100 vezes sem reposição. Para testar se houve diferença da diversidade alfa e da riqueza da comunidade ao longo dos tratamentos, foi utilizada uma ANOVA.

A equitabilidade de espécies foi avaliada graficamente utilizando o perfil de diversidade de Rényi (função “renyi” do pacote “vegan”), onde o perfil mais horizontal denota maior equitabilidade das espécies.

As análises da composição da comunidade bacteriana foram baseadas nas distâncias pelo escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) através da

função “NMSrandom” do pacote “BiodiversityR”. Nesse teste foram utilizados os dados das amostras finais e também da diferença entre o tratamento controle os demais tratamentos de precipitação. As dissimilaridades da composição em ambos os dados foram testadas usando uma PERMANOVA (função adonis do pacote “vegan”), onde $p < 0,05$ foi considerado como significativo.

Como comparação com a NMDS, também foram consideradas medidas de ordenação alternativas como Jaccard (REAL; VARGAS, 1996) e Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957), que produziram resultados similares.

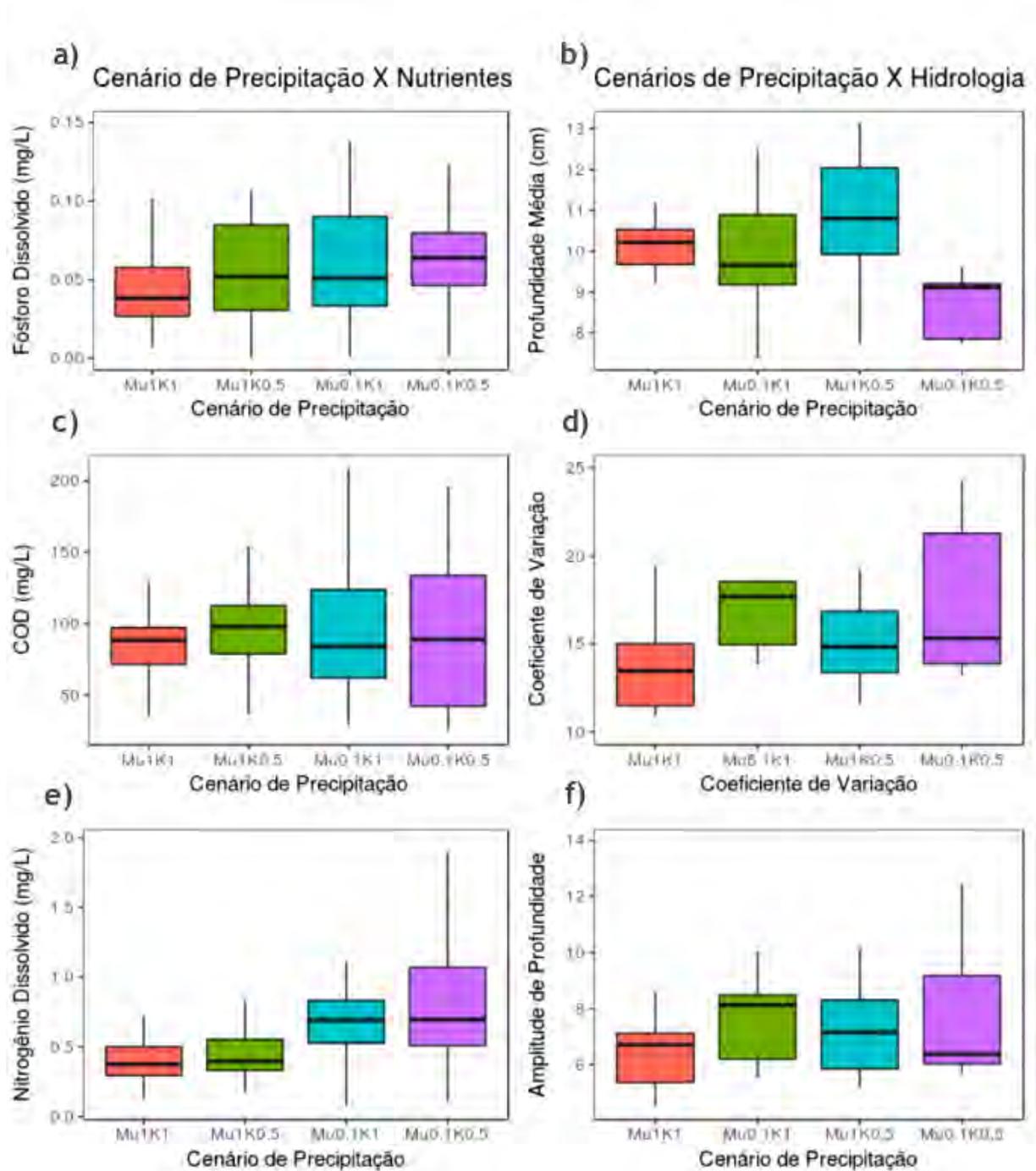
2 RESULTADOS

2.1 Variáveis Abióticas

O estudo considerou como variáveis abióticas a dinâmica hidrológica no sistema (avaliada através de uma série de medidas da profundidade da coluna d'água nos tanques), a temperatura e a concentração de nutrientes entre os cenários estudados. Estas variáveis foram influenciadas de forma distinta pelos dois fatores utilizados no cenário de precipitação (Mu e K).

As análises de variância mostraram que as variáveis hidrológicas avaliadas no estudo foram influenciadas pela alteração das precipitações com redução dos valores de profundidade média no cenário Mu0.1K0.5 (Figura 4). A redução da profundidade mínima foi relativamente maior do que a redução dos valores de profundidade máxima, refletindo no aumento do coeficiente de variação da profundidade (d, Figura 4) e da amplitude (f, Figura 4). Quando os fatores de precipitação foram avaliados separadamente, os resultados mostraram influência de Mu sobre essas variáveis hidrológicas (ANOVA, $p < 0,05$), mas sem diferença significativa entre os fatores K1 e K0.5 (ANOVA, $p > 0,05$).

Figura 4 – Influência das alterações da precipitação sobre as variáveis abióticas



Legenda: Variação de nutrientes (a, c, e) e de variáveis hidrológicas (b, d, f) de acordo com os cenários de precipitação utilizados no experimento. Em relação aos nutrientes, fósforo e nitrogênio variaram com a alteração da precipitação (ANOVA, $p < 0,05$). A profundidade média foi acentuadamente menor no cenário Mu0.1K0.5 (ANOVA, $p < 0,05$) e o aumento da profundidade mínima dos demais tratamentos resultou em alteração do coeficiente de variação (d) e amplitude da profundidade (f) com a alteração dos cenários de precipitação (ANOVA, $p < 0,05$).

As análises de variância da temperatura não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$), porém apresentaram tendência de maior variação de temperatura e de temperatura média quando houve redução tanto da frequência quanto do volume de precipitação.

As análises dos nutrientes revelaram aumento das concentrações de nitrogênio dissolvido e fósforo dissolvido apenas com a redução do volume da precipitação (tratamento Mu0.1, ANOVA, $p < 0,05$).

2.1 Metabolismo Bacteriano

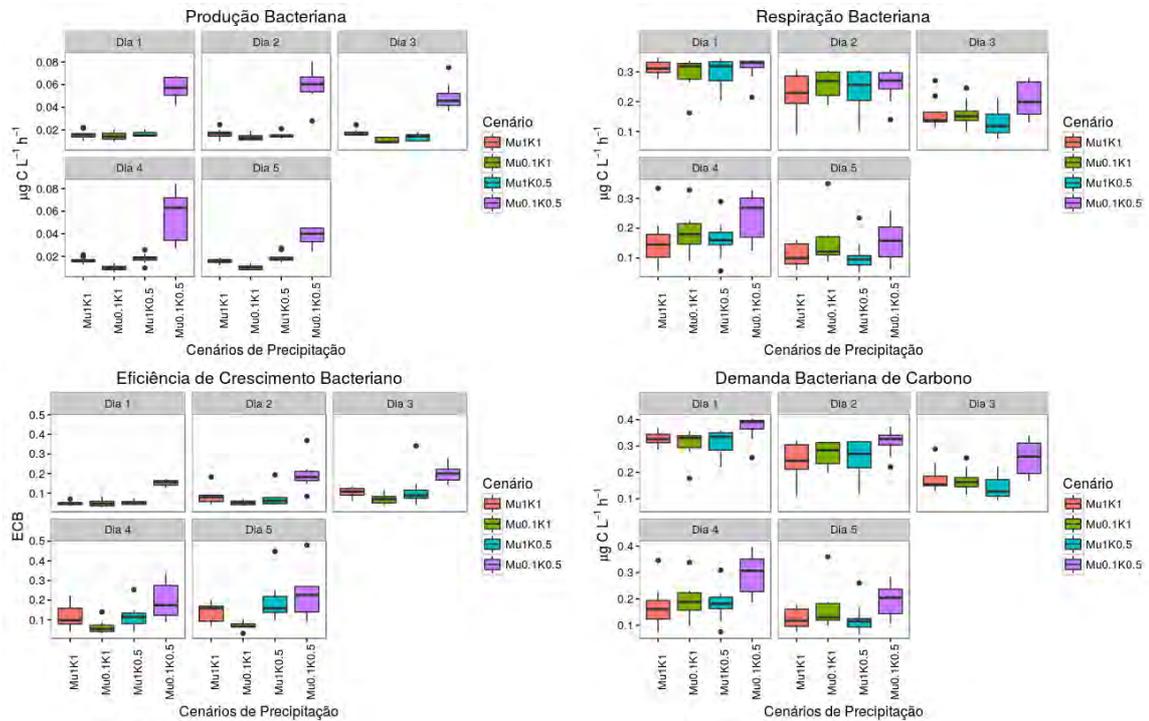
2.1.1 Influência da alteração na precipitação

Inicialmente, serão mostradas as diferenças temporais do metabolismo bacteriano dos três cenários onde a chuva foi manipulada (Mu1K0.5, Mu0.1K1, Mu0.1K0.5) em relação cenário controle (Mu1K1). Em seguida serão mostradas as diferenças relacionadas à alteração na intensidade das chuvas (Mu1, Mu0.1) e na frequência dos eventos (K1, K0.5), isoladamente.

Foram observadas variações temporais no metabolismo bacteriano em função dos cenários de precipitação (Figura 5). Em relação à PB, o cenário Mu0.1K1 apresentou as maiores reduções temporais deste processo, chegando a redução média de 42% em relação ao cenário controle, enquanto que, sob o cenário Mu1K0.5, a PB apresentou diminuição em 23% no terceiro dia de amostragem, e aumento de 23% no quinto dia de amostragem (Figura 5). Por outro lado o cenário Mu0.1K0.5 resultou em aumentos médios de 257% na PB no primeiro dia de amostragem do experimento, e 142% no quinto dia de amostragem.

Seguindo a mesma tendência da PB, a ECB apresentou aumento no cenário Mu0.1K0.5, com aumento médio de 215% no primeiro dia de amostragem e 72% no último dia de amostragem (Figura 5). No cenário Mu1K0.5 a ECB apresentou redução média de 11,5% na segunda amostragem e aumento médio de 37,5% no quinto dia. No cenário Mu0.1K1 a tendência foi de redução, chegando a 49% em relação ao controle, com valor positivo apenas no primeiro dia de amostragem (2,4%).

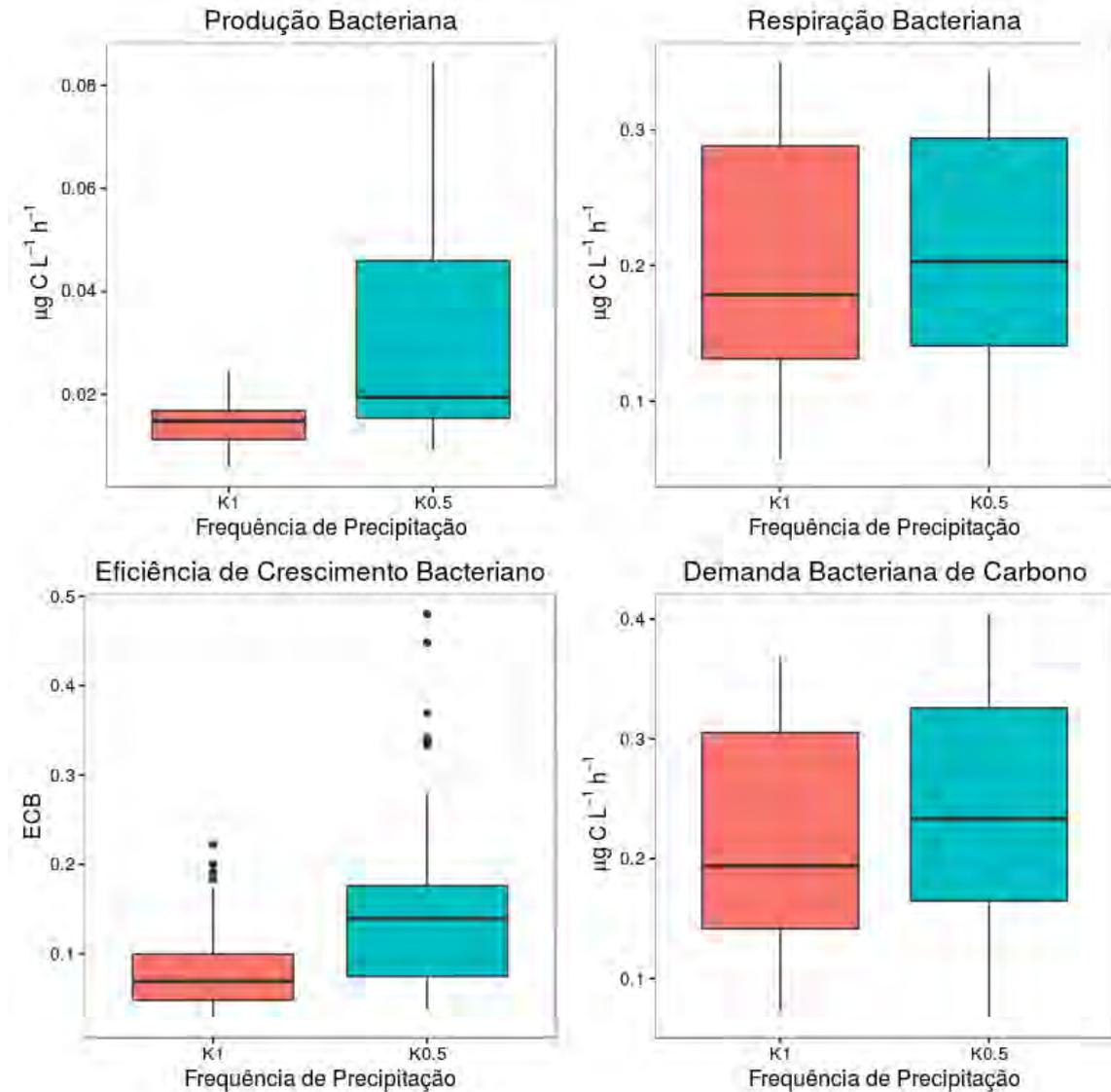
Figura 5 – Variação dos processos metabólicos em cada cenário considerando os diferentes dias de amostragem do experimento



Legenda: Enquanto a produção bacteriana apresentou uma tendência de maiores valores no cenário mais extremo (Mu0.1K0.5), respiração bacteriana não apresentou distinção clara entre tratamentos ao longo dos dias, porém pode-se observar a tendência de redução deste processo a partir do terceiro dia de amostragem.

No geral, e considerando todos os tempos de amostragem de forma integrada, observamos que o cenário Mu1K0.5 foi o que mais se diferenciou do cenário controle (Figura 6), sendo estas diferenças caracterizadas por um aumento significativo da PB (ANOVA, $p < 0,001$), com consequente aumento da ECB (ANOVA, $p < 0,001$). Tanto a RB quanto a DBC mostraram leve tendência de aumento nos cenários com manipulação de chuvas em relação ao controle (Figura 6), porém tais diferenças não foram significativas (ANOVA, $p > 0,05$).

Figura 6 – Influência dos cenários de precipitação nos processos metabólicos microbianos

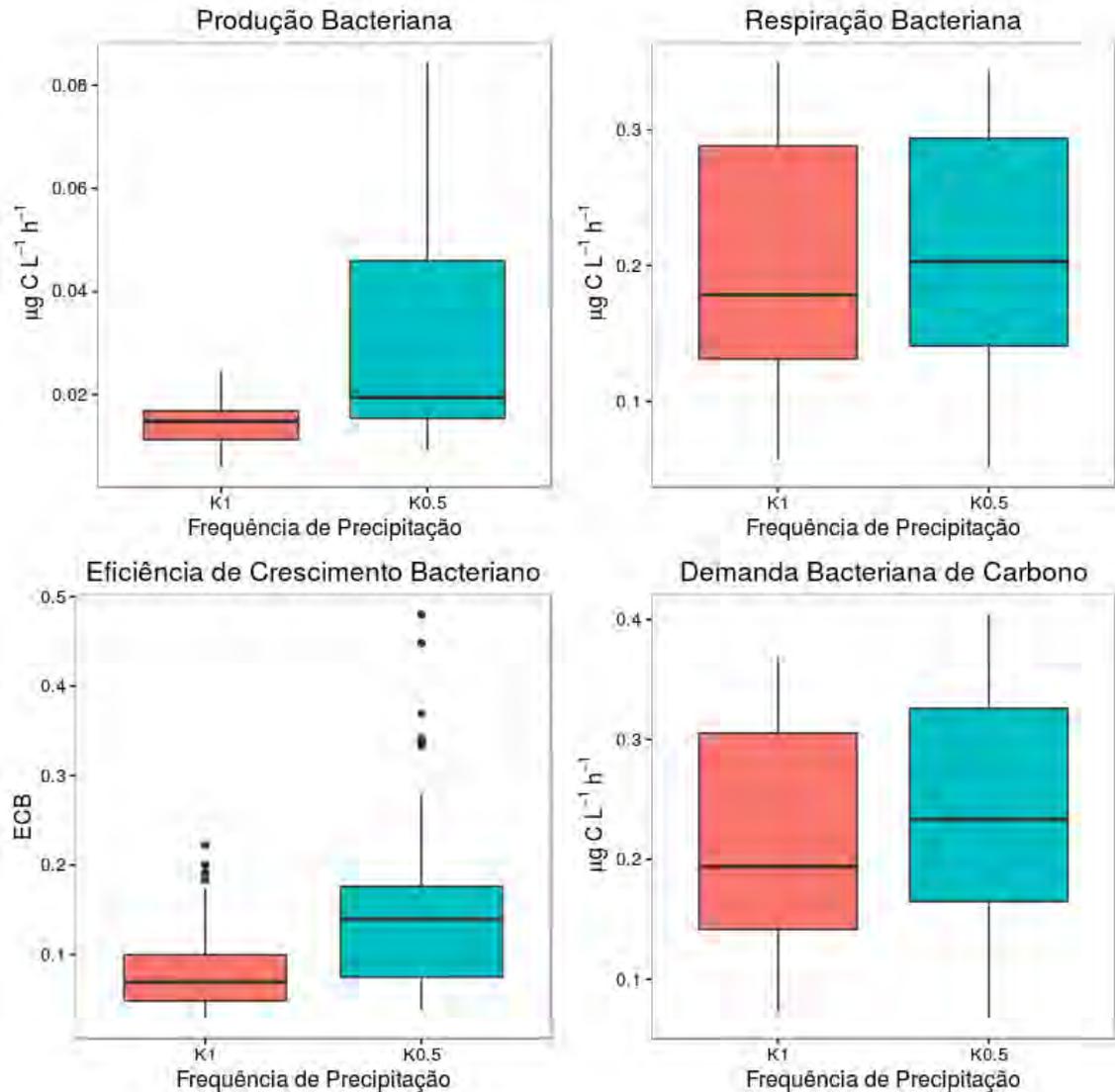


Legenda: O cenário mais extremo de redução na precipitação resultou em aumento da produção bacteriana e da eficiência do crescimento bacteriano (ANOVA, $p < 0,001$), que é a razão entre a mas não apresentou influência significativa para respiração bacteriana e demanda bacteriana de carbono.

A avaliação isolada dos fatores relacionados à alteração na frequência das chuvas (K, Figura 7 e intensidade das chuvas (Mu, Figura 8) mostrou que a PB e a ECB aumentaram nos tratamentos onde houve reduções do volume (Mu) e da frequência (K) de precipitações separadamente, bem como também na interação de ambos (Tabela 2, Figuras 7 e 8). Além disso, tanto a PB quanto a ECB apresentaram também aumento variação nos cenários com redução de Mu e K. Por

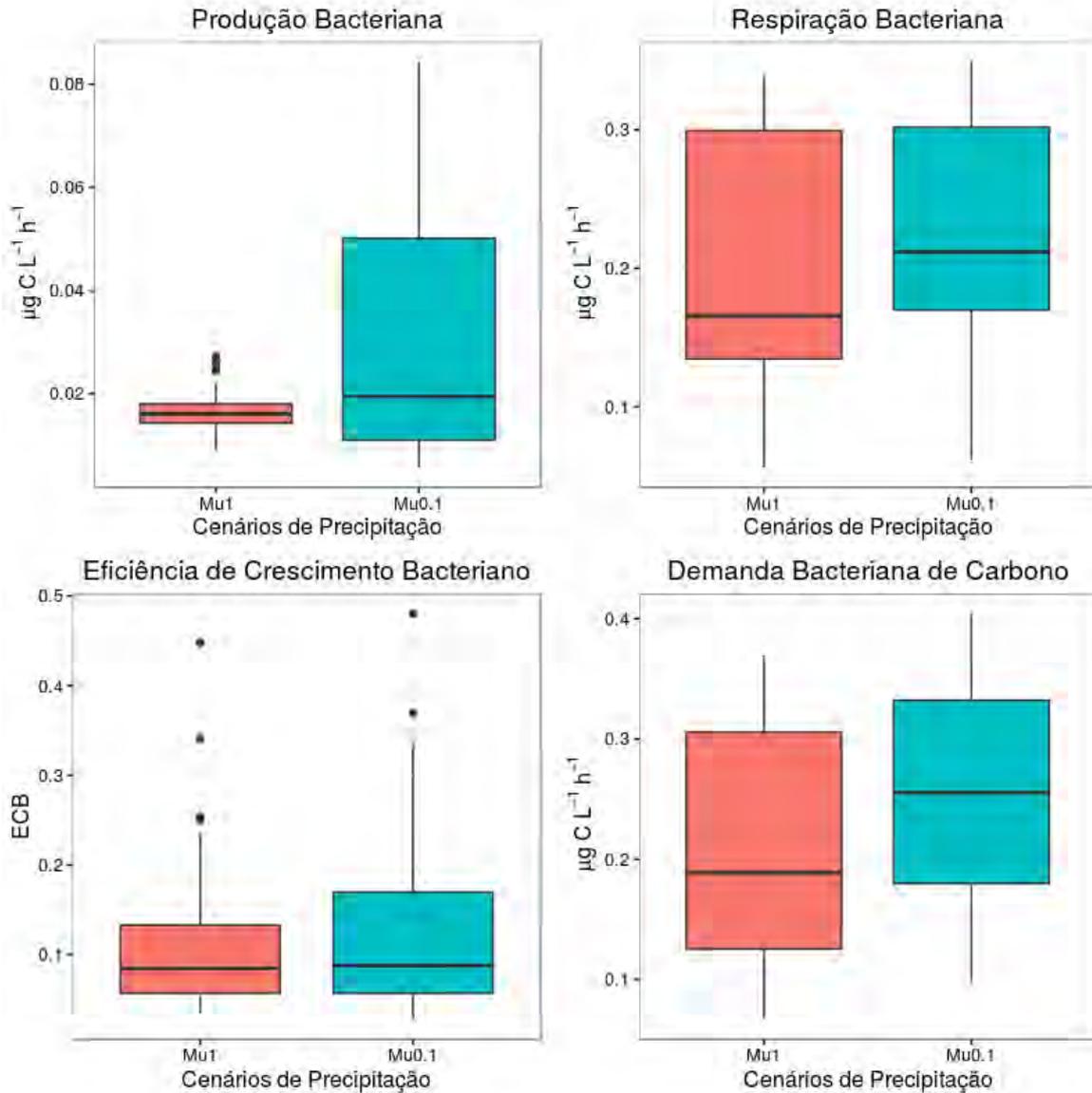
outro lado, a RB não foi influenciada pela redução de Mu ou K (ANOVA, $p > 0,05$, Figura 7).

Figura 7 – Variação dos processos metabólicos bacterianos com relação à frequência (K) de precipitação considerando todo o experimento.



Legenda: A redução em K levou ao aumento da produção bacteriana (ANOVA, $p < 0,001$) e eficiência do crescimento bacteriano (ANOVA, $p < 0,01$) tanto na média quanto no intervalo de variação. Por outro lado não foi observada influência significativa (ANOVA, $p > 0,05$) nos resultados de respiração bacteriana e demanda bacteriana de carbono.

Figura 8 - Variação dos processos metabólicos bacterianos com relação ao volume (Mu) de precipitação considerando todo o experimento



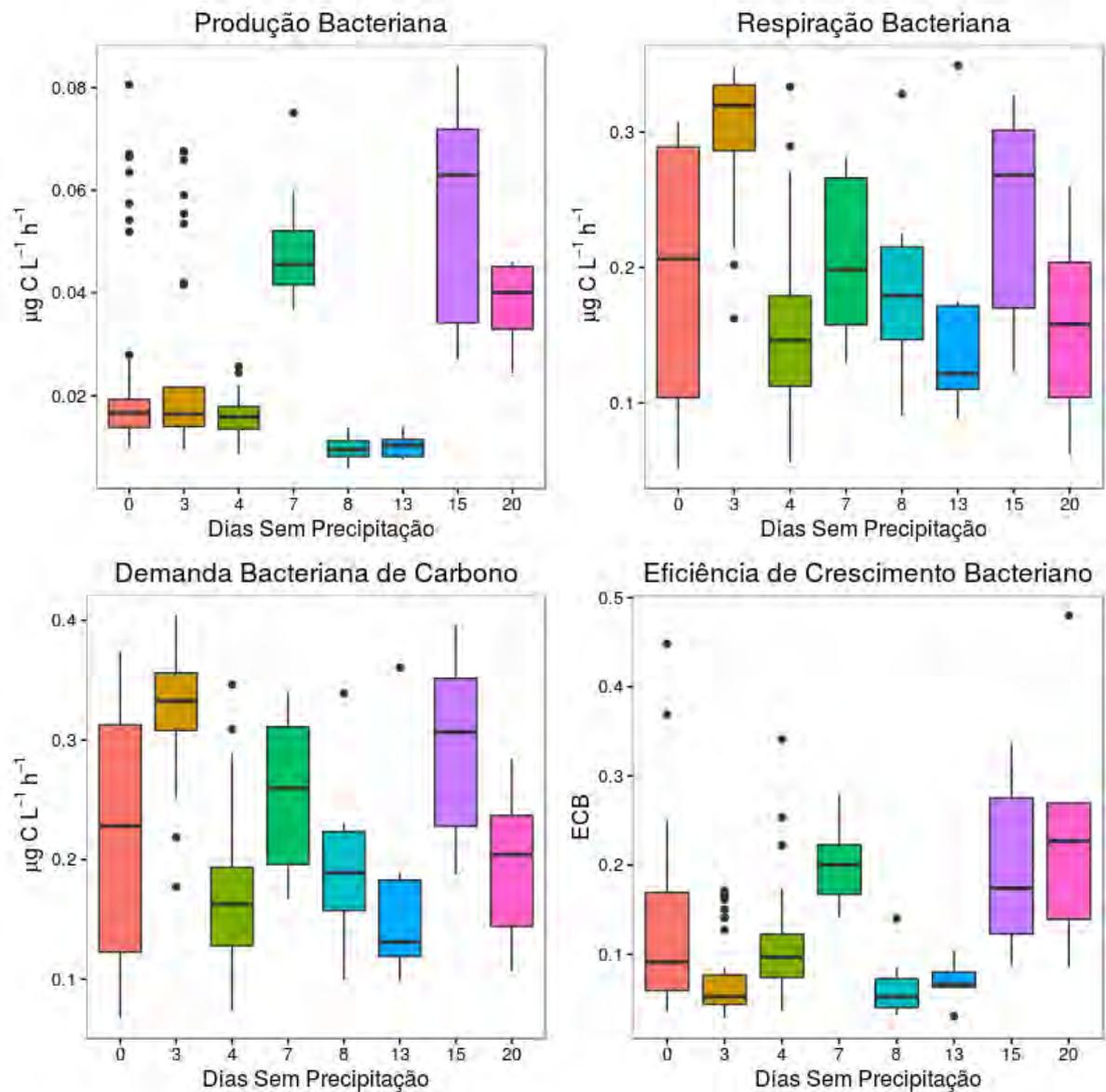
Legenda: A redução em Mu, resultou em aumento dos valores e da variação da produção bacteriana (ANOVA, $p < 0,001$) e eficiência do crescimento bacteriano (ANOVA, $p < 0,01$). Por outro lado não foi observada influência significativa de Mu (ANOVA, $p > 0,05$) nos resultados de respiração bacteriana e demanda bacteriana de carbono.

Tabela 2 - Efeito do tempo (dia de amostragem, DA), frequência de precipitação (K) e volume de precipitação (Mu) sobre os processos metabólicos bacterianos, segundo as análises de modelos lineares de efeito misto (lme). Valores destacados indicam resultados significativos ($p < 0,05$). Com exceção da respiração bacteriana, os demais processos foram influenciados por K, Mu e a interação entre ambos. Os resultados mostraram influência positiva da redução da frequência da precipitação nos valores de Produção Bacteriana, da Eficiência do Crescimento Bacteriano (ECB) e da Demanda Bacteriana por Carbono (DBC). A redução do volume de precipitações resultou no aumento de todos os processos avaliados. DA foi significativo para todos os processos.

Variável Resposta	Variáveis	Grau de Liberdade	F	P
Produção Bacteriana	K	1	106,79	0,01
	Mu	1	82,18	0,01
	Mu x K	1	137,94	0,01
	DA	4	4,49	0,01
	K X DA	4	2,16	0,072
	Mu X DA	4	9,57	0,01
	Respiração Bacteriana	K	1	1,82
Mu		1	11,01	0,01
Mu x K		1	1,44	0,24
DA		4	178,42	0,01
K X DA		4	1,64	0,16
Mu X DA		4	4,28	0,01
DBC	K	1	8,67	0,01
	Mu	1	22,03	0,01
	Mu x K	1	9,14	0,01
	DA	4	183,12	0,01
	K X DA	4	1,97	0,10
	Mu X DA	4	3,07	0,02
ECB	K	1	36,91	0,01
	Mu	1	4,76	0,03
	Mu x K	1	37,84	0,01
	DA	4	21,50	0,01
	K X DA	4	2,89	0,02
	Mu X DA	4	2,45	0,04

A análise avaliando a possível influência do evento de chuva sobre o metabolismo bacteriano considerou o número de dias sem ocorrência de chuvas que antecederam o dia de amostragem (Figura 9). Os resultados mostraram que os dias sem precipitação influenciaram o processo de RB (ANOVA, $p < 0,01$), com maior aumento nos tratamentos onde o evento de chuva ocorreu três dias antes da amostragem. A DBC também apresentou alteração significativa quando avaliados os dias sem precipitação (ANOVA, $p < 0,001$), com maior aumento nos tratamentos onde o evento de chuva ocorreu três dias antes da amostragem. Por outro lado, a PB foi influenciada pelo dia sem precipitação (ANOVA, $p < 0,001$), com maior aumento nos cenários onde o último evento de chuva ocorreu 15 dias antes da amostragem e redução quando o evento de chuva ocorreu 8 dias antes da amostragem. O número de dias sem precipitação também influenciou significativamente os resultados de ECB (ANOVA, $p < 0,001$), com maiores resultados quando os eventos de chuva ocorreram 15 e 20 dias antes da amostragem, respectivamente.

Figura 9 – Influência do ultimo dia de precipitação sobre o metabolismo microbiano



Legenda: A diferença de dias entre o último evento de precipitação e do dia de amostragem influenciou significativamente todos os processos bacterianos, embora sem um padrão claro de aumento ou diminuição em função do número de dias sem precipitação.

Resumindo, a PB foi mais influenciada em função de alterações nos padrões de precipitação, com consequências diretas sobre a ECB. Estas alterações ocorreram tanto quando consideramos os cenários de alteração de chuvas (Mu1K0.5, Mu0.1K1, Mu0.1K0.5) em relação ao cenário controle (Mu1K1), quando consideramos cada faceta de alteração das chuvas (Mu, ou K) isoladamente. O último evento de precipitação antes da amostragem influenciou os resultados de PB

e apresentou maiores valores quando o evento ocorreu 15 e 20 dias antes da amostragem, respectivamente.

2.1 Variáveis abióticas e processos metabólicos

2.3.1 Influência das Variáveis de Temperatura Sobre o Metabolismo Bacteriano

A RB variou significativamente com a temperatura máxima no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,01$), com temperatura máxima de dois dias antes da coleta, (ANOVA, $p < 0,001$), com a temperatura máxima de três dias antes da coleta (ANOVA, $p < 0,05$) e com a da variação da temperatura nas últimas 72 horas antes da coleta (ANOVA, $p < 0,001$), porém sem tendência clara de aumento ou diminuição em relação a estes parâmetros. Os resultados considerando a temperatura média das últimas 24 horas do experimento mostraram aumento da RB a partir dos 23 °C (ANOVA, $p < 0,05$). Por outro lado, a PB foi influenciada significativamente apenas pela temperatura média das últimas 96 horas anteriores à amostragem (ANOVA, $p < 0,05$), sem contudo apresentar tendência de aumento ou redução desse processo.

A DBC foi influenciada significativamente, mas assim como a RB, não apresentou tendência clara, pelas temperaturas máximas das 24 horas (ANOVA, $p < 0,01$), 48 horas (ANOVA, $p < 0,001$) e 72 horas (ANOVA, $p < 0,05$) anteriores à amostragem. A temperatura média nas 144 horas anteriores à amostragem (ANOVA, $p < 0,01$) resultou em maiores valores da DBC a partir dos 23 °C, por outro lado a variação da temperatura nas 72 horas anteriores à amostragem foi significativa porém sem tendência observada (ANOVA, $p < 0,001$). Com relação à ECB foi detectada influência significativa, mas sem tendência clara, da temperatura máxima das 24 horas (ANOVA, $p < 0,01$) e 48 horas (ANOVA, $p < 0,01$) anteriores à amostragem, temperatura média das 24 horas anteriores à amostragem (ANOVA, $p < 0,05$) e variação da temperatura nas 24 horas (ANOVA, $p < 0,05$) e 72 horas (ANOVA, $p < 0,05$) anteriores à amostragem.

A RB foi influenciada significativamente pelas alterações nas profundidades máxima e mínima no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,001$), além da profundidade média das últimas 24 horas (ANOVA, $p < 0,001$), apresentando valores acima de $0,15 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nas profundidades menores que 7,5 cm. A influência da

profundidade mínima total (ANOVA, $p < 0,001$) e do grau de dessecação das últimas 96 horas (ANOVA, $p < 0,001$) não apresentou tendência clara nos resultados obtidos.

A PB foi influenciada pela profundidade máxima nas últimas 24 horas anteriores à amostragem (ANOVA, $p < 0,05$) e pela profundidade mínima no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,05$). Foi observada redução da variabilidade da PB nas profundidades acima de 10,5 cm.

As análises da DBC variaram com o grau de dessecação no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,001$) e nas últimas 96 horas (ANOVA, $p < 0,05$), mas sem tendência clara de aumento ou redução. A DBC também foi influenciada pela profundidade máxima total (ANOVA, $p < 0,001$) e apresentou valores acima de $0,15 \mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ quando a profundidade máxima no momento da amostragem foi menor que 7,5 cm (ANOVA, $p < 0,001$). A redução dos valores médios da profundidade total (ANOVA, $p < 0,001$) e nas 24 horas anteriores à amostragem (ANOVA, $p < 0,01$) também levou ao aumento da DBC quando abaixo de 7,8 cm. A ECB foi influenciada pela profundidade máxima no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,001$) e profundidade mínimas no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,05$), profundidade mínima total (ANOVA, $p < 0,05$) e profundidade mínima no momento da amostragem (ANOVA, $p < 0,05$), profundidade média total (ANOVA, $p < 0,05$) e o grau de dessecação (ANOVA, $p < 0,01$).

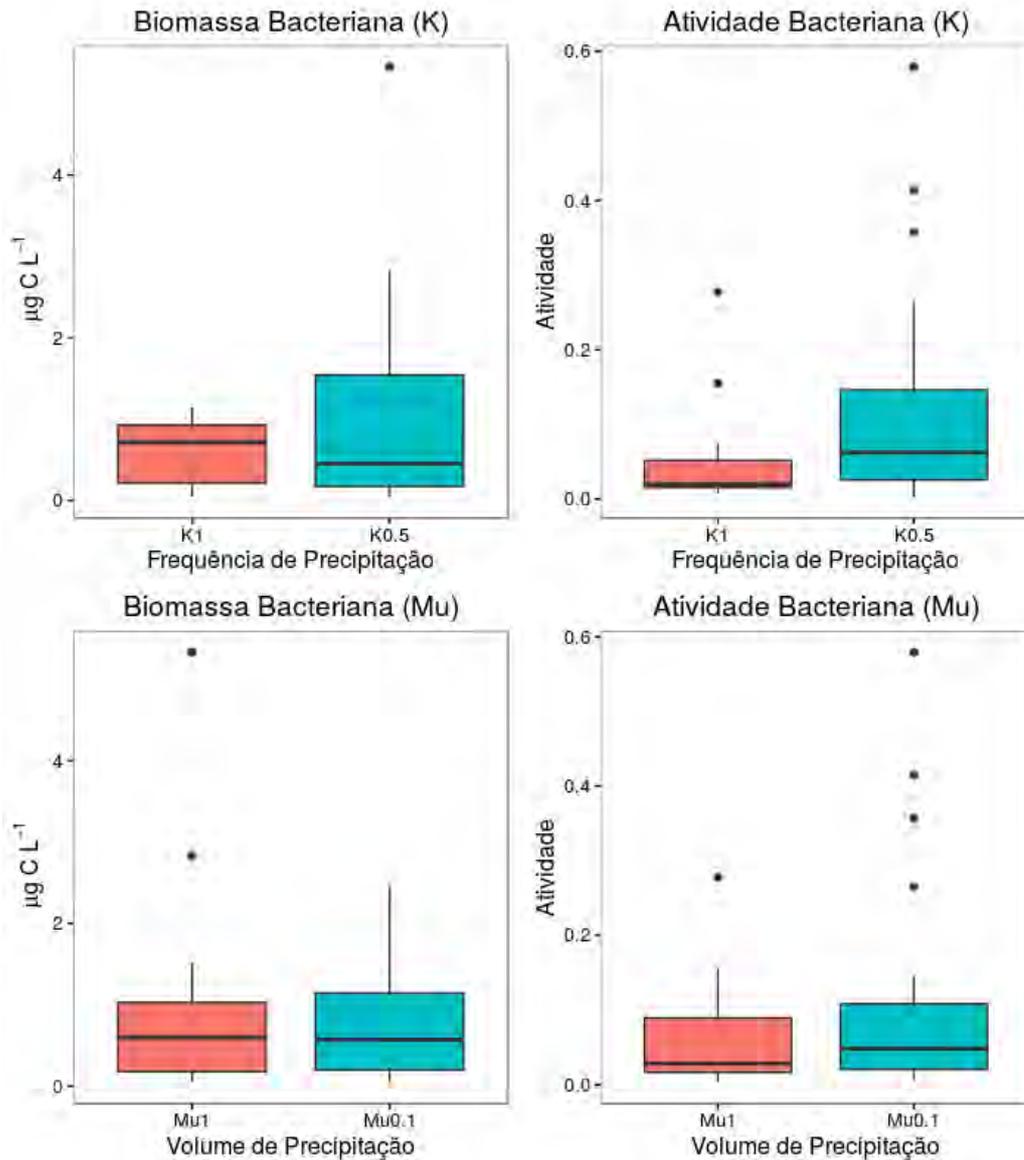
Dessa forma, a variação das condições abióticas relacionadas à temperatura e à profundidade influenciou o metabolismo microbiano em todos os processos avaliados. A redução da coluna d'água resultou, no geral, em aumento dos processos metabólicos microbianos, enquanto que variações na temperatura, embora muitas vezes não tenha apresentado direcionamento aparente (aumento ou diminuição do processo), resultaram em alterações também desses processos.

2.3.2 Biomassa e Atividade Bacteriana

A atividade bacteriana (i.e. a taxa de renovação da comunidade bacteriana baseada na razão PB:Biomassa) variou significativamente com a alteração em μ , em K (Figura 10) e na interação entre μ e K (Ime, Tabela 3). A redução na

frequência e no volume das precipitações resultou em aumento de 617% da atividade bacteriana. Por outro lado, as alterações da intensidade e frequência das precipitações não influenciaram os resultados da biomassa bacteriana (Tabela 3).

Figura 10 – Influência da alteração da intensidade (Mu) e frequência dos eventos de chuva (K) na atividade bacteriana e na biomassa bacteriana

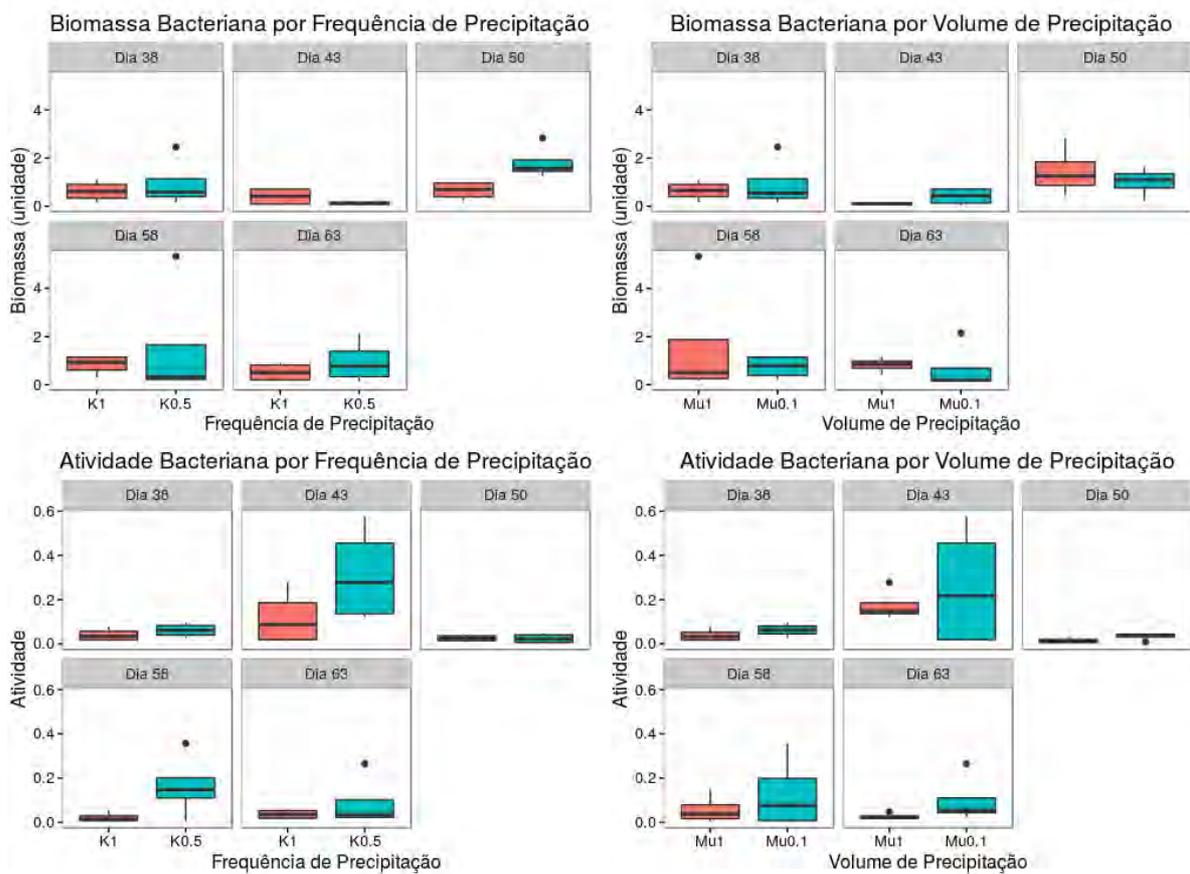


Legenda: A atividade bacteriana foi alterada com a variação na frequência de precipitação e na interação entre frequência e volume de precipitação (ANOVA, $p < 0,05$, ver também Tabela 3). Biomassa não alterou significativamente com a variação dos fatores relacionados à precipitação.

O dia da amostragem bem como o tempo decorrido desde o último evento de precipitação foram significativos para a variação na atividade bacteriana (Ime,

Tabela 3, e ANOVA, $p < 0,05$), porém não para a variação da biomassa bacteriana (Ime, Tabela 3, e ANOVA, $p > 0,05$, Figuras 11). Ainda, o dia da amostragem interagiu significativamente com as alterações nos padrões de chuva (Mu, K e a interação entre Mu e K) regulando a atividade bacteriana. Avaliando a influência do dia de amostragem sobre a atividade bacteriana, foram observados aumentos significativos apenas para o 4º dia de amostragem (Ime, Figura 11), com valor médio de 0,16 em K0.5 (aumento de 617,8% em relação à K1) e de 0,10 em Mu0.1 (aumento de 273,5% em relação à Mu1). Não foi observada qualquer tendência de aumento ou diminuição da atividade bacteriana ao longo do tempo nos tratamentos de manipulação das chuvas (Figura 11).

Figura 11 – Influência do volume e frequência de precipitação por dia de amostragem



Legenda: Variação da biomassa e da atividade bacteriana por dia de amostragem. A análise de variância mostrou influência significativa do dia de amostragem para a atividade bacteriana (ANOVA, $p < 0,05$), bem como a interação do dia de amostragem com a frequência de precipitação (ANOVA, $p < 0,05$). A biomassa não foi influenciada significativamente pelo dia de amostragem.

Tabela 3 - Influência das variáveis manipuladas no experimento sobre a abundância e a atividade bacterianas, segundo as análises de modelos lineares de efeito misto (lme). A atividade bacteriana revelou influência de todas as variáveis e suas interações, com exceção da interação entre volume de precipitação (Mu) e dia de amostragem (DA). Valores destacados indicam resultados significativos ($p < 0,05$).

Variável Resposta	Variáveis	Grau de Liberdade	F	P
Abundância Bacteriana	K	1	2,37	0,14
	Mu	1	0,34	0,57
	DA	4	1,32	0,29
	K X Mu	1	0,19	0,66
	K X DA	4	0,59	0,67
	Mu X DA	4	0,54	0,70
	Mu X K X DA	4	1,94	0,14
Atividade Bacteriana	K	1	15,21	0,01
	Mu	1	6,54	0,02
	DA	4	10,07	0,01
	K X Mu	1	15,51	0,01
	K X DA	4	3,16	0,03
	Mu X DA	4	0,41	0,80
	Mu X K X DA	4	6,49	0,01

A influência do tempo decorrido entre o último evento de precipitação e o dia de amostragem sobre a atividade bacteriana apresentou os maiores resultados nas amostras há 15 dias sem evento de precipitação e maiores variações nos tratamentos onde a precipitação ocorreu um dia antes da amostragem, porém sem diferença significativa (tabela 4). Vale ressaltar que não houve tendência de aumento ou diminuição da atividade ou biomassa bacteriana com ao aumento do tempo decorrido entre o dia da amostragem e o último evento de precipitação.

Tabela 4 - Influência do último evento de precipitação (DSP) sobre a abundância e a atividade bacterianas, segundo as análises de modelos lineares de efeito misto (lme). A atividade bacteriana revelou influência de todas as variáveis de forma

independente e da interação entre o volume de precipitação (Mu) e da frequência de precipitação (K), Valores destacados indicam resultados significativos ($p < 0,05$).

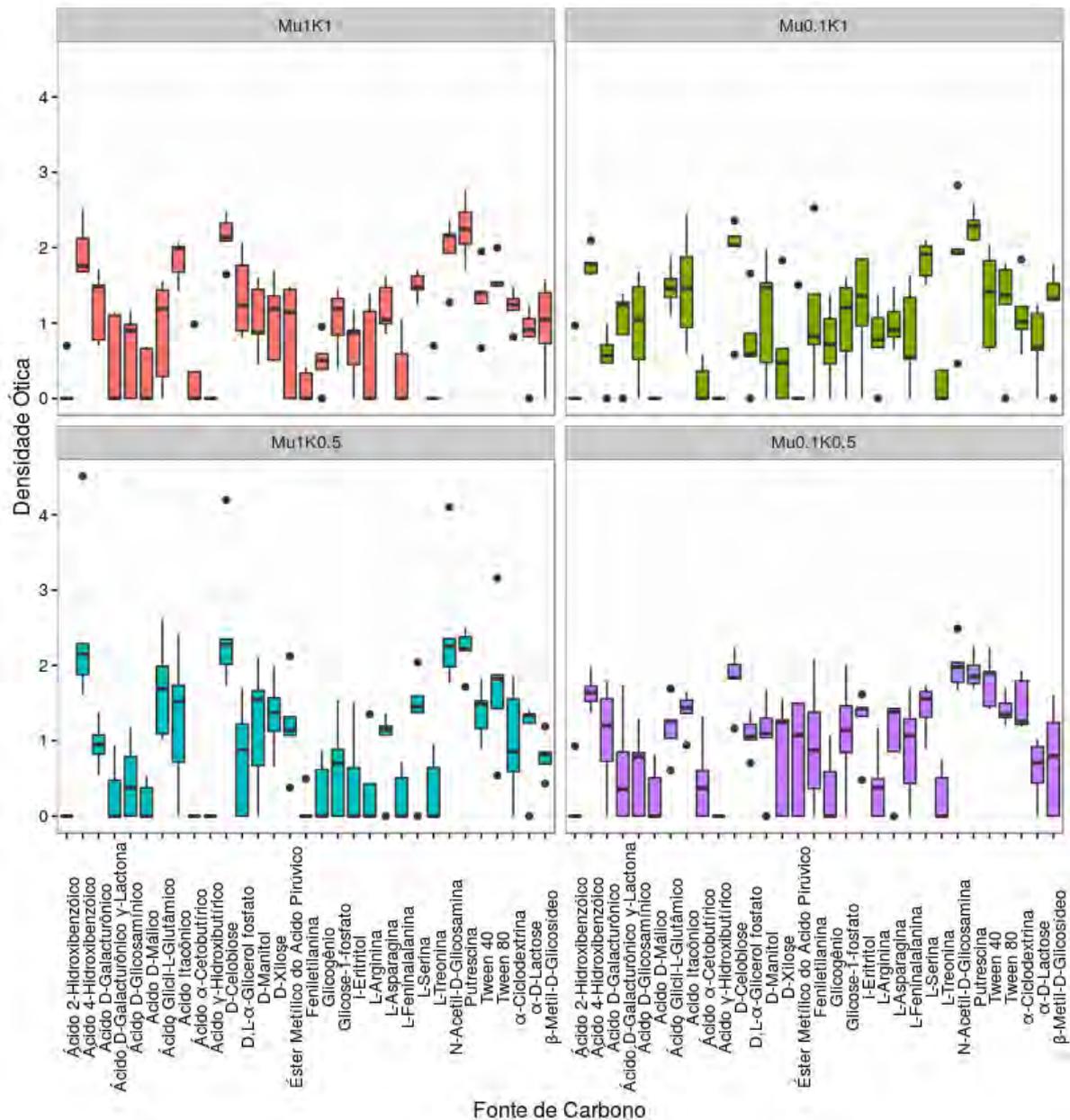
Variável Resposta	Variáveis	Grau de Liberdade	F	P
Abundância Bacteriana	K	1	3.08	0.091
	Mu	1	0.22	0.638
	DSP	7	1.1739	0.3538
	K X Mu	1	0.3352	0.568
	K X DSP	2	3.0891	0.064
	Mu X DSP	2	0.4964	0.614
	Mu X K X DSP	1	2.2086	0.150
Atividade Bacteriana	K	1	6.7028	0.05
	Mu	1	5.3752	0.05
	DSP	4	4.0557	0.01
	K X Mu	1	14.639	0.01
	K X DSP	4	2.1348	0.14
	Mu X DSP	4	2.2672	0.12
	Mu X K X DSP	4	15.0494	0.01

2.4 Perfil Metabólico da Comunidade Microbiana

Inicialmente, serão mostradas as diferenças do perfil metabólico da comunidade bacteriana entre os três cenários onde a chuva foi manipulada (Mu1K0.5, Mu0.1K1, Mu0.1K0.5) e o cenário controle (Mu1K1). Esta análise será feita inicialmente considerando cada substrato separadamente e os agrupando em classes de compostos. Em seguida serão mostradas as diferenças relacionadas à alteração na intensidade das chuvas (Mu1, Mu0.1) e na frequência dos eventos (K1, K0.5), isoladamente, também para cada substrato separadamente e os agrupando em classes de compostos.

Em relação aos tipos de substratos, não foram detectadas diferenças na utilização das 30 diferentes moléculas de carbono entre os cenários de precipitação testados (Figura 12, ANOVA, $p > 0,05$). A análise da degradação das moléculas de carbono, de acordo com o cenário, identificou que as maiores taxas de degradação ocorreram para as moléculas Putrescina (Amida/Amina) no cenário Mu1K1 (controle), Ácido 4-Hidroxibenzoico (Ácido Carboxílico) no cenário Mu1K0.5, e Acetilaminossalólico (Carboidrato) nos cenários Mu0.1K1 e Mu0.1K0.5 (ANOVA, $p < 0,001$, Figura 14).

Figura 12 - Influência do cenário de precipitação na degradação de moléculas de carbono



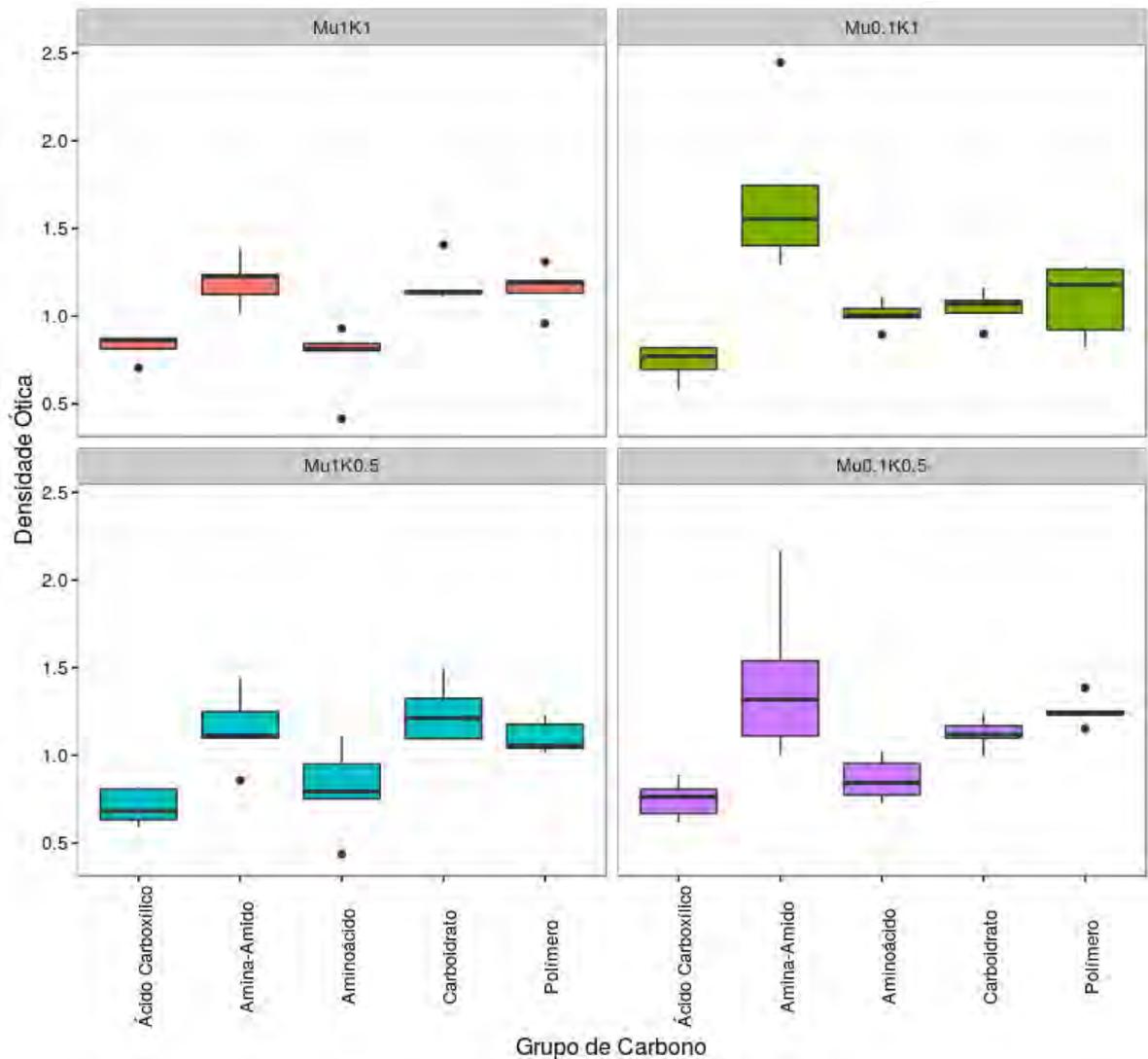
Legenda: Consumo de fontes de carbono pela comunidade bacteriana entre os cenários de precipitação utilizados no experimento. As moléculas foram degradadas de forma diferente pela comunidade bacteriana (ANOVA, $p < 0,001$), porém essa degradação não se alterou entre os cenários.

A análise da degradação das moléculas de carbono, de acordo com o cenário, identificou que as maiores taxas de degradação ocorreram para as moléculas Putrescina (Amida/Amina) no cenário Mu1K1 (controle), Ácido 4-Hidroxi-benzóico

(Ácido Carboxílico) no cenário Mu1K0.5, e Acetilaminossalólico (Carboidrato) nos cenários Mu0.1K1 e Mu0.1K0.5 (ANOVA, $p < 0,001$, Figura 12).

Quando os substratos foram agrupados pelas características das moléculas, observamos que os grupos de fontes de carbono foram degradados de forma distinta pela comunidade microbiana (ANOVA, $p < 0,001$), com maior degradação do grupo amina-amida em todos os cenários e aumento relativo da degradação de carboidratos em relação ao grupo amina-amida no cenário Mu1K0.5 (Figura 13). A degradação dos grupos de compostos não foi significativamente diferente dentro dos cenários, porém a interação entre os cenários e os grupos de compostos foi significativa (ANOVA, $p < 0,05$), indicando que o consumo dos diversos grupos de carbono variou entre os cenários. Além disso, o cenário controle apresentou menor variação no consumo de cada tipo de carbono, com aumento da variação observado nos demais tratamentos de precipitação (Figura 13).

Figura 13 – Influência do cenário de precipitação na degradação de grupos de carbono



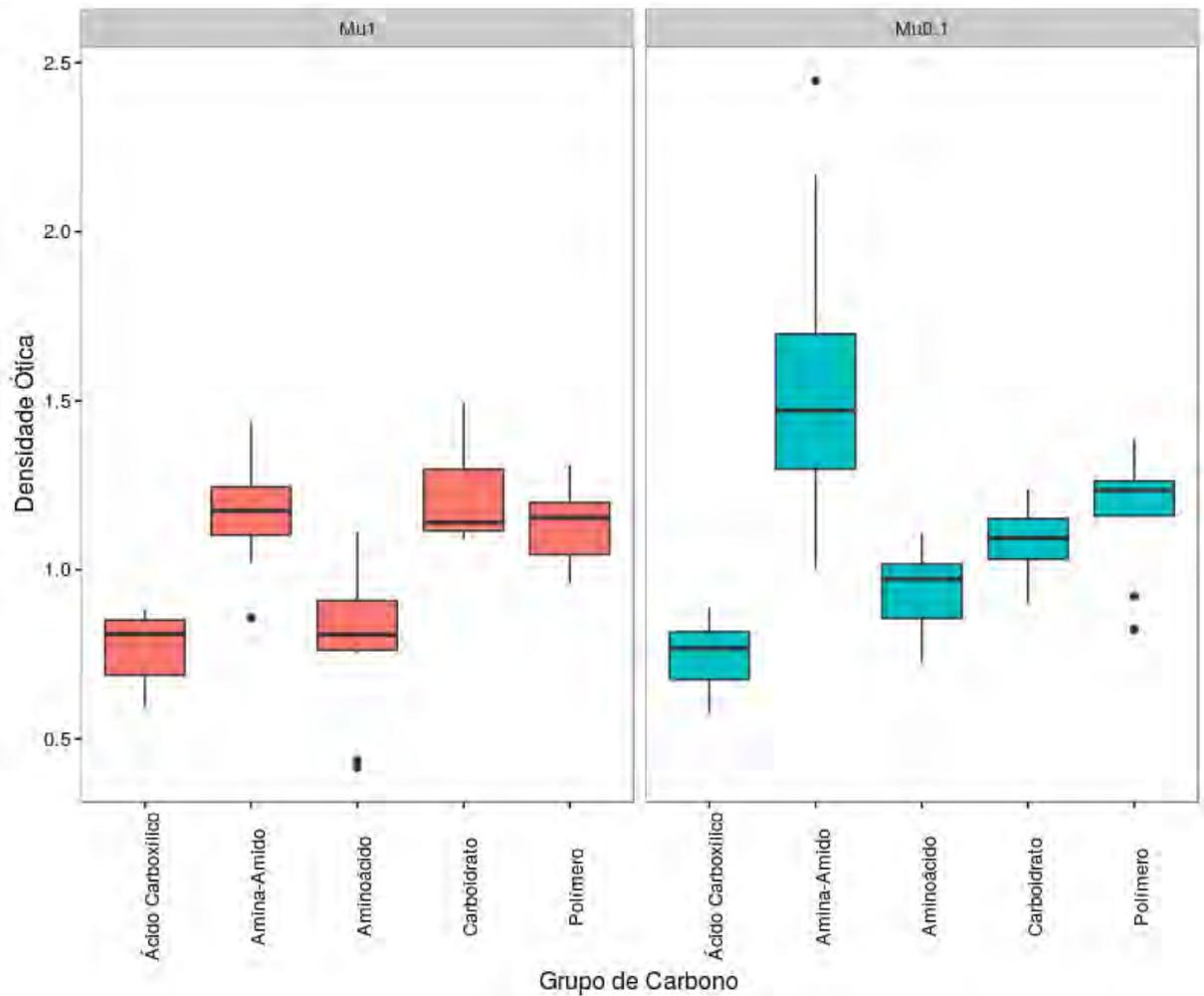
Legenda: Influência do cenário de precipitação sobre a degradação microbiana dos diferentes grupos de compostos carbônicos. A comunidade bacteriana degradou os diferentes grupos de moléculas de carbono de forma distinta (ANOVA, $p < 0,001$) e este consumo foi diferente dependendo do cenário avaliado (ANOVA, $p < 0,05$).

Mu teve efeito significativo sobre a degradação das classes de compostos carbônicos (ANOVA, $p < 0,05$, Tabela 5, Figura 14) e interativo com o tipo de composto ou grupo de compostos considerados (ANOVA, $p < 0,01$, Figura 14). Este último evento interativo observado foi influenciado, possivelmente, pelo maior aumento do consumo de amina-amida com a diminuição de Mu (Figura 14).

Tabela 5 - Efeito da manipulação no consumo dos diferentes tipos de carbono (TC) e grupos de carbono (GC), segundo as análises de modelos lineares de efeito misto (lme). A análise considerou os resultados de degradação (obtidos pela densidade ótica – DO). Valores destacados indicam efeito significativo ($p < 0,05$). O resultado mostra que a comunidade consumiu de forma distinta tanto os tipos de carbono quanto os grupos de carbono. Porém a alteração do volume de precipitação foi significativa apenas quando os grupos de carbono foram testados. A utilização dos tipos e grupos de carbono também variou com a redução do volume de precipitação no experimento.

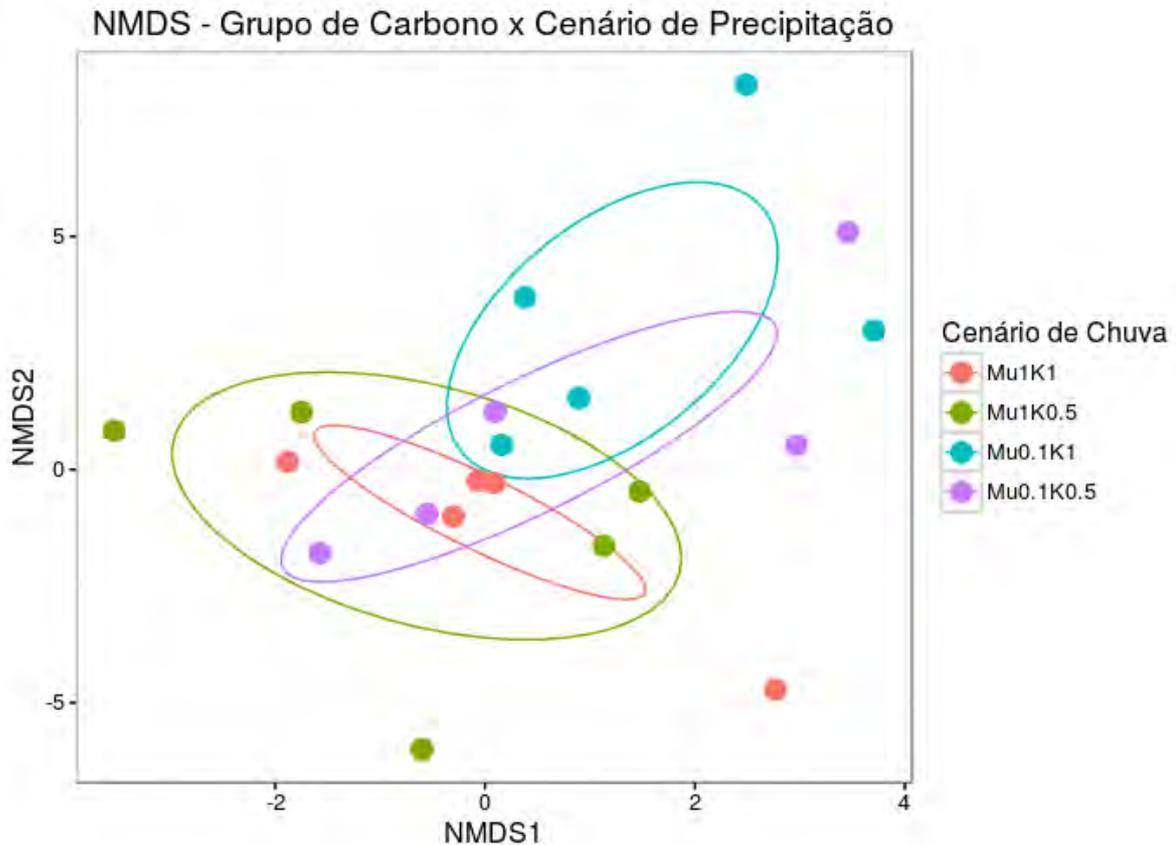
Variável Resposta	Variáveis	Grau de Liberdade	F	P
DO Tipos	Mu	1	0,1344	0,72
	K	1	0,0274	0,87
	TC	30	24,1677	0,01
	Mu X K	1	0,0570	0,81
	Mu X TC	30	1,9751	0,01
	K X TC	30	0,7715	0,80
DO Grupos	Mu	1	4,5909	0,04
	K	1	0,4760	0,50
	GC	4	30,8261	0,01
	Mu X K	1	0,0115	0,91
	Mu X GC	4	4,8371	0,01
	K X GC	4	1,1530	0,34

Figura 14 – Influência do volume de precipitação na degradação de grupos de carbono



Legenda: A avaliação da influência do volume de precipitação (Mu) na degradação de grupos de moléculas de carbono pela comunidade bacteriana revelou que a degradação dos grupos de moléculas de carbono pela comunidade bacteriana foi significativa dentro de cada condição (ANOVA, $p < 0,001$) e entre Mu1 e Mu0.1 (ANOVA, $p < 0,01$).

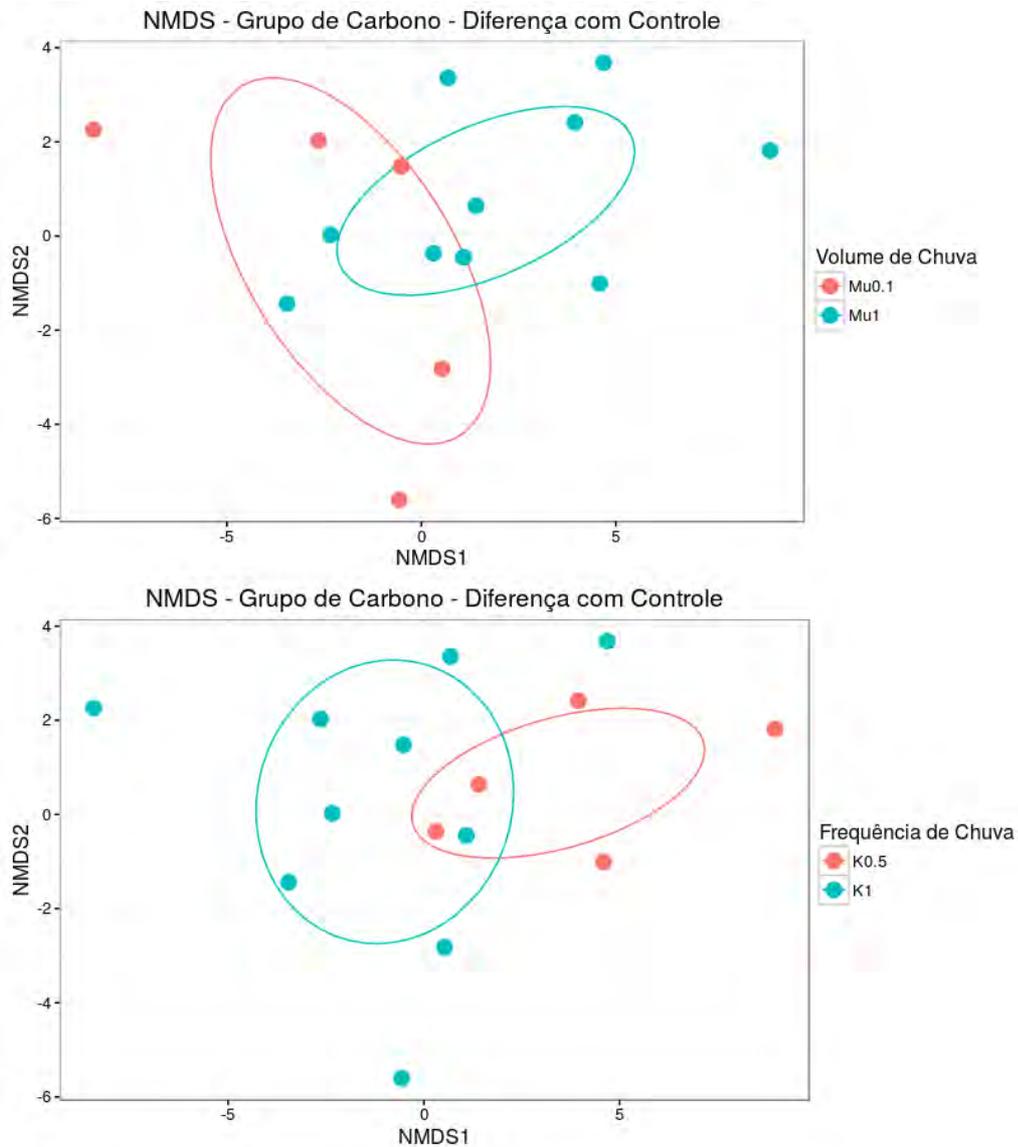
Figura 15 – Degradação dos grupos de moléculas de carbono entre os cenários de precipitação.



Legenda: De acordo com a análise de PERMANOVA, a degradação foi diferente entre os cenários ($p < 0,05$). O tratamento Mu0.1K1 apresentou, aparentemente, a maior diferença da composição em relação aos outros tratamentos tanto no eixo 1, quanto no eixo 2 da NMDS resultando em menor sobreposição com os demais.

As análises de agrupamento (NMDS) não revelaram diferenças significativas na degradação dos tipos de carbono isoladamente, tanto em relação aos cenários de precipitação, quanto em relação aos fatores Mu e K (PERMANOVA $p > 0,05$). Por outro lado, quando estas foram agrupadas houve diferenças entre os cenários de precipitação (PERMANOVA $p < 0,05$, Figura 15), como também entre Mu (PERMANOVA, $p < 0,01$, Figura 16), porém nenhuma diferença foi observada em relação à K (PERMANOVA $p > 0,05$).

Figura 16 – Degradação dos grupos de moléculas de carbono de acordo com o volume (Mu) e frequência (K) de precipitação.



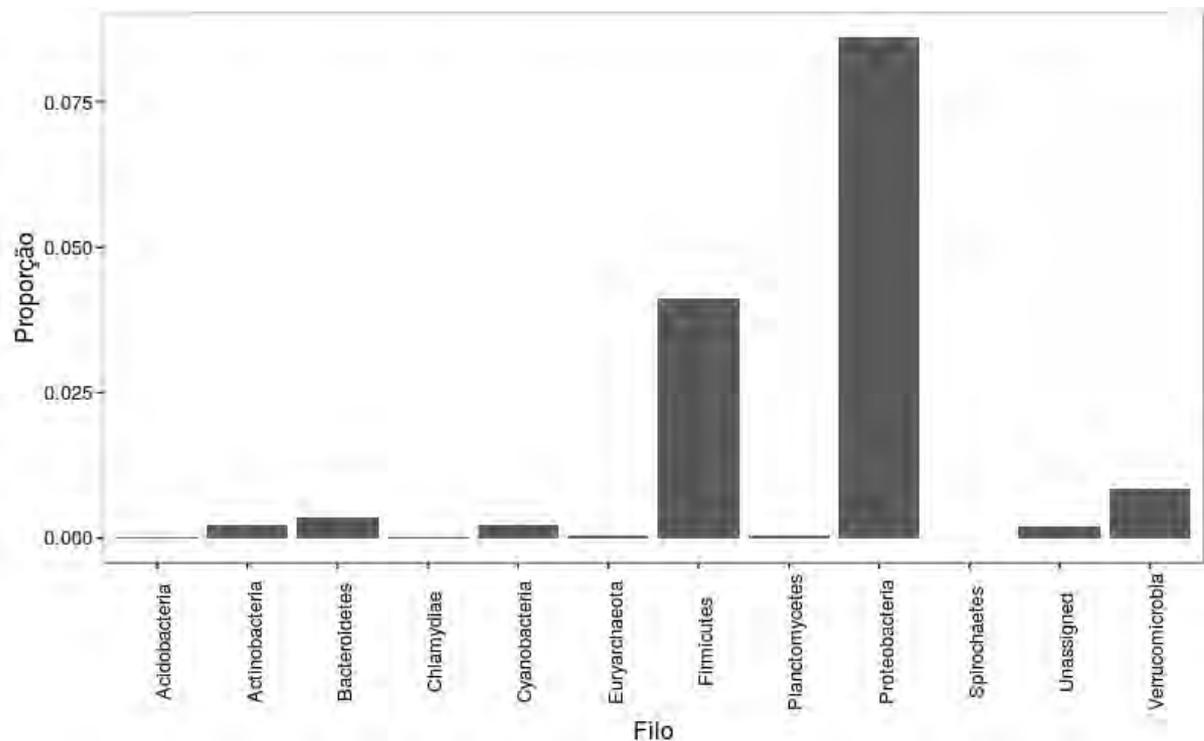
Legenda: A NMDS da composição dos grupos de moléculas de carbono em relação ao volume de precipitações (Mu, painel superior) e frequência de precipitações (K, painel inferior) revelou que a composição foi diferente entre Mu1 e Mu0.1 (PERMANOVA, $p < 0,05$), porém sem diferença entre os níveis de K.

Os resultados do perfil funcional da comunidade microbiana, assim, revelaram alteração na forma de como essa comunidade utilizou as diversas formas de carbono. Particularmente, alterações no Mu tiveram o maior impacto na degradação dos compostos carbônicos pela comunidade bacteriana, principalmente refletidos pela maior degradação de amina-amidas em situações de menor volume de chuvas (Mu0.1).

2.5 Diversidade Genética

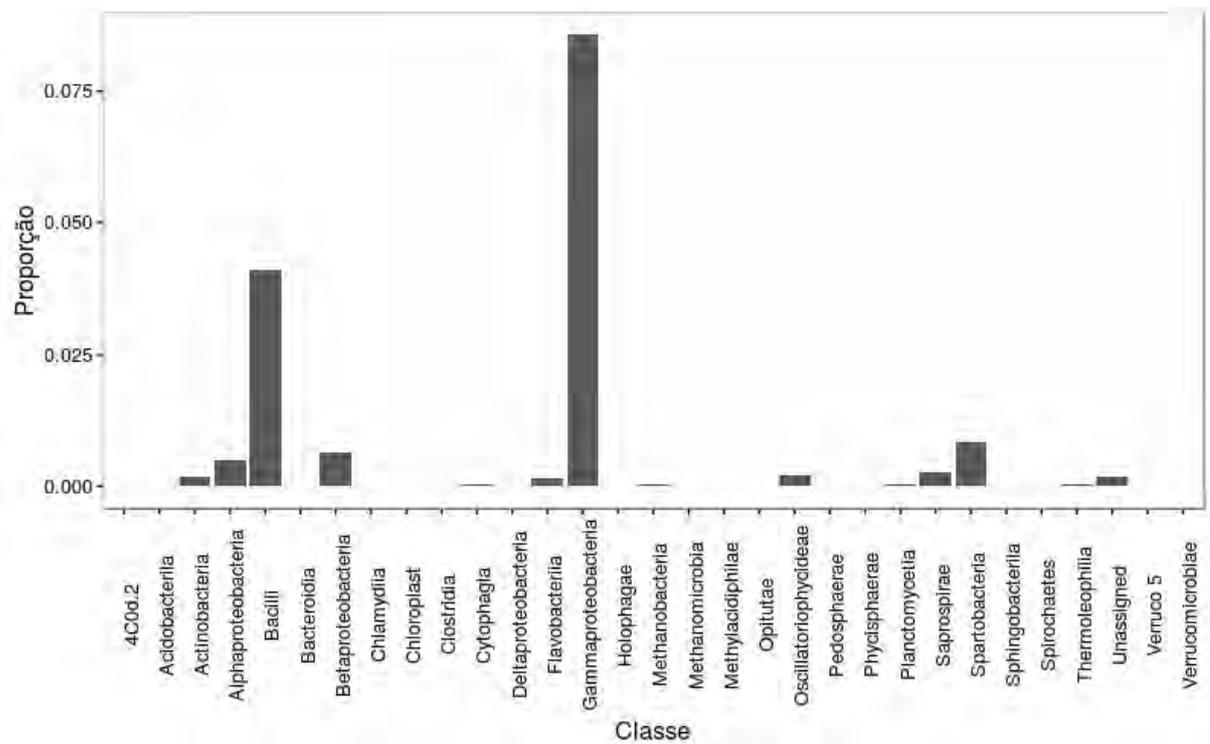
As bromélias utilizadas no experimento geraram 186 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e um total de 207.529 sequências representativas. Bactérias representaram 93,02% das OTUs, enquanto arqueias compuseram 2,2% do total de OTUs. Um total de 4,83% foram definidos como OTU não-classificadas. Dentre bactérias e arqueias, foram identificados 12 filós (Figura 17), onde os mais abundantes foram Proteobactéria (71,6%) e Firmicutes (24,7%), compondo mais de 95% do total de OTUs identificadas. Os resultados mostraram que Gamaproteobactéria (68,2%) e Bacilli (24,7%) foram as classes mais abundantes em todos os cenários do experimento e definiram essa dominância dos filós Proteobactéria e Firmicutes, respectivamente. As classes Verrucomicrobia (1,1%) e Bacteroidetes (0,9%) foram, dentre as classes raras (com menos de 10% do total da comunidade), daquelas que mais se destacaram (Figura 18).

Figura 17 – Proporção de filós microbianos total no experimento



Legenda: Proporção dos filós microbianos no resultado geral do experimento, considerando os dados de todos os cenários. Destaque para os filós Proteobactéria, com 71,60%, e Firmicutes, com 24,67% do total de filós identificados.

Figura 18 – Proporção total das classes no experimento



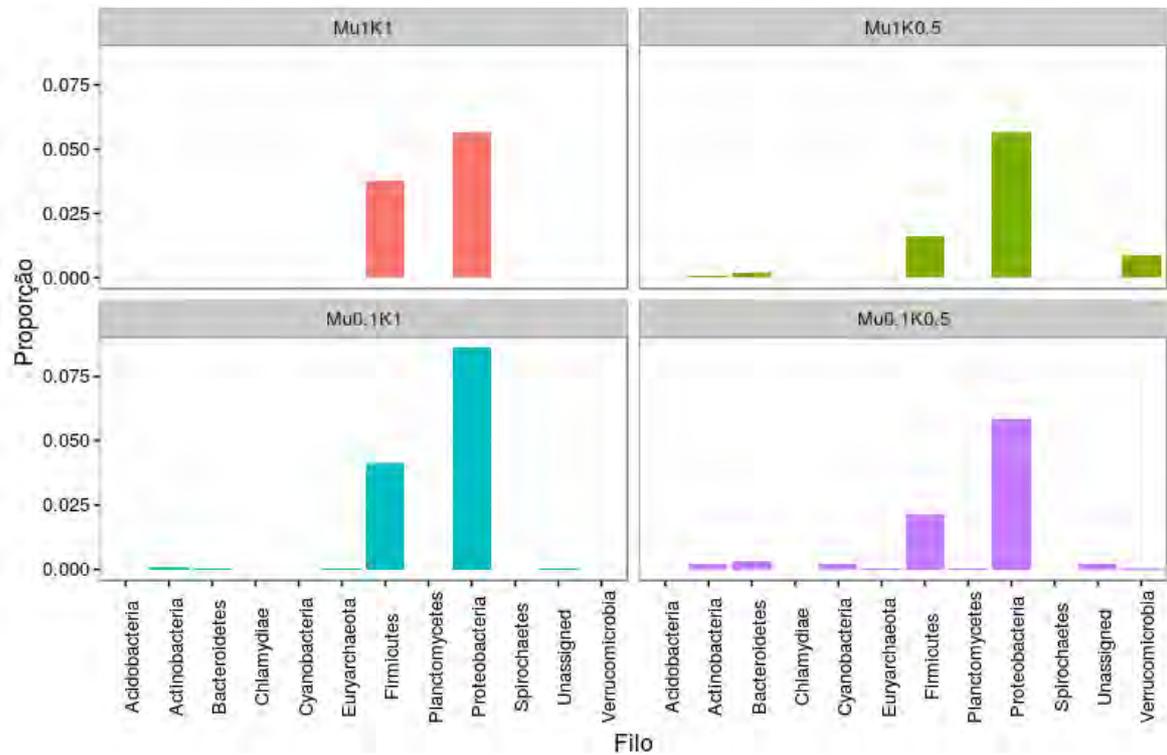
Legenda: Proporção de classes microbianas identificadas nas amostras considerando todos os cenários do experimento. Gammaproteobacteria (68,24%) e Bacilli (24,65%) foram as classes com maior proporção nas amostras.

Bem como para as análises relacionadas ao metabolismo bacteriano e ao perfil de degradação de substratos de carbono, serão mostradas, inicialmente as diferenças da composição da comunidade bacteriana entre três cenários onde a chuva foi manipulada (Mu1K0.5, Mu0.1K1, Mu0.1K0.5) e o cenário controle (Mu1K1). Esta análise será realizada agrupando as OTUs tanto em filós quanto em classes. Em seguida serão mostradas as diferenças relacionadas à alteração na intensidade das chuvas (Mu1, Mu0.1) e na frequência dos eventos (K1, K0.5), isoladamente, também para cada agrupamento (filó ou classe).

O número de sequências recuperadas por filó variou entre os cenários de precipitação (Figura 19). Proteobacteria e Firmicutes mantiveram tendência de maior proporção relativa de OTUs entre os filós em todos os tratamentos (Figura 19), porém a dominância relativa destes filós variou entre os cenários (ANOVA, $p < 0,001$), com maior participação relativa dos demais filós nos cenários Mu1K0.5 e Mu0.1K0.5 (Figura 19). Em relação às classes de microrganismos, Gamaproteobacteria e Bacilli apresentaram as maiores proporções entre todos os

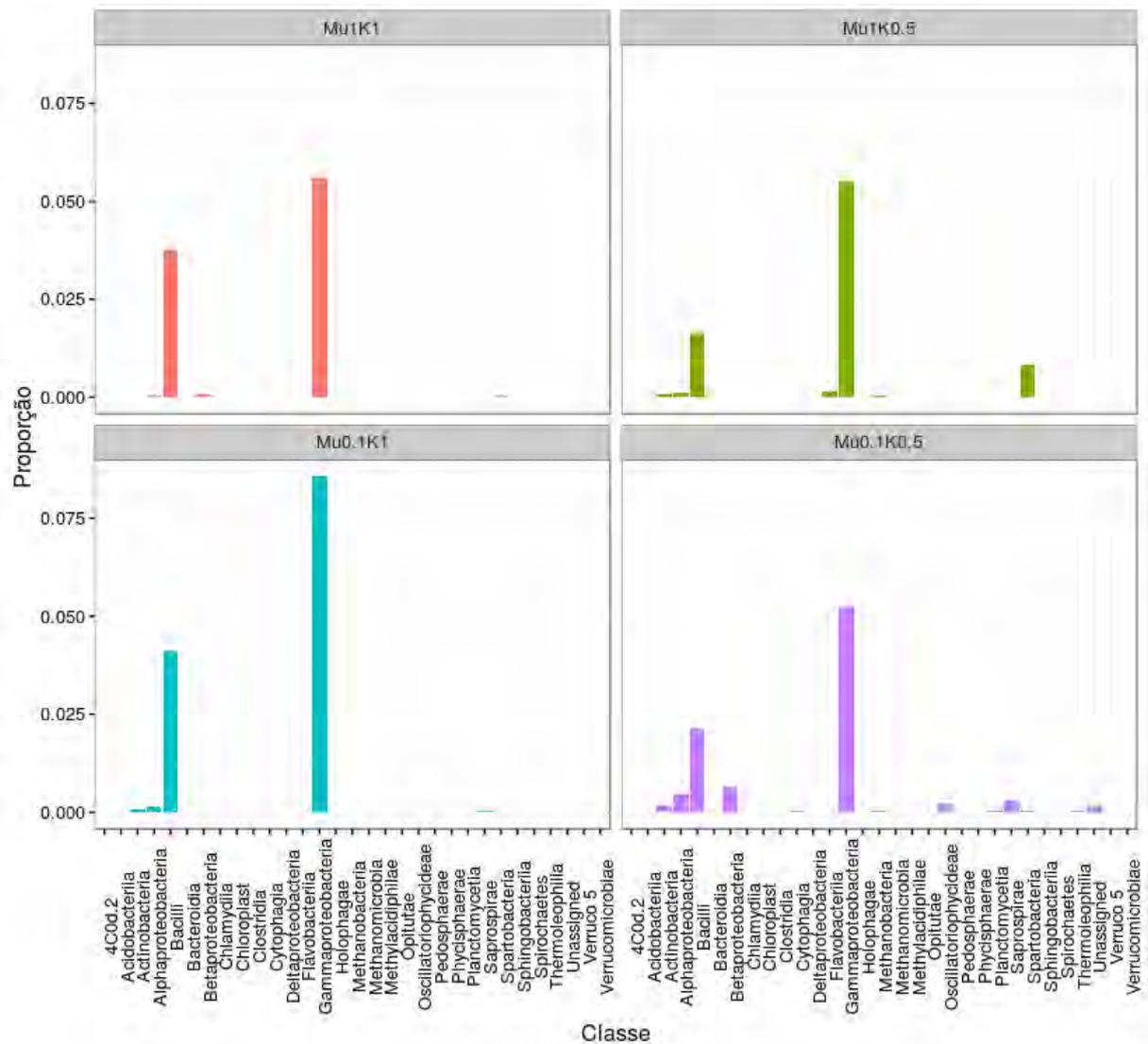
tratamentos (Figura 20), porém outras classes, como Actiniobacteria e Betaproteobacteria, que no cenário controle eram bem representadas, perderam representatividade nos demais cenários (Figura 20).

Figura 19 – Influência da precipitação na proporção de filios microbianos



Legenda: Variação dos filios em relação ao cenário de precipitação. Os filios variaram entre si dentro de cada cenário (ANOVA, $p < 0,01$), porém a análise estatística não detectou influência significativa dos cenários na proporção dos filios. Em todos os cenários os filios Proteobacteria e Firmicutes foram os mais destacados. Notar que Bacilli apresentou tendência de redução nos cenários Mu1K0.5 e Mu0.1K0.5.

Figura 20 – Influência da precipitação na proporção das classes microbianas



Legenda: A variação das classes em relação aos cenários de precipitação não apresentou alteração significativa entre os cenários, porém as classes apresentaram tendência de aumento entre as mais raras no cenário Mu0.1K0.5 com consequente redução da classe Bacilli.

As análises estatísticas da influência dos fatores isolados relacionados ao volume e frequência das precipitações não revelaram influência significativa destas variáveis nos resultados de OTU, filo ou classe microbiana. Em relação aos filós e às classes, as análises estatísticas não mostraram influência significativa com a interação de Mu e K ou mesmo desses fatores isoladamente (Tabela 5).

As classes Metanobactéria, Clostridia, Saprospirae, Pedospaerae, Actinobacteria e Alfabroteobactéria apresentaram aumento em todos os cenários. Estas classes foram avaliadas separadamente com outras classes menos

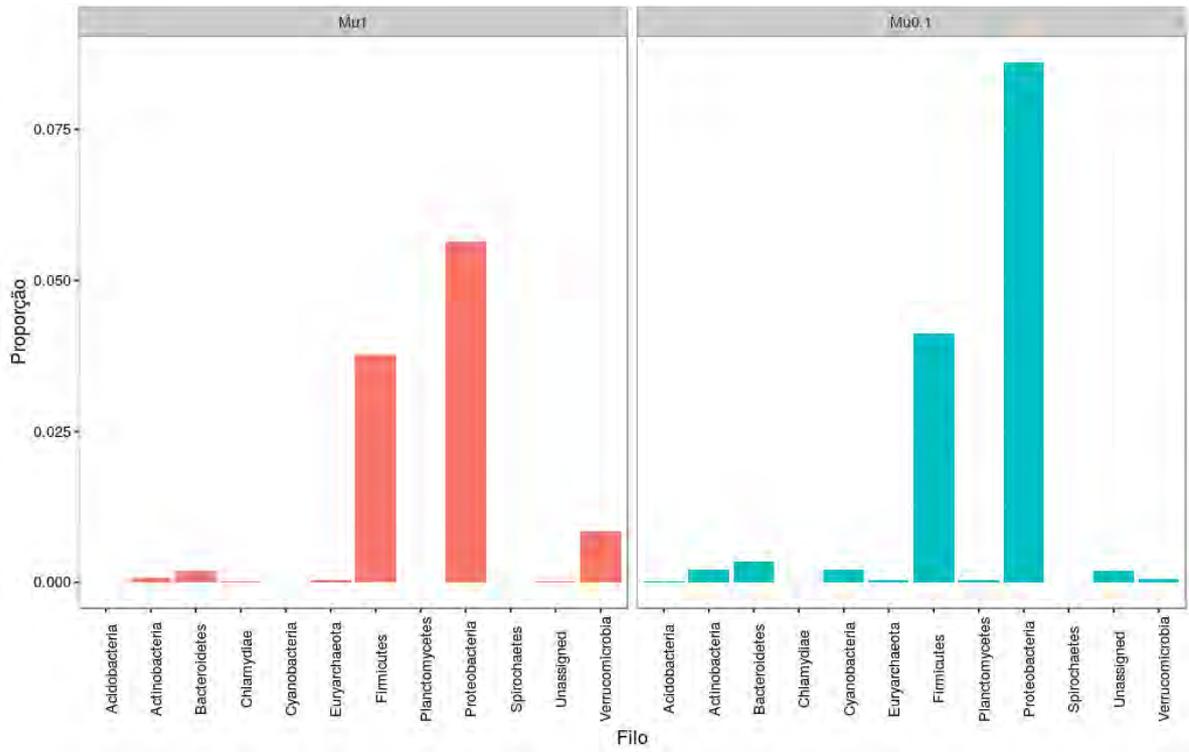
abundantes para facilitar a visualização devido à reduzida proporção. Para estas classes o cenário Mu0.1K0.5 resultou em maior aumento, comparando com a resposta das classes mais abundantes frente aos cenários de redução de precipitações. A classe Oscillatoriothycideae apresentou o maior aumento em relação ao controle (391.300%), seguido pela classe Planctomycea (60,000%) e Sphingobacteria (3.933%).

A avaliação dos fatores Mu e K separadamente, evidenciou aumento dos filos Firmicutes e Proteobacteria no cenário mais extremo de volume de precipitação (Mu0.1; Figura 21) e redução destes dois filos no cenário com menor frequência de precipitação (K0.5; Figura 22). As classes Gammaproteobacteria e Bacilli apresentaram diminuição sensível em relação ao total de sequências lidas em K0.5 (Figura 23). Por outro lado a redução do volume de precipitação levou ao aumento relativo destas duas classes, com maior relevância para a classe Gammaproteobacteria (Figura 24). Apesar das diferenças observadas, alterações em Mu ou K não tiveram efeito significativo sobre a composição da comunidade bacteriana (Tabela 5, ANOVA $p > 0,05$).

Tabela 5 - Efeito da alteração da frequência de precipitação (K) e do volume de precipitação (MU) sobre as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU), Classes e Filos compondo a comunidade microbiana. A análise considerou a proporção de cada variável e indicaram diferença significativa das proporções dentro da comunidade ($p < 0,01$), porém sem qualquer relação com a alteração em Mu ou K.

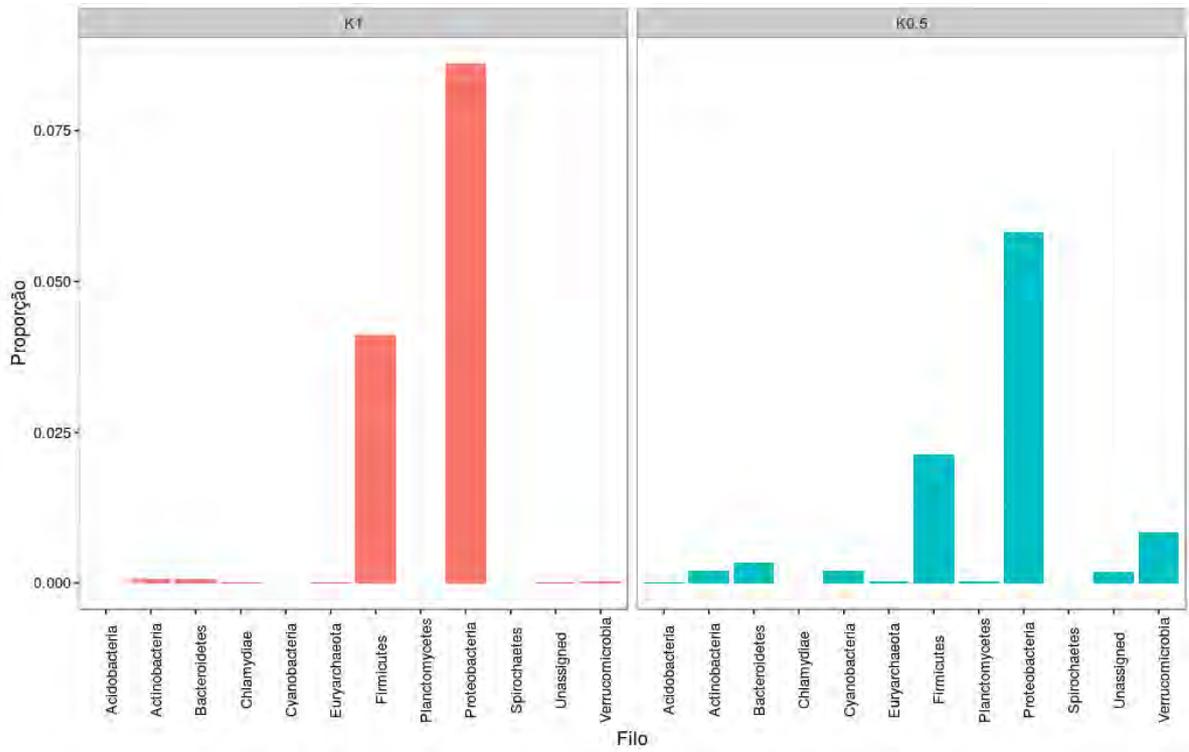
Variável Resposta	Variáveis	Grau de Liberdade	F	P
OTU	K	1	0,1114	0,74
	Mu	1	0,4858	0,49
	OTU	185	27,2799	0,01
	K:Mu	1	0,1878	0,66
	K:OTU	185	0,1882	1,00
	Mu:OTU	185	0,6662	0,10
	K:Mu:OTU	1	0,1973	1,0000
	Classe	K	1	0,14122
Mu		1	0,61570	0,45
Classe		30	68,6656	0,01
K:Mu		1	0,2381	0,63
k:Classe		30	0,5145	0,99
Mu:Classe		30	0,1583	1,0000
K:Mu:Classe		30	0,4580	0,99
Filo		K	1	0,032757
	Mu	1	0,142816	0,71
	Filo	11	11,096837	0,01
	K:Mu	1	0,055221	0,82
	Mu:Filo	11	0,098768	0,10
	Mu:Filo	11	0,050751	1,00
	K:Mu:Filo	11	0,024850	1,00

Figura 21 – Influência do volume de precipitação (Mu) na proporção de filos microbianos



Legenda: Variação dos filos microbianos em relação ao volume precipitação (Mu). As análises estatísticas não identificaram diferença significativa entre as diferentes Mu, porém foi observada tendência de aumento do filo Proteobacteria em Mu0.1.

Figura 22 – Influência da frequência de precipitação (K) na proporção de filos microbianos



Legenda: Variação dos filos microbianos em relação à frequência de precipitação (K). Tanto Firmicutes quanto Proteobacteria apresentaram tendência de redução em K0.5, com aumento relativo dos outros filos, porém sem diferença significativa.

Figura 23 – Influência da frequência de precipitação (K) na proporção de classes microbianas

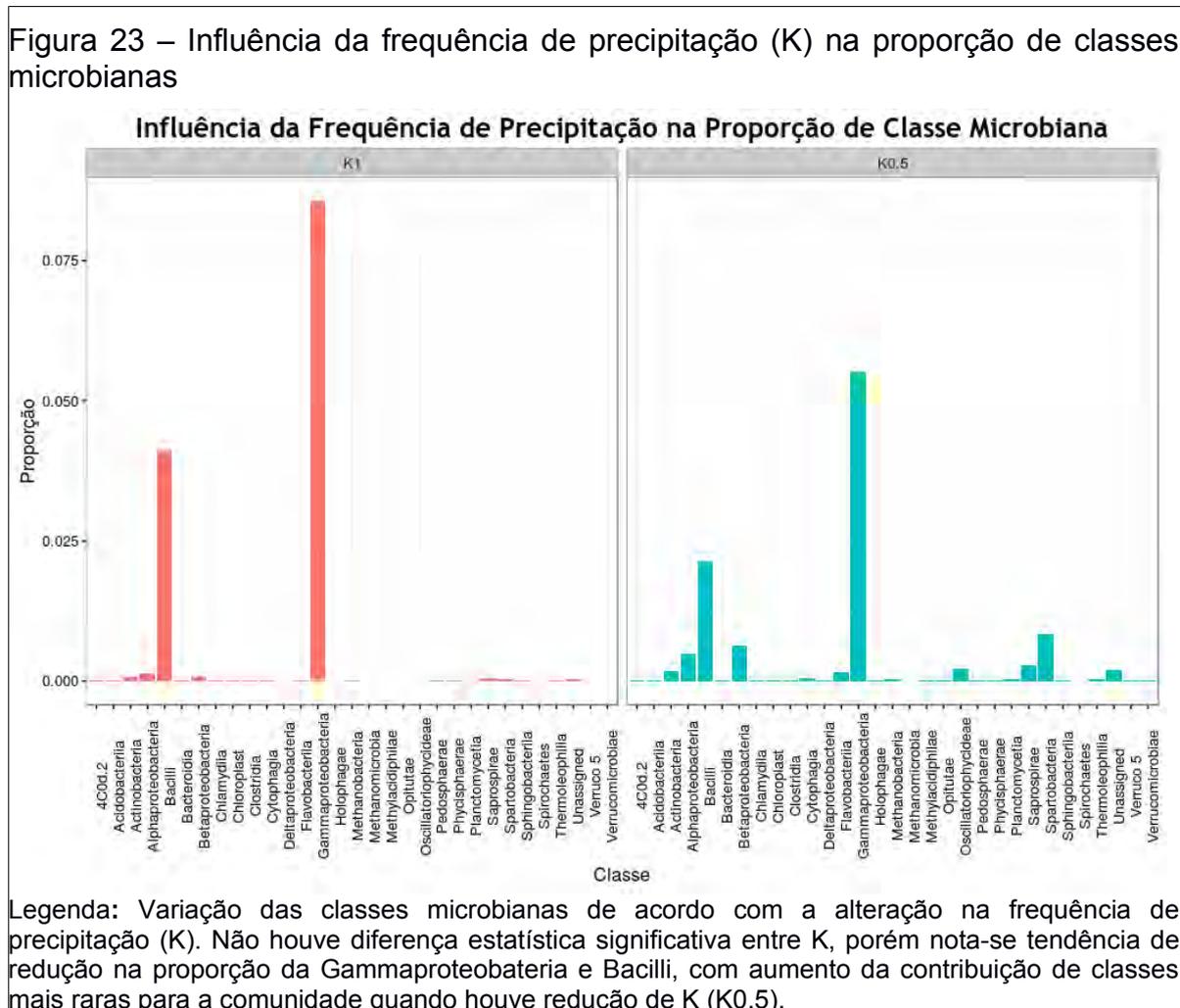
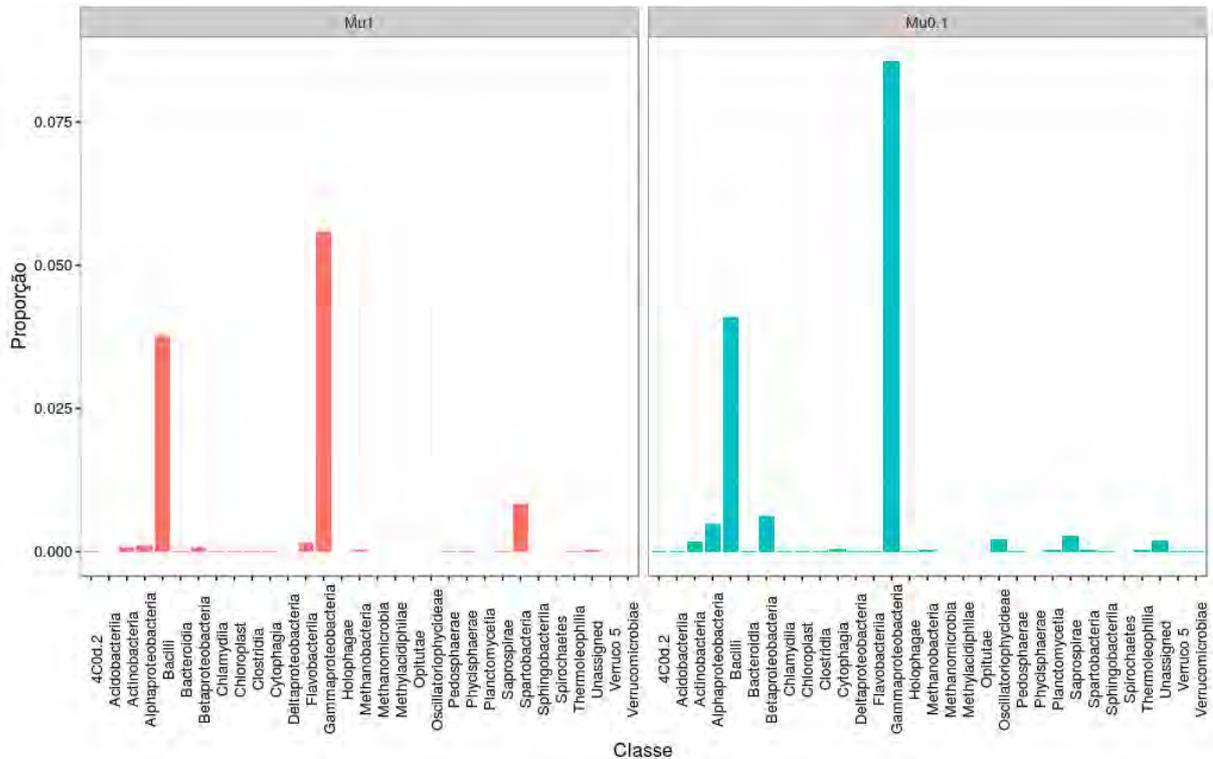


Figura 24 – Influência do volume de precipitação (Mu) na proporção de classes microbianas



Legenda: Variação das classes microbianas em relação ao volume de precipitação (Mu). Embora aumente as classes Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Actinobacteria e Bacilli em Mu0.1, as análises estatísticas não revelaram diferença significativa entre Mu.

2.5.1 Análise de Variância das Classes, Filos e OTU

De acordo com as análises de variância dos modelos lineares de efeito misto não houve influência dos cenários ou dos fatores Mu e K isoladamente sobre OTUs, bem como as classes e os filios microbianos (ANOVA, $p > 0,05$).

Os cenários e os fatores Mu e K também não influenciaram classes microbianas. Os resultados dos modelos lineares de efeito misto mostraram, porém, que a variação ocorreu apenas nas Gammaproteobacteria (lme, $p < 0,001$, Figura 26) e Bacilli (lme, $p < 0,05$).

A diversidade alfa foi maior no cenário Mu0.1K0.5 ($H' = 2,27$) e menores no cenário Mu1K1 ($H' = 1,56$). As análises de variância da diversidade alfa (Shannon H') revelaram influência significativa de K nos resultados de diversidade de OTU (ANOVA, $p < 0,01$) e Classe microbiana (ANOVA, $p < 0,05$). A variação também foi significativa quando os cenários foram analisados considerando ambos os fatores

Mu e K juntos (ANOVA, $p < 0,05$), porém o modelo linear revelou variação significativa dos valores de diversidade apenas o cenário mais extremo (Mu0.1K0.5).

As análises de composição da comunidade microbiana relativa à OTU e Classe não apresentaram diferenças entre os cenários de precipitação (NMDS, PERMANOVA, $p = 0.1$).

3 DISCUSSÃO

Ao testar a influência das alterações nos padrões de volume e frequência de precipitações sobre os processos metabólicos, o papel funcional e a composição da comunidade microbiana, o presente estudo revelou que a comunidade responde de forma distinta em relação à manipulação experimental. As alterações dos padrões de precipitação, principalmente aquelas relacionadas ao volume dos eventos de precipitação, influenciaram parcialmente a dinâmica da comunidade, com alterações na produção bacteriana (PB), na eficiência de conversão do carbono assimilado pela comunidade bacteriana em biomassa (ECB) e na degradação de certas classes de compostos carbônicos, porém sem influenciar diretamente na respiração bacteriana (RB), a demanda de carbono pela comunidade e a composição da mesma (DBC).

Em todos os casos acima reportados a diminuição no volume de chuvas (Mu) ou na frequência dos eventos de precipitação (K) resultou em aumento dos processos analisados. A diminuição do volume das chuvas também causou uma diminuição dos parâmetros hidrológicos dos tanques, notadamente uma diminuição da profundidade média, máxima e mínima dos tanques, além de ter causado aumento na concentração de nutrientes. Estes resultados, em conjunto, indicam que a diminuição das chuvas provoca a concentração de nutrientes em tanques de água cada vez mais rasos, facilitando a aquisição de nutrientes pela comunidade bacteriana, o que, por sua vez, estimula os processos metabólicos relacionados ao anabolismo, com reflexos na degradação e aquisição de certos grupos de compostos de carbono relacionados ao crescimento, como o grupo amina-amida. É interessante notar que estas alterações metabólicas não estiveram relacionadas a alterações na composição da comunidade, o que indica alta plasticidade da comunidade nas funções testadas, isto é, o mesmo grupo de organismos é capaz de degradar diferentes classes de compostos carbônicos.

A seguir serão discutidos cada um dos principais resultados observados separadamente.

Metabolismo e Perfil Metabólico da Comunidade Bacteriana

Foi observado um desacoplamento entre os processos catabólicos e anabólicos bacterianos em função da redução de precipitação, isto é houve um aumento da PB, com efeitos diretos sobre a ECB, apesar de nenhuma alteração na RB. A RB está relacionada ao ganho de energia e manutenção as atividades vitais celulares, enquanto que a PB está relacionada, principalmente, ao crescimento e reprodução celular. É de se esperar, portanto, que as taxas de RB sejam relativamente mais constantes que as taxas de PB, e um desacoplamento entre os dois processos seja observado em sistemas onde as condições ambientais estejam desfavoráveis ao crescimento bacteriano (taxas relativamente maiores de RB em relação à PB, resultando em menores ECB) ou em sistemas onde as condições ambientais estejam muito favoráveis ao crescimento bacteriano (taxas relativamente maiores de PB em relação à RB, resultando em maiores ECB) (BERGGREN, 2010; KEIBLINGER et al., 2010; RUSSELL; COOK, 1995).

A PB em ecossistemas aquáticos é fortemente regulada pela concentração de nutrientes (CHRÓST et al., 2009a; DEMPSEY; MORRIS; PETERS, 2013; FARJALLA et al., 2002). Por exemplo, em ecossistemas aquáticos continentais, o fósforo é o principal nutriente limitante para o crescimento da comunidade microbiana. Em situações específicas, a concentração e a qualidade dos substratos de carbono e até mesmo a disponibilidade de nitrogênio regularam a produção bacteriana (CHRÓST et al., 2009b; FARJALLA et al., 2009; JANSSON et al., 2006). Em um estudo anterior nas bromélias-tanque do PARNA Restinga de Jurubatiba, a concentração de nitrogênio dissolvido foi o principal fator explicador da variação da produção bacteriana nos tanques de água e foi sugerido que os micro-organismos aquáticos e a própria bromélia competem por nutrientes acumulados nos tanques (HAUBRICH et al., 2009).

Em ecossistemas aquáticos rasos ou com grande variação de profundidade, a concentração de nutrientes dissolvidos é regulada por variações na profundidade da coluna d'água (PANOSSO; KUBRUSLY, 2000). Por exemplo, em um lago de planície de inundação Amazônico, as maiores concentrações de nutrientes ao longo de vários anos estiveram relacionadas aos períodos de menores cotas fluviométricas no sistema (PANOSSO; KUBRUSLY, 2000). O mesmo padrão foi observado em lagunas costeiras rasas, onde as maiores concentrações de sais e nutrientes foram observadas nos períodos de menor pluviosidade na região e quando a coluna d'água

destes ecossistemas não passava de alguns poucos centímetros (LAQUE et al., 2010). Bromélias-tanque são mini-ecossistemas aquáticos, comportando, no máximo, alguns litros de água, divididos em vários tanques interconectantes. A chuva é a única fonte de água para o sistema que varia na quantidade de água armazenada em função dos eventos de precipitação e das características físicas do próprio ecossistema. Por exemplo, Marino (no prelo) observaram que características relacionadas ao hidrodinamismo e a manutenção da água no sistema foram mais importantes que a própria entrada de água através da chuva para a estrutura e o funcionamento do ecossistema aquático. Desta maneira, o aumento da PB observado em função da diminuição do volume e frequência dos eventos de precipitação deve estar relacionado à maior concentração de nutrientes limitantes para o crescimento bacteriano em tanques cada vez mais rasos.

Um processo, menos direto, mas possivelmente importante, é a bioturbação da matéria orgânica presente no fundo dos tanques. Além de água, os tanques acumulam grande quantidade de matéria orgânica de origem alóctone, que serve de substrato para o crescimento de micro-organismos (LOUCA et al., 2016). De acordo com Louca e colaboradores (2016), grande parte dos processos metabólicos mediados pelos microrganismos em bromélias-tanque ocorre nesta matéria orgânica acumulada. Com a diminuição da coluna d'água nos tanques, parte desta matéria orgânica pode ser ressuspensa pela atividade dos macroinvertebrados presentes nos tanques, lançando micro-organismos e liberando nutrientes para a coluna d'água. Fenômeno semelhante foi observado em experimentos em microcosmos artificiais simulando lagos rasos, onde os macroinvertebrados causaram, através da bioturbação, um expressivo aumento da PB na coluna d'água (CALIMAN et al., 2007), associado a um aumento da concentração de fósforo (CALIMAN et al., 2007), que é considerado o nutriente limitante para a BP naquele ecossistema (FARJALLA; FARIA; ESTEVES, 2002).

Vale ressaltar que o aumento de PB e da ECB, sem proporcional aumento da RB e da DBC, pode alterar o papel geral desempenhado pela comunidade microbiana nos ecossistemas aquáticos das bromélias-tanque. No geral, a comunidade bacteriana é associada à degradação da matéria orgânica morta acumulada nos ecossistemas, com consequente liberação das formas inorgânicas de carbono, nitrogênio e fósforo, de acordo com o balanço destes elementos do

meio. Um segundo papel, bem menos conhecido, está relacionado à incorporação e conversão do carbono pelas células microbianas em biomassa. Esta biomassa está disponível para níveis tróficos superiores através da predação e constituiria uma via alternativa de energia, conhecida como alça microbiana. A alça microbiana foi apontada como uma via de energia tão importante quanto a via tradicional (cuja base são os produtores primários fitoplanctônicos) em águas oceânicas oligotróficas (COTNER; BIDDANDA, 2002; FENCHEL, 2008; ROLAND; COLE, 1999), porém sua importância em outros ecossistemas ainda não foi totalmente demonstrada (CAMPOS et al. dados não publicados). Em bromélias-tanque localizadas em áreas com maior cobertura de dossel e grande aporte de material alóctone, a produção primária autóctone parece ser insuficiente para sustentar os macroinvertebrados e a decomposição da matéria alóctone acumulada é a principal, embora não a única, fonte de energia para estes organismos (FARJALLA et al., 2016). É neste tipo de ecossistema que a alça microbiana ganha importância como via alternativa de energia e é apontado, neste estudo, que a diminuição do volume e frequência das chuvas potencialize este fenômeno. Em relação ao perfil metabólico da comunidade bacteriana, foi observado um aumento significativo do consumo de compostos do grupo amina-amida nos cenários Mu0.1K1 e Mu0.1K0.5, com maior alteração no cenário mais extremo de redução do volume precipitação. Este resultado está em consonância e corrobora o observado e discutido anteriormente: um aumento da produção bacteriana, relacionada ao aumento da concentração de nutrientes na água e, possivelmente, ao aumento da bioturbação de nutrientes, matéria orgânica e micro-organismos do fundo dos tanques. Este último fator parece ter papel principal na alteração observada no perfil de uso de compostos carbônicos pela comunidade bacteriana.

O agrupamento amina-amida é particularmente abundante em compostos de origem vegetal, como exsudados foliares e radiculares (LEE et al., 2015). Estes compostos tendem a se acumular em ecossistemas aquáticos por serem mais refratários que outros compostos, como ácidos carboxílicos e aminoácidos (MCDONALD et al., 2004). Logo, apesar de não terem sido analisados neste estudo, é esperado que compostos de origem vegetal, ricos em grupamentos amina-amida, abundem na matéria orgânica acumulada no fundo dos tanques. A bioturbação, além de suspender micro-organismos e nutrientes, também pode ter suspenso tais

compostos, liberando esta fonte matéria orgânica com diferente conteúdo energético na coluna d'água, como subsídio para bactérias planctônicas (ANDERSEN; CHAPMAN; ARTZ, 2013; FENNER; FREEMAN; REYNOLDS, 2005). Isso é reforçado pelos altos valores de carbono orgânico dissolvido e nitrogênio total nos tratamentos com redução de volume de precipitação. A presença destes compostos conferiu vantagem competitiva de grupos funcionais capazes de produzir enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação desses compostos (FENNER; FREEMAN, 2011), resultando em alteração do perfil funcional de toda a comunidade (FENNER; FREEMAN; REYNOLDS, 2005). Assim, mudanças nos padrões de precipitação alteraram as condições físico-químicas do ecossistema aquático presente nas bromélias-tanque, que, por sua vez regularam o metabolismo e o papel funcional da comunidade microbiana. Resultado semelhante (alterações nas condições físico-químicas afetando o perfil metabólico da comunidade bacteriana) foi observado anteriormente (COMTE; DEL GIORGIO, 2009), porém com alterações mediadas por mudanças na composição da comunidade microbiana. Neste estudo, porém, as alterações metabólicas observadas não estiveram associadas a alterações na composição da comunidade bacteriana.

Composição da Comunidade Microbiana

As classes Bacilli e Gamaproteobacteria foram as mais abundantes em todos os cenários estudados. Este resultado é, de certa maneira, surpreendente, uma vez que as classes Alfaproteobacteria e Acidobacteria foram as classes mais dominantes em um levantamento da estrutura e função da comunidade bacteriana em bromélias-tanque do PARNA Restinga de Jurubatiba (LOUCA et al., Submetido), e Alfaproteobacteria foi a classe de micro-organismos mais abundante em outro estudo com bromélias-tanque em uma floresta tropical (GOFFREDI et al., 2011). Logo, esses resultados sugerem uma possível vantagem competitiva ou uma estratégia de crescimento rápido em ecossistemas com grande variação do nível de água que levou a predominância destas classes em todos os cenários de precipitação. É importante observar que os gêneros pertencentes às classes Gamaproteobacteria e Bacilli têm capacidade de degradar uma grande variedade de

moléculas de carbono em ecossistemas aquáticos (LV et al., 2014), corroborando os resultados observados do perfil metabólico da comunidade microbiana.

Em um estudo recente, com conjunto semelhante de bromélias-tanque, Louca e colaboradores (2016) observaram uma grande estabilidade do perfil funcional da comunidade bacteriana apesar de uma grande variação da estrutura da comunidade. Esta variação na estrutura foi particularmente forte quando as comunidades microbianas foram avaliadas no nível de família porém alguma variação foi também observada no nível de classe. Por outro lado, as funções desempenhadas pela comunidade, como a metanogênese, a desnitrificação e a degradação da celulose, foram mais ou menos constantes e igualmente abundantes em todas as bromélias avaliadas (LOUCA et al., 2016). A partir destes resultados e baseados em outros estudos (BURKE et al., 2011; LOUCA et al., 2016), os autores reforçaram a hipótese do efeito aleatório na ocupação de nicho pelas OTUs, no qual o filtro promovido pelo ambiente ocorre sobre o perfil funcional da comunidade microbiana e não sobre o perfil taxonômico. Neste caso, o ambiente físico-químico selecionaria o perfil funcional dos organismos potencialmente colonizantes no sistema e colonização do meio propriamente dita ocorreria aleatoriamente por micro-organismos que apresentam determinados atributos funcionais. Portanto, a comunidade microbiana tende a apresentar maior coerência funcional entre os ambientes sob as mesmas condições, variando sensivelmente em relação à ocorrência e proporção de unidades taxonômicas operacionais (LOUCA et al., 2016).

Padrão semelhante ao observado por Louca e colaboradores pode ter sido observado neste estudo. O desacoplamento entre a variação na composição da comunidade microbiana (não relacionada às alterações na pluviosidade) e as alterações no metabolismo e perfil metabólico da comunidade em função da chuva pode ser parcialmente explicada pela alta redundância funcional da comunidade microbiana, associada à colonização aleatória do sistema por grupos de organismos de igual perfil metabólico. Por outro lado, mesmo micro-organismos diferentes possuem grande plasticidade fenotípica e são capazes de realizar diversas funções metabólicas (COMTE; FAUTEUX; DEL GIORGIO, 2013; GRAHAM et al., 2016). Logo, ao considerarmos a comunidade microbiana, tipo e função parecem não estar acoplados, explicando o padrão de resposta diferenciada entre o metabolismo e a

estrutura da comunidade em função das alterações nos padrões de chuva observado.

Explicações alternativas e complementares também podem ser apontadas para o padrão observado. A seleção de atributos funcionais microbianos sob uma condição extrema (ex. períodos de seca) pode resultar em maior tolerância da comunidade a outros fatores estressores tais como temperatura (BÉRARD et al., 2012) ou pH (FENNER; FREEMAN, 2011), levando ao aumento da capacidade da comunidade em degradar diferentes grupos de compostos orgânicos sem influência significativa de sua composição. Além disso, a intensificação das condições ambientais pode estimular a taxa de evolução relativa da comunidade se comparado com outros ambientes mais estáveis (LI et al., 2014). Esse processo sobre a heterogeneidade intrínseca da comunidade microbiana leva a uma evolução em consórcio resultando em um mosaico filogenético com alta convergência funcional (BAPTESTE; BOUCHER, 2008)

A transferência horizontal de genes entre táxons microbianos tende a ser maior sob condições extremas, homogeneizando algumas capacidades funcionais entre táxons diferentes. Por exemplo, em ambiente aquático ácido, foi observada uma intensificação do processo de recombinação de genes entre táxons e consequente diminuição da divergência funcional na comunidade microbiana (LI et al., 2014). O aumento da frequência de eventos de grande magnitude de variação da temperatura ou da disponibilidade de água também podem acelerar esse processo, resultando em incorporação de atributos funcionais por outros grupos que anteriormente não compartilhavam de tais propriedades. Em paralelo a esse processo, o estudo de Li et al. (2014) também identificou aumento compensatório de genes de reparação nos táxons devido à tendência de acúmulo de mutações deletérias decorrentes das altas taxas de mutação.

A alta plasticidade funcional da comunidade, sugerida por essa variação da composição da comunidade dentro do mesmo perfil metabólico, é fundamental quando são avaliados os possíveis impactos das alterações ambientais sobre a diversidade e a ciclagem de nutrientes mediadas pela comunidade microbiana. O estudo observou diferença entre os índices de diversidade taxonômica e funcionais, porém sem diferença entre os cenários de precipitação. Por outro lado essa variação dos padrões de chuva levam a alterações na capacidade de degradação da matéria

orgânica, bem como nas formas de carbono que são degradados pela comunidade. Dessa forma, o estudo reforça a hipótese de que toda a comunidade microbiana apresenta uma redundância funcional em potencial, mas será expressa a partir de um evento que resulte em alteração das condições do meio (COMTE; FAUTEUX; DEL GIORGIO, 2013).

Limitações e Abrangência do Estudo

O estudo aqui apresentado apresenta algumas importantes limitações, sobre as quais discorro a seguir. Primeiramente, apesar de termos avaliado a diversidade taxonômica através do método de sequenciamento do gene 16S do DNAr que avalia a diversidade total da comunidade microbiana, o perfil funcional foi avaliado através da degradação de apenas 30 compostos carbônicos (Biolog Ecoplate™), e não através de técnicas de metagenômica, que seria o método análogo e complementar ao sequenciamento do gene 16S. Logo, uma comparação mais detalhada e precisa entre a proximidade filogenética da comunidade microbiana e suas propriedades funcionais em potencial não foi realizada.

A utilização do método de consumo de tipos isolados de carbono para caracterização do perfil da comunidade microbiana deve ser considerado como um índice do potencial metabólico da comunidade, pois a capacidade da comunidade em degradar diferentes tipos de compostos orgânicos tende a variar entre ambientes, onde a presença de outras formas de carbono pode resultar em um favorecimento artificial de alguns táxons em detrimento de outros (STEFANOWICZ, 2006). Além disto, apenas poucas funções são avaliadas através deste método, sendo que muitas formas de carbono podem ser degradadas pelas mesmas "espécies" bacterianas (DICKERSON; WILLIAMS, 2014; PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002). Por outro lado, esse método identifica o perfil metabólico real da comunidade (a capacidade real e instantânea de degradar aquelas formas de carbono), enquanto o método da metagenômica não avalia se os genes identificados estão, de fato, funcionais quando os táxons em questão se encontram no ambiente. Logo, através do Ecoplate temos um retrato mais realista do perfil funcional da comunidade, apesar de restrito às poucas funções avaliadas.

Finalmente, e em relação ao método de sequenciamento do gene 16S, vale ressaltar que este método cobre apenas arqueias e bactérias, não considerando também a comunidade fúngica que alguns trabalhos apontam ter papel importante na degradação de matéria orgânica de origem vegetal (ANDERSEN; CHAPMAN; ARTZ, 2013). Nesse caso, a atividade da comunidade de fungos pode ter contribuído para o estabelecimento de outros grupos microbianos durante o experimento, sem que fosse considerado no estudo.

Possivelmente, houve alterações da composição e estrutura das comunidades microbianas entre o início e o término do experimento, porém estas não foram avaliadas neste estudo. Estas alterações ocorreram pela sucessão natural da comunidade microbiana e também possivelmente pela própria manipulação da água no sistema que favorece a entrada de matéria orgânica e nutrientes dissolvidos para o sistema influenciando as condições do ambiente. Logo, neste estudo obtivemos apenas um retrato final da manipulação experimental sobre a composição da comunidade bacteriana e qualquer alteração decorrente do tratamento ao longo do experimento nesta comunidade não foi analisada.

É importante considerar a validade do uso das bromélias-tanque como ecossistemas modelo de ecossistemas aquáticos rasos, ou até onde os resultados obtidos nestes estudos podem ser aplicados a outros ecossistemas. O uso de bromélias tanque como sistema modelo ideal para estudos da dinâmica ecossistêmicas de outros ambientes aquáticos, tais como lagos e lagoas, se dá por sua facilidade de manipulação e por fornecer maior poder realístico, já que apresentam estrutura trófica e processos ecossistêmicos relativamente complexos (GONÇALVES-SOUZA et al., 2010; MARINO; SRIVASTAVA; FARJALLA, 2013).

Uma crítica importante ao uso das bromélias-tanque, no entanto, é que estas apresentariam teias tróficas muito simplificadas, com poucos indivíduos de cada espécie, limitando generalizações para sistemas mais complexos e onde a abundância das espécies seria um fator relevante para a interação entre elas. Como o foco deste estudo foi a comunidade microbiana, essa limitação pode ser minimizada. Em uma gota de água ou em um miligrama de sedimento são encontradas densidades microbianas que superam a ordem de milhões de indivíduos, com alta diversidade de morfotipos e OTUs (WHITMAN; COLEMAN;

WIEBE, 1998; ZINGER; GOBET; POMMIER, 2012). Uma segunda crítica importante, e aplicável a este estudo, é que a velocidade de mudança nas condições ambientais dentro do tanque de uma bromélia em função da perda de água por evaporação é maior que nos lagos rasos, devido ao seu pequeno volume. Esta crítica é parcialmente válida, uma vez que, apesar do pequeno volume, os tanques das bromélias são relativamente profundos e bastante protegidos, limitando os processos de evaporação. Por exemplo, foi observado no campo, que bromélias da espécie *Aechmea nudicaulis* mantiveram seus tanques de água cheios por mais tempo que bromélias da espécie *Neoregelia cruenta* após um longo período de estiagem na região, apesar de terem capacidade de estocagem de água menor (MARINO; SRIVASTAVA; FARJALLA, 2013). Tal fato foi relacionado ao formato dos tanques da primeira, que são mais profundos e encaixados que os da segunda planta. Assim, a hipótese que a dinâmica hidrológica nas bromélias é mais rápida que em lagos rasos ainda demanda comprovação. É hipotetizado também que bromélias-tanque apresentam maior influência de matéria orgânica alóctone acumulada no fundo dos tanques (um análogo ao sedimento de um lago raso) sobre a coluna d'água que ecossistemas rasos, e este pode ter sido um fator preponderante na dinâmica da comunidade bacteriana, como discutido acima. Logo, alguns dos resultados obtidos aqui devem ser tomados com cautela ao serem extrapolados para outros ecossistemas, principalmente em relação ao potencial da bioturbação em alterar a dinâmica do sistema bacteriano, com a diminuição da coluna d'água. Por outro lado, a influência da alteração das precipitações e a dinâmica da comunidade no presente estudo se assemelharam aos resultados obtidos em ecossistemas rasos como turfeiras e outras áreas alagáveis (ANDERSEN; CHAPMAN; ARTZ, 2013; FENNER; FREEMAN, 2011), indicando a possibilidade de uma consistência na resposta de ecossistemas rasos às mudanças climáticas, principalmente aquelas focadas em alterações nos padrões de precipitação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Em resumo, o estudo mostrou que reduções no volume e/ou frequência dos eventos de chuva resultaram em mudanças no metabolismo global da comunidade bacteriana (principalmente o aumento da produção bacteriana e da eficiência de crescimento bacteriano), e na magnitude da degradação de certas classes de compostos carbônicos (notadamente os grupamentos amina-amida). Esses resultados indicam que os processos ecossistêmicos regulados pelos micro-organismos podem ser afetados por mudanças no regime de chuva, principalmente em ecossistemas aquáticos rasos, onde a evaporação associada à diminuição das chuvas causa um maior aumento da concentração de nutrientes, que, por sua vez, tende a influenciar majoritariamente os processos anabólicos relacionados ao metabolismo. Os resultados também indicam alta plasticidade fenotípica da comunidade bacteriana, uma vez que alterações no metabolismo e na capacidade de degradação de certos compostos não estiveram relacionadas com alterações na composição da comunidade microbiana.

Ao avaliar as alterações nos padrões de precipitação considerando volume e frequência do evento separadamente, foi observado que a redução no volume das chuvas refletiu mais pronunciadamente em mudanças no metabolismo e no papel funcional da comunidade microbiana que reduções na frequência dos eventos de precipitação. Essa influência apresenta intensidade e magnitude ainda pouco conhecidas, e compreender como ela altera o metabolismo e perfil funcional da comunidade microbiana é fundamental como base para modelos climáticos considerando os ciclos biogeoquímicos e os processos mediados pelos micro-organismos. Assim como estudos mais recentes avaliando o efeito das precipitações em diferentes ecossistemas, fazer a distinção entre o volume e a frequência da precipitação é fundamental para compreender com maior detalhe o impacto dessas alterações.

Finalmente, é necessário maior esforço para compreender a dinâmica da comunidade microbiana considerando uma abordagem mais integrada, avaliando genes candidatos das OTUs e como o aumento no metabolismo de certos compostos orgânicos em detrimento de outros pode afetar o estoque de carbono em um dado sistema. Nesse caso, considerar também a caracterização da matéria

orgânica do ambiente será mais informativo, pois a mudança do perfil metabólico da comunidade pode tanto acelerar a degradação de diferentes grupos de carbono, bem como levar ao acúmulo de outros grupos, alterando o balanço do estoque de carbono dentro do sistema. Essa abordagem pode fornecer um panorama mais robusto de como o impacto da alteração do perfil metabólico pode afetar o balanço de carbono na matéria orgânica.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. Suppl 1, p. 11512–11519, 12 ago. 2008.
- ANDERSEN, R.; CHAPMAN, S. J.; ARTZ, R. R. E. Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 979–994, fev. 2013.
- APPLE, J. K.; SMITH, E. M.; BOYD, T. J. Temperature, salinity, nutrients, and the covariation of bacterial production and chlorophyll-a in estuarine ecosystems. **Journal of Coastal Research**, p. 59–75, 2008.
- AZAM, F. et al. The ecological role of water column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257–263, 1983.
- AZAM, F.; MALFATTI, F. Microbial structuring of marine ecosystems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 782–791, out. 2007.
- BAILEY, L. D.; VAN DE POL, M. Tackling extremes: challenges for ecological and evolutionary research on extreme climatic events. **Journal of Animal Ecology**, v. 85, n. 1, p. 85–96, 1 jan. 2016.
- BAPTESTE, E.; BOUCHER, Y. Lateral gene transfer challenges principles of microbial systematics. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 200–207, maio 2008.
- BÄR, M. et al. Modelling the survival of bacteria in drylands: the advantage of being dormant. **Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society**, v. 269, n. 1494, p. 937–942, 7 maio 2002.
- BELL, T. et al. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1157–1160, 25 ago. 2005.
- BÉRARD, A. et al. Resilience of soil microbial communities impacted by severe drought and high temperature in the context of Mediterranean heat waves. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 6, p. 333–342, nov. 2011.
- BÉRARD, A. et al. Severe drought-induced community tolerance to heat wave. An experimental study on soil microbial processes. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 4, p. 513–518, 24 jan. 2012.

- BERGGREN, M. Nutrient Constraints on Metabolism Affect the Temperature Regulation of Aquatic Bacterial Growth Efficiency. 2010.
- BERGGREN, M.; DEL GIORGIO, P. A. Distinct patterns of microbial metabolism associated to riverine dissolved organic carbon of different source and quality. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 120, n. 6, p. 2015JG002963, 1 jun. 2015.
- BERGGREN, M.; LAPIERRE, J.-F.; DEL GIORGIO, P. A. Magnitude and regulation of bacterioplankton respiratory quotient across freshwater environmental gradients. **The ISME Journal**, v. 6, n. 5, p. 984–993, maio 2012.
- BOUSKILL, N. J. et al. Belowground Response to Drought in a Tropical Forest Soil. I. Changes in Microbial Functional Potential and Metabolism. **Terrestrial Microbiology**, p. 525, 2016.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325–349, 1 fev. 1957.
- BRIAND, E. et al. The use of oxygen microprobes to measure bacterial respiration for determining bacterioplankton growth efficiency. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 2, p. 406–416, 2004.
- BROCK, M. A. et al. Drought and aquatic community resilience: the role of eggs and seeds in sediments of temporary wetlands. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 7, p. 1207–1218, 1 jul. 2003.
- BROECKER, W. S. Climatic Change: Are We on the Brink of a Pronounced Global Warming? **Science**, v. 189, n. 4201, p. 460–463, 8 ago. 1975.
- BUCHAN, A. et al. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 686–698, out. 2014.
- BURKE, C. et al. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 34, p. 14288–14293, 23 ago. 2011.
- BUTTON, M. et al. Community-Level Physiological Profiling of Microbial Communities in Constructed Wetlands: Effects of Sample Preparation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 960–973, 12 nov. 2015.

- CALIMAN, A. et al. Functional bioturbator diversity enhances benthic–pelagic processes and properties in experimental microcosms. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 26, n. 3, p. 450–459, 2007.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, ago. 2012.
- CARUSO, B. S. Temporal and spatial patterns of extreme low flows and effects on stream ecosystems in Otago, New Zealand. **Journal of Hydrology**, v. 257, n. 1–4, p. 115–133, 1 fev. 2002.
- CHADWICK, R.; BOUTLE, I.; MARTIN, G. Spatial Patterns of Precipitation Change in CMIP5: Why the Rich Do Not Get Richer in the Tropics. **Journal of Climate**, v. 26, n. 11, p. 3803–3822, 6 dez. 2012.
- CHRISTIAN, B. W.; LIND, O. T. Key Issues Concerning Biolog Use for Aerobic and Anaerobic Freshwater Bacterial Community-Level Physiological Profiling. **International Review of Hydrobiology**, v. 91, n. 3, p. 257–268, 1 jun. 2006.
- CHRÓST, R. J. et al. Effect of organic phosphorus and nitrogen enrichment of mesotrophic lake water on dynamics and diversity of planktonic microbial communities—DNA and protein case studies (mesocosm experiments). **Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists**, v. 58, n. 2, p. 163–180, 2009a.
- CHRÓST, R. J. et al. Effect of organic phosphorus and nitrogen enrichment of mesotrophic lake water on dynamics and diversity of planktonic microbial communities—DNA and protein case studies (mesocosm experiments). **Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists**, v. 58, n. 2, p. 163–180, 2009b.
- CHROST, R. J.; FAUST, M. A. Consequences of solar radiation on bacterial secondary production and growth rates in subtropical coastal water (Atlantic Coral Reef off Belize, Central America). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 20, n. 1, p. 39–48, 1999.
- CLARK, J. S. et al. Soil microbial community response to drought and precipitation variability in the Chihuahuan Desert. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 248–260, fev. 2009.

- COMTE, J.; DEL GIORGIO, P. A. Links between resources, C metabolism and the major components of bacterioplankton community structure across a range of freshwater ecosystems. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1704–1716, jul. 2009.
- COMTE, J.; FAUTEUX, L.; DEL GIORGIO, P. A. Links between metabolic plasticity and functional redundancy in freshwater bacterioplankton communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 112, 2013.
- COMTE, J.; GIORGIO, P. A. DEL. Composition Influences the Pathway but not the Outcome of the Metabolic Response of Bacterioplankton to Resource Shifts. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25266, 27 set. 2011.
- COTNER, J. B.; BIDDANDA, B. A. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. **Ecosystems**, v. 5, n. 2, p. 105–121, 1 mar. 2002.
- D'AMICO, S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **EMBO reports**, v. 7, n. 4, p. 385–389, abr. 2006.
- DEGENS, B. P. et al. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 9, p. 1143–1153, jul. 2001.
- DEL GIORGIO, P. A.; COLE, J. J. Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 503–541, 1998.
- DEMPSEY, C. M.; MORRIS, D. P.; PETERS, S. C. Assessing changes in microbial respiration, bacterial growth efficiency, and bacterial production with nutrient addition to batch cultures. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 28, n. 3, p. 411–421, set. 2013.
- DICKERSON, T. L.; WILLIAMS, H. N. Functional Diversity of Bacterioplankton in Three North Florida Freshwater Lakes over an Annual Cycle. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 1, p. 34–44, 1 jan. 2014.
- DILLON, M. E. et al. Life in the Frequency Domain: the Biological Impacts of Changes in Climate Variability at Multiple Time Scales. **Integrative and Comparative Biology**, p. icw024, 1 jun. 2016.

- DUCKLOW, H. Bacterial production and biomass in the oceans. In: KIRCHMAN, D. L. (Ed.). . **Microbial ecology of the oceans**. 2nd ed. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2000. v. 1p. 85–120.
- EASTERLING, D. R. et al. Observed Variability and Trends in Extreme Climate Events: A Brief Review. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 81, n. 3, p. 417–425, 1 mar. 2000.
- EVANS, T. G.; HOFMANN, G. E. Defining the limits of physiological plasticity: how gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 367, n. 1596, p. 1733–1745, 19 jun. 2012.
- FARJALLA, V. F. et al. Nutrient limitation of bacterial production in clear water Amazonian ecosystems. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1, p. 197–205, 2002.
- FARJALLA, V. F. et al. Synergy of Fresh and Accumulated Organic Matter to Bacterial Growth. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 657–666, 1 maio 2009.
- FARJALLA, V. F. et al. Terrestrial support of aquatic food webs depends on light inputs: a geographically-replicated test using tank bromeliads. **Ecology**, v. 97, n. 8, p. 2147–2156, 1 ago. 2016.
- FARJALLA, V. F.; FARIA, B. M.; ESTEVES, F. A. The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. **Archiv fur Hydrobiologie**, v. 156, n. 1, p. 97–119, dez. 2002.
- FENCHEL, T. The microbial loop–25 years later. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 366, n. 1–2, p. 99–103, 2008.
- FENNER, N.; FREEMAN, C. Drought-induced carbon loss in peatlands. **Nature Geoscience**, v. 4, n. 12, p. 895–900, dez. 2011.
- FENNER, N.; FREEMAN, C.; REYNOLDS, B. Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1277–1287, jul. 2005.
- FIERER, N.; LENNON, J. T. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 439–448, mar. 2011.
- FLYNN, K. J. Incorporating plankton respiration in models of aquatic ecosystem function. In: DEL GIORGIO, P.; WILLIAMS, P. (Eds.). . **Respiration in Aquatic Ecosystems**. [s.l.] Oxford University Press, 2005. p. 248–266.

- FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**. Second ed. Thousand Oaks CA: Sage, 2011.
- FREY, S. D. et al. The temperature response of soil microbial efficiency and its feedback to climate. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 4, p. 395–398, abr. 2013.
- GARCIA, R. A. et al. Multiple Dimensions of Climate Change and Their Implications for Biodiversity. **Science**, v. 344, n. 6183, p. 1247579, 2 maio 2014.
- GOFFREDI, S. K. et al. Bromeliad Catchments as Habitats for Methanogenesis in Tropical Rainforest Canopies. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh waters**. Oxford [etc.]: Blackwell, 1978.
- GONÇALVES-SOUZA, T. et al. Bromeliads as biodiversity amplifiers and habitat segregation of spider communities in a Neotropical rainforest. **Journal of Arachnology**, v. 38, n. 2, p. 270–279, 1 ago. 2010.
- GRAHAM, E. B. et al. Microbes as Engines of Ecosystem Function: When Does Community Structure Enhance Predictions of Ecosystem Processes? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- GRIFFITHS, B. S. et al. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. **Applied Soil Ecology**, v. 16, n. 1, p. 49–61, jan. 2001.
- GUTSCHICK, V. P.; BASSIRIRAD, H. Extreme events as shaping physiology, ecology, and evolution of plants: toward a unified definition and evaluation of their consequences. **New Phytologist**, v. 160, n. 1, p. 21–42, 1 out. 2003.
- HAUBRICH, C. S. et al. Bottom-up regulation of bacterial growth in tropical phytotelm bromeliads. **Hydrobiologia**, v. 632, n. 1, p. 347–353, jun. 2009.
- HAVENS, K. E.; STEINMAN, A. D. Ecological responses of a large shallow lake (Okeechobee, Florida) to climate change and potential future hydrologic regimes. **Environmental Management**, v. 55, n. 4, p. 763–775, abr. 2015.
- HEGERL, G. C. et al. Climate sensitivity constrained by temperature reconstructions over the past seven centuries. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1029–1032, 20 abr. 2006.
- HOOVER, D. L.; KNAPP, A. K.; SMITH, M. D. Resistance and resilience of a grassland ecosystem to climate extremes. **Ecology**, v. 95, n. 9, p. 2646–2656, 1 set. 2014.

- HUGHES, T. P. et al. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5635, p. 929–933, 15 ago. 2003.
- HUMPHRIES, P.; BALDWIN, D. S. Drought and aquatic ecosystems: an introduction. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 7, p. 1141–1146, 1 jul. 2003.
- IBEKWE, A. M.; KENNEDY, A. . Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 2, p. 151–163, 1 jun. 1998.
- IPCC, C. C. IPCC Fifth Assessment Report (AR5). **Geneva, Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2013.
- JANSSON, M. et al. Bacterioplankton growth and nutrient use efficiencies under variable organic carbon and inorganic phosphorus ratios. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 358–364, ago. 2006.
- JONSSON, A. et al. Whole-lake mineralization of allochthonous and autochthonous organic carbon in a large humic lake (Örträsket, N. Sweden). **Limnology and Oceanography**, v. 46, n. 7, p. 1691–1700, 2001.
- KEIBLINGER, K. M. et al. The effect of resource quantity and resource stoichiometry on microbial carbon-use-efficiency. **FEMS microbiology ecology**, v. 73, n. 3, p. 430–40, set. 2010.
- KINDT, R.; COE, R. **Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies**. Nairobi (Kenya): World Agroforestry Centre (ICRAF), 2005.
- KIRCHMAN, D. L. Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterothrophic bacteria. In: **Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology**. P. F. Kemp; B. F. Sherr; E. B. Sherr & J. J. Cole ed. [s.l.] Lewis Publishers, 1993. p. 509–517.
- KITCHING, R. L. Food webs in phytotelmata: “bottom-up” and “top-down” explanations for community structure. **Annual Review of Entomology**, v. 46, p. 729–760, 2001.
- KNAPP, A. K. et al. Characterizing differences in precipitation regimes of extreme wet and dry years: implications for climate change experiments. **Global Change Biology**, 3 fev. 2015.

- KRITZBERG, E. S.; DUARTE, C. M.; WASSMANN, P. Changes in Arctic marine bacterial carbon metabolism in response to increasing temperature. **Polar Biology**, v. 33, n. 12, p. 1673–1682, 2010.
- LAKE, P. S. Ecological effects of perturbation by drought in flowing waters. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 7, p. 1161–1172, 1 jul. 2003.
- LAKE, P. S. **Drought and Aquatic Ecosystems: Effects and Responses**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.
- LAQUE, T. et al. Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. **Microbial ecology**, v. 59, n. 4, p. 819–829, maio 2010.
- LEE, S.-H. et al. Impact of elevated CO₂ and N addition on bacteria, fungi, and archaea in a marsh ecosystem with various types of plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5295–5305, jun. 2015.
- LENNON, J. T.; JONES, S. E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 119–130, fev. 2011.
- LEVINS, R. The Strategy of Model Building in Population Biology. **American Scientist**, v. 54, n. 4, p. 421–431, 1966.
- LEVINTON, J. et al. Climate Change, Precipitation and Impacts on an Estuarine Refuge from Disease. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18849, 28 abr. 2011.
- LI, H.; XING, P.; WU, Q. L. Characterization of the bacterial community composition in a hypoxic zone induced by Microcystis blooms in Lake Taihu, China. **FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY**, v. 79, n. 3, p. 773–784, mar. 2012.
- LI, S.-J. et al. Microbial communities evolve faster in extreme environments. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6205, 27 ago. 2014.
- LOUCA, S. et al. Functional structure of the bromeliad tank microbiome is strongly shaped by local geochemical conditions. **ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, Submetido.
- LOUCA, S. et al. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, p. 15, 5 dez. 2016.
- LUNAU, M. et al. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 961–968, jul. 2005.

- LV, X. et al. A meta-analysis of the bacterial and archaeal diversity observed in wetland soils. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 437684, 2014.
- MANSILLA, M. C. et al. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 20, p. 6681–6688, 15 out. 2004.
- MARINO, N. A. C.; SRIVASTAVA, D. S.; FARJALLA, V. F. Aquatic macroinvertebrate community composition in tank-bromeliads is determined by bromeliad species and its constrained characteristics. **Insect Conservation and Diversity**, v. 6, n. 3, p. 372–380, 1 maio 2013.
- MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, mar. 2012.
- MCDONALD, S. et al. Analytical chemistry of freshwater humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 527, n. 2, p. 105–124, 6 dez. 2004.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, 3 abr. 2014.
- MEYER, A. F. et al. Molecular and Metabolic Characterization of Cold-Tolerant Alpine Soil Pseudomonas Sensu Stricto. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 483–489, jan. 2004.
- MOSLEY, L. M. et al. Acidification of lake water due to drought. **Journal of Hydrology**, v. 511, p. 484–493, 16 abr. 2014.
- NAVARRO, M. B. et al. Balance between primary and bacterial production in North Patagonian shallow lakes. **Aquatic Ecology**, v. 43, n. 4, p. 867–878, 24 out. 2008.
- NEDWELL, D. B. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 2, p. 101–111, 1999.
- OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package**. [s.l: s.n.].
- PALOMO, L.; MEILE, C.; JOYE, S. B. Drought impacts on biogeochemistry and microbial processes in salt marsh sediments: a flow-through reactor approach. **Biogeochemistry**, v. 112, n. 1–3, p. 389–407, 20 abr. 2012.
- PANOSSO, R.; KUBRUSLY, L. Avaliação espacial e temporal das variáveis limnológicas básicas e nutrientes. In: ESTEVES, F. A.; ROLAND, F. (Eds.). . **Lago batata: impacto e recuperação de um ecossistema amazônico**. UFRJ-SBL ed. [s.l: s.n.]. v. 1p. 57–71.

- PLACELLA, S. A.; BRODIE, E. L.; FIRESTONE, M. K. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 27, p. 10931–10936, 3 jul. 2012.
- POMEROY, L. R.; WIEBE, W. J. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 2, p. 187–204, jan. 2001.
- PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnology and Oceanography**, v. 25, n. 5, p. 943–948, 1 set. 1980.
- PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P. F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. **FEMS microbiology ecology**, v. 42, n. 1, p. 1–14, 1 out. 2002.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, p. 369–394, 2003.
- REAL, R.; VARGAS, J. M. The Probabilistic Basis of Jaccard's Index of Similarity. **Systematic Biology**, v. 45, n. 3, p. 380–385, 1996.
- RENSLOW, R. S.; LINDEMANN, S. R.; SONG, H.-S. A Generalized Spatial Measure for Resilience of Microbial Systems. **Systems Microbiology**, p. 443, 2016.
- ROLAND, F.; COLE, J. J. Regulation of bacterial growth efficiency in a large turbid estuary. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 20, n. 1, p. 30 nov. 1999.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MA: RStudio, Inc., 2015.
- RUSSELL, J. B.; COOK, G. M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 48–62, mar. 1995.
- SARMENTO, H. et al. Warming effects on marine microbial food web processes: how far can we go when it comes to predictions? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1549, p. 2137–2149, 12 jul. 2010.
- SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial Stress-Response Physiology and Its Implications for Ecosystem Function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, 1 jun. 2007.

- SCOFIELD, V. et al. Potential changes in bacterial metabolism associated with increased water temperature and nutrient inputs in tropical humic lagoons. **Aquatic Microbiology**, p. 310, 2015.
- SILVER, C. A.; VAMOSI, S. M.; BAYLEY, S. E. Temporary and permanent wetland macroinvertebrate communities: Phylogenetic structure through time. **Acta Oecologica**, v. 39, p. 1–10, fev. 2012.
- SIMON, M. et al. Resilience of Freshwater Communities of Small Microbial Eukaryotes Undergoing Severe Drought Events. **Aquatic Microbiology**, p. 812, 2016.
- SMITH, M. D. An ecological perspective on extreme climatic events: a synthetic definition and framework to guide future research. **Journal of Ecology**, v. 99, n. 3, p. 656–663, 1 maio 2011.
- SMITH, M. D.; KNAPP, A. K.; COLLINS, S. L. A framework for assessing ecosystem dynamics in response to chronic resource alterations induced by global change. **Ecology**, v. 90, n. 12, p. 3279–3289, 1 dez. 2009.
- SORENSEN, P. O.; GERMINO, M. J.; FERIS, K. P. Microbial community responses to 17 years of altered precipitation are seasonally dependent and coupled to co-varying effects of water content on vegetation and soil C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 64, p. 155–163, set. 2013.
- SRIVASTAVA, D. S. et al. Are natural microcosms useful model systems for ecology? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 7, p. 379–384, jul. 2004.
- STEFANOWICZ, A. The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 669–676, 27 abr. 2006.
- STUBBINS, A.; DITTMAR, T. Low volume quantification of dissolved organic carbon and dissolved nitrogen. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 10, n. 5, p. 347–352, 1 maio 2012.
- TRENBERTH, K. E. Changes in precipitation with climate change. **Climate Research**, v. 47, n. 1–2, p. 123–138, 2011.
- VAN VLIET, M. T. H.; ZWOLSMAN, J. J. G. Impact of summer droughts on the water quality of the Meuse river. **Journal of Hydrology**, v. 353, n. 1–2, p. 1–17, 20 maio 2008.

VREDE, K. Nutrient and temperature limitation of bacterioplankton growth in temperate lakes. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 2, p. 245–256, 2005.

WALTHER, G.-R. et al. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 389–395, 28 mar. 2002.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 63–65, 3 maio 1990.

WEISSE, T. Pelagic Microbes - Protozoa and the Microbial Food Web. In: O'SULLIVAN, P. E.; REYNOLDS, C. S. (Eds.). . **The Lakes Handbook, Volume 1**. [s.l.] Blackwell Science Ltd, 2003. p. 417–460.

WERTZ, S. et al. Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2211–2219, set. 2007.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 9 jun. 1998.

WICKHAM, H.; FRANCOIS, R. **dplyr: A Grammar of Data Manipulation**. [s.l.: s.n.].

WILLIAMSON, C. E. et al. Lakes and streams as sentinels of environmental change in terrestrial and atmospheric processes. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 6, n. 5, p. 247–254, 1 jun. 2008.

WRONA, F. J. et al. Climate change effects on aquatic biota, ecosystem structure and function. **Ambio**, v. 35, n. 7, p. 359–369, nov. 2006.

ZEPPEL, M. J. B.; WILKS, J. V.; LEWIS, J. D. Impacts of extreme precipitation and seasonal changes in precipitation on plants. **Biogeosciences**, v. 11, n. 11, p. 3083–3093, 13 jun. 2014.

ZHAO, C. et al. Soil microbial community composition and respiration along an experimental precipitation gradient in a semiarid steppe. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24317, 14 abr. 2016.

ZINGER, L.; GOBET, A.; POMMIER, T. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. **MOLECULAR ECOLOGY**, v. 21, n. 8, SI, p. 1878–1896, abr. 2012.