UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

AMANDA MENEGANTE NÉRI

**ASSIMILAÇÃO DE NITRATO, AMÔNIO E UREIA PELO FITOPLÂNCTON COM USO DE
TRAÇADOR ^{15}N : EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CULTURAS LABORATORIAIS**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2016

AMANDA MENEGANTE NÉRI

**ASSIMILAÇÃO DE NITRATO, AMÔNIO E UREIA PELO FITOPLÂNCTON COM USO DE
TRAÇADOR ^{15}N : EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS AMBIENTAIS E CULTURAS LABORATORIAIS**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e
Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP)

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Néri, Amanda Menegante

N445a Assimilação de nitrato, amônio e ureia pelo fitoplâncton com uso de traçador ^{15}N : experimentos com amostras ambientais e culturas laboratoriais / Amanda Menegante Néri; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Assimilação de nitrogênio. 2. Fitoplâncton. 3. Isótopo ^{15}N . 4. Reservatórios. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharela **AMANDA MENEGANTE NÉRI**.

Título da dissertação: "Assimilação de nitrato, amônio e ureia pelo fitoplâncton com uso de traçador ^{15}N : experimentos com amostras ambientais e culturas laboratoriais".

Data da defesa: 16/05/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. **Davi Gasparini Fernandes Cunha (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADA

Profa. Dra. **Vanessa Colombo Corbi**
(Centro Universitário de Araraquara/UNIARA)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico aos meus pais, José e Célia, e a minha
irmã, Nathália, pelo imenso amor, cuidado e
apoio oferecidos durante minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

À uma força inexplicável, que me estimulou a acreditar, não me deixando abater sobre o cansaço, os erros e fracassos ocorridos durante o caminho, mantendo minha mente calma e segura de que conseguiria, chamada Deus.

Ao Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha, o qual me orientou com extrema dedicação, mostrando-me os caminhos para a realização desta dissertação, e que, com uma nobreza imensurável em passar seus conhecimentos, me ensinou coisas que levarei para a vida toda, assim como sua amizade.

Às agências financiadoras FAPESP, pelos recursos concedidos para a realização deste projeto, e CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando a realização do mesmo.

Ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento, pelo suporte intelectual de seus professores nas aulas realizadas, e estrutural de seus laboratórios, possibilitando o melhor desenvolvimento da pesquisa.

Ao laboratório LIE/CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura) e ao professor José Albertino Bendassoli, e técnicos, Miguel Luís Baldessin e Hugo Batagello, pela parceria na realização de algumas análises cruciais para a obtenção dos resultados da dissertação.

Ao Dr. Paulo Vagner dos Santos, que dedicou muitas horas de seus dias no laboratório BIOTACE para me ensinar e ajudar em meu projeto, tomando-o como importante para si também. Sem você não teria conseguido realizar metade desta dissertação! Além da grande amizade criada que levarei para sempre!

Ao técnico Waldomiro Antônio Filho e ao motorista Benedito Patracon, pelo apoio e contribuição nas coletas. Vocês foram excelentes companheiros, sempre bem-humorados e compreensivos.

À técnica do laboratório BIOTACE, Adriana Cristina Poli Miwa, pela ajuda na realização de várias análises importantes para a conclusão desta dissertação.

A todos os integrantes do laboratório BIOTACE, que foram grandes companheiros de caminhada, sempre dando apoio, tanto na realização de análises, quando em questões pessoais, Adilson J. Chaves, Adriana C. P. Miwa, Andréia V. S. Ortolan, Carol F. de Andrade, Gabriela A. Marafão, Larissa S. Araújo, Paulo V. dos Santos, Sarah R. Vargas, Wesley A. Saltarelli. Vocês trouxeram mais leveza ao ambiente do laboratório.

Aos melhores amigos e companheiros que poderia ter, Adilson J. Chaves, Carol F. de Andrade, Andréia V. S. Ortolan, Gabriela A. Marafão e Wesley A. Saltarelli. Agradeço imensamente a grande amizade construída! Todos vocês fizeram a diferença nesses dois anos de mestrado, e estarão sempre comigo, independentemente de quais caminhos cada um irá seguir.

Às minhas grandes amigas de graduação, que mesmo não convivendo mais diariamente, mantivemos nossa amizade. Vocês foram fundamentais para alguns momentos de distração e diversão durante os tempos árduos do mestrado, Alline Marchesin, Cristine D. Santiago, Deusilene C. Teodoro, Erica Z. Oliveira, Isadora Petinari, Luana Zambelli, Mariana Dorici, Michelle Ryter, Natália Brandão e Priscila Narcizo.

À minha família, José Luiz Néri, Célia Menegante Néri e Nathália Raquel Menegante Néri, as pessoas mais importantes da minha vida. Sem vocês não seria nada, não teria motivação para alcançar meus objetivos, e não teria a quem dizer: te amo!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível esta
esperando para ser conhecida”

Carl Sagan

RESUMO

Néri, A. M. **Assimilação de nitrato, amônio e ureia pelo fitoplâncton com uso de traçador ^{15}N** : experimentos com amostras ambientais e culturas laboratoriais. 2016. 106f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Os reservatórios, embora importantes para diversas atividades humanas, podem trazer modificações negativas ao ambiente. Tais sistemas aquáticos propiciam condições favoráveis ao maior desenvolvimento da comunidade fitoplanctônica, associado ao aporte de nutrientes e ao fenômeno da eutrofização artificial. O estudo do processo de assimilação de macronutrientes por esta comunidade pode orientar planos para mitigação dos efeitos da eutrofização e contribuir para o entendimento dos fatores limitantes ao fitoplâncton. A presente pesquisa teve como objetivo principal quantificar a assimilação de três formas de nitrogênio pelo fitoplâncton com uso do traçador ^{15}N , de modo a contribuir para o entendimento da influência da temperatura e da disponibilidade de luz sobre esse processo em amostras ambientais e em culturas laboratoriais. Os objetivos específicos visaram: 1) estimar a variação temporal da assimilação de nitrato, amônio e ureia em amostras ambientais do reservatório do Lobo (SP); 2) quantificar e comparar a assimilação das mesmas três formas nitrogenadas por duas espécies fitoplanctônicas isoladas em laboratório (a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e a clorofícea *Scenedesmus* sp.), para verificar a influência da luz e da temperatura sobre o processo de assimilação. Para o primeiro objetivo específico, amostras foram coletadas em quatro períodos do ano no reservatório do Lobo (out/14; jan, abr e jul/15), próximo a São Carlos (SP). Foram reproduzidas, em incubadoras, as condições de Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA) e temperatura observadas em campo e relativas às profundidades em que estavam disponíveis 50% e 10% da RSFA. Em laboratório, os traçadores nitrato ($^{15}\text{NO}_3^-$), amônio ($^{15}\text{NH}_4^+$) e ureia [$(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$] foram adicionados em frascos de 250 mL, incubados por uma hora. Após etapa de filtração, os filtros seguiram para análise elementar de quantificação do nitrogênio particulado e espectrometria de massa para a determinação da composição isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Para o segundo objetivo específico, após a obtenção das culturas isoladas de uma cianobactéria e uma clorofícea, foi realizada a quantificação da assimilação das formas de nitrogênio. Esta análise foi realizada por experimento fatorial, com dois fatores e três níveis (temperatura: 20, 24 e 28°C e luz: 50, 250 e 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os resultados apresentados para as amostras ambientais sugeriram maior preferência da comunidade fitoplanctônica em assimilar amônio em janeiro (23,7 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e julho (54,4 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de 2015. Em abril de 2015, a assimilação foi maior para nitrato (38,5 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e ureia (43,1 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Foi observado, ao longo dos meses de coleta, aumento na assimilação total do nitrogênio, da mesma forma como a densidade total de fitoplâncton, o biovolume e a clorofila-a, sugerindo que a assimilação deve acompanhar o aumento do grau de trofia do reservatório. Os resultados para as culturas laboratoriais indicaram uma assimilação quase que total do amônio pelas duas espécies estudadas. *Scenedesmus* sp. mostrou-se mais adaptada a assimilar amônio (517,1 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em condições de alta intensidade luminosa (450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), enquanto *Microcystis aeruginosa* assimilou melhor o amônio (160,0 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em condições de 50 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para as duas espécies, a temperatura de 20°C resultou em maiores taxas de assimilação. Com base nos resultados obtidos, busca-se oferecer subsídios para o controle do estado trófico e manejo de reservatórios subtropicais por meio da identificação da forma de nitrogênio preferencialmente assimilada pelo fitoplâncton e os respectivos fatores intervenientes.

PALAVRAS-CHAVE: Assimilação de nitrogênio; Fitoplâncton; Isótopo ^{15}N ; Reservatórios.

ABSTRACT

Néri, A. M. **Uptake of nitrate, ammonium and urea by phytoplankton with the use of the ^{15}N isotope: experiments with environmental samples and laboratory cultures.** 2016. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The reservoirs, despite their importance for different human activities, can bring negative changes to the environment. Such aquatic systems hold favorable conditions to the development of the phytoplankton community, which is associated with nutrient inputs and to the artificial eutrophication. The study of macronutrients' uptake by this community can aid in plans for mitigating the effects of eutrophication and contribute to the understanding of the limiting factors to phytoplankton. This research aimed at quantifying the uptake of three forms of nitrogen by the phytoplankton with of use the ^{15}N isotope, in order to contribute to the understanding of the influence of temperature and light availability on this process in environmental samples and in laboratory cultures. The specific objectives were: 1) to estimate the temporal variation of the uptake of nitrate, ammonium and urea in environmental samples from the Lobo Reservoir (SP, Brazil); 2) to quantify and compare the assimilation of the same three nitrogen forms for phytoplankton species isolated in laboratory (the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and the Chlorophyceae *Scenedesmus* sp.), to verify the influence of light and temperature in the uptake process. For the first specific objective, samples were collected in four periods of the year in the Lobo Reservoir (Oct/14; Jan, Apr and Jul/15), close to São Carlos (SP). Under controlled lab conditions, Photosynthetic Active Radiation (PAR) and temperature conditions observed in the field (at depths corresponding to 50% and 10% of the PAR) were reproduced. The tracers nitrate ($^{15}\text{NO}_3^-$), ammonium ($^{15}\text{NH}_4^+$) and urea [$(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$] were added in bottles of 250 mL and incubated for one hour. After filtration, the filters were sent to elemental analysis for quantification of particulate nitrogen and mass spectrophotometry for the determination of isotopic composition ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). For the second of specific objective, after obtaining isolated cultures of the Cyanobacteria and the Chlorophyceae, the quantification of nitrogen uptake was performed. This analysis was carried out by factorial experiment with two factors and three levels (temperature: 20, 24 and 28°C and light: 50, 250 and 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The results obtained for the environmental samples suggested greater preference of the phytoplankton community for ammonium uptake in January (23.7 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and July (54.4 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) from 2015. In April 2015, the uptake rates were greater for nitrate (38.5 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and urea (43.1 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). It was observed temporal increase in total nitrogen uptake, following the patterns for total phytoplankton density, biovolume and chlorophyll-a, suggesting that uptake can be related with the increasing trophic state of the reservoir. The results from the laboratory cultures showed almost total ammonium uptake by both studied species. *Scenedesmus* sp. seemed to be more adapted to uptake ammonium (517.1 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) in conditions of high light intensity (450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), while the respective condition for *Microcystis aeruginosa* uptaking ammonium (160.0 $\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was 50 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. For the two species, the temperature of 20°C resulted in higher uptake rates. We expect our results will aid in trophic state control and management of subtropical reservoirs through the identification of the nitrogen forms preferentially assimilated by phytoplankton and the factors involved.

KEY-WORDS: Nitrogen uptake; Phytoplankton; Isotope ^{15}N ; Reservoirs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fluxos básicos do ciclo do nitrogênio em qualquer ecossistema. Desnitrificação; Fixação do nitrogênio; Nitrificação; “Reamonificação” (redução do nitrato a amônio); Redução assimilatória do nitrato; Mineralização (amonificação); Assimilação. Fonte: modificado de Bowden (1987).26
- Figura 2: Transformações no ciclo do nitrogênio enfatizando a ligação entre processos ocorridos em ambientes aquáticos. Setas sólidas: transformações microbianas; setas pontilhadas: transformação química. Fonte: Modificado de Ward (2012).28
- Figura 3: Imagem de satélite da Represa do Lobo com seus usos e ocupações ao entorno. Fonte: Google Earth.36
- Figura 4: Disposição dos frascos com as amostras ambientais do Reservatório do Lobo, com a adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, nas condições de luz e temperatura encontradas em campo e reproduzidas em incubadoras para incubação por uma hora. ...41
- Figura 5: Esquema do experimento de assimilação, onde foi adicionado em 24 frascos a amostra ambiental do Reservatório do Lobo, e adicionado os traçadores de nitrato, amônio e ureia para incubação em incubadoras que reproduziram as condições de luz e temperatura observadas em campo.42
- Figura 6: Dados de precipitação (mm), temperatura do ar (°C) e velocidade dos ventos (m.s^{-1}) a 0,5 m e 2 m, dos meses de outubro de 2014 até julho de 2015, do Reservatório do Lobo, obtido pela estação do CRHEA da EESC/USP.....47
- Figura 7: Perfil vertical da coluna de água do Reservatório do Lobo, com profundidade máxima de 11,5 m, das variáveis Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA: $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), temperatura da água (°C), pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e porcentagem de saturação do oxigênio dissolvido (%), para as quatro coletas realizadas (outubro/14: 1ª coleta; janeiro/15: 2ª coleta; abril/15: 3ª coleta; julho/15: 4ª coleta).49
- Figura 8: Gráfico da densidade total de fitoplâncton (ind.mL^{-1}) nos meses de out/14, jan, abr e jul/2015, no Reservatório do Lobo, nas profundidades de 50% da RSFA (prof. 1) e 10% da RSFA (prof. 2)......53
- Figura 9: Gráfico da abundância relativa (%) do fitoplâncton nos meses de coleta (out/14; jan, abr, jul/15) no Reservatório do Lobo, com a presença dos grupos Bacillariophyceae, Chlamydomonadophyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Cyanobacteria e Dynophyceae, nas profs. 1 e 2.54
- Figura 10: Biovolume ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$) dos grupos Cyanobacteria, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Chlamydomonadophyceae, Cryptophyceae e Dynophyceae, encontrados no Reservatório do Lobo durante o período de estudo (outubro/2014, janeiro, abril e julho/2015).55
- Figura 11: Assimilação ($\mu\text{g N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) das formas nitrogenadas (nitrato, amônio e ureia) pelo fitoplâncton do Reservatório do Lobo, nas coletas de outubro de 2014, janeiro, abril e julho de 2015, nas profundidades de 50% (prof. 1) e 10% (prof. 2) da RSFA.57
- Figura 12: Assimilação total do nitrogênio nos meses de out/14, jan, abr e jul/15, somando as três formas nitrogenadas (nitrato, amônio e ureia) pelo fitoplâncton do Reservatório do Lobo.58

Figura 13: Esquema de repiques para o aumento das culturas de <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Scenedesmus</i> sp. em meio WC.	70
Figura 14: Quantidade em mL a ser adicionada no meio WC das soluções de nitrato (NaNO_3), amônio (NH_4Cl) e ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) para a realização do experimento fatorial de assimilação das espécies <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.	71
Figura 15: Meio de cultura em período de crescimento em galão com 5 L de meio WC modificado, aerando, com $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz, a 24°C e em fotoperíodo de 12h/12h....	72
Figura 16: Esquema de disposição dos frascos em incubadoras com 20°C , 24°C e 28°C , com três intensidades luminosas (50, 250 e $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e com traçadores de NO_3^- (nitrato), NH_4^+ (amônio) e $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (ureia).	76
Figura 17: Gráficos de clorofila- <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (540 nm) para <i>Scenedesmus</i> sp. durante 21 dias de análise, em meio WC, para a obtenção da curva de crescimento.	78
Figura 18: Assimilação da cultura isolada e axênica <i>Scenedesmus</i> sp. ($\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), em nove condições de luz e temperatura, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, em meio modificado WC. Barra de erros em porcentagem de 5%.	80
Figura 19: Densidade total de <i>Scenedesmus</i> sp. (ind.mL^{-1}) antes (a) e depois (d) da incubação nas nove condições de luz e temperatura, no meio modificado WC, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.	81
Figura 20: Biovolume ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$) de <i>Scenedesmus</i> sp. antes (a) e depois (d) da incubação, em nove condições de luz e temperatura, em meio modificado WC fixado com lugol, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.	83
Figura 22: Gráficos de clorofila- <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (540 nm) para <i>Microcystis aeruginosa</i> durante 23 dias de análise, em meio WC, para a obtenção da curva de crescimento.	85
Figura 22: Assimilação da cultura isolada <i>Microcystis aeruginosa</i> ($\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), em nove condições de luz e temperatura, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, em meio modificado WC. Barra de erros com porcentagem de 5%.	87
Figura 24: Biovolume de <i>Microcystis aeruginosa</i> em nove condições de luz e temperatura em meio modificado WC fixado com lugol antes (a) e depois (d) do tempo de incubação, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados das análises de campo para duas profundidades do Reservatório do Lobo em relação a temperatura (T, °C), pH, Condutividade Elétrica (CE, $\mu\text{S.cm}^{-1}$); Oxigênio Dissolvido (OD, mg.L^{-1} e %), profundidade de desaparecimento do Disco de Secchi (transparência, m) e Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA, $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), durante as coletas de outubro de 2014 e janeiro, abril e julho de 2015	50
Tabela 2: Concentrações da série nitrogenada [Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK; mg.L^{-1}), Nitrato (NO_3^- ; mg.L^{-1}), Amônia (NH_3 ; $\mu\text{g.L}^{-1}$), Ureia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)], Fósforo Total (PT; $\mu\text{g.L}^{-1}$), Sólidos Suspensos Totais (SST; mg.L^{-1}); Relação N/P e Clorofila- <i>a</i> (Chl- <i>a</i> ; $\mu\text{g.L}^{-1}$), durante as coletas de outubro/2014, janeiro, abril e julho/2015, do Reservatório do Lobo.	51
Tabela 3: Teste de correlação de Spearman (ρ) entre as taxas de assimilação de nitrato (Ass. NO_3), amônio (Ass. NH_4) e ureia (Ass. $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) pelo fitoplâncton e as variáveis bióticas e abióticas do Reservatório do Lobo (SP) entre outubro/2014 e julho/2015, incluindo temperatura (T), pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), radiação solar fotossinteticamente ativa (RSFA), NTK (nitrogênio total Kjeldahl), nitrato (NO_3), amônio (NH_4), ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), fósforo total (PT), sólidos suspensos totais (SST), relação nitrogênio total:fósforo total (NT:PT), clorofila- <i>a</i> e densidade fitoplanctônica. As correlações estatisticamente significativas foram marcadas com asterisco ($p < 0,05$)	59
Tabela 4: Condições de RSFA ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura (°C) estabelecidas para a realização do experimento fatorial de assimilação para as espécies isoladas de <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Scenedesmus</i> sp.	75
Tabela 5: Densidade (ind.mL^{-1}) da cultura isolada de <i>Microcystis aeruginosa</i> em nove condições de luz e temperatura em meio modificado WC fixado com lugol antes e depois do tempo de incubação, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia.....	87
Tabela 6: Abundância relativa (%) das espécies encontradas no Reservatório do Lobo durante as coletas de out/14 a jul/15, nas duas profundidades estudadas, de 50% e 10% da RSFA.	111

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS	20
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.2 OBJETIVOS	21
1.2.1 Objetivos específicos	22
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.3.1 Eutrofização artificial e fatores limitantes à produção primária fitoplanctônica.....	22
1.3.2 Ciclo do nitrogênio	25
1.3.3 Assimilação de nitrogênio pelo fitoplâncton	28
1.3.3.1 Nitrato.....	32
1.3.3.2 Amônio.....	33
1.3.3.3 Ureia.....	34
2. CAPÍTULO 2: EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS AMBIENTAIS	36
2.1 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1.1 Área de estudo	36
2.1.2 Obtenção de dados climatológicos e hidrológicos	38
2.1.3 Procedimentos prévios ao experimento.....	38
2.1.4 Análises de campo	39
2.1.5 Experimento da assimilação	40
2.1.6 Análises em laboratório	42
2.1.7 Cálculo da assimilação	45
2.1.8 Organização dos dados e análises estatísticas.....	46
2.2 RESULTADOS	47
2.2.1 Dados climatológicos e hidrológicos	47
2.2.2 Resultados de campo	48
2.2.3 Resultados de laboratório	51
2.2.4 Resultados da assimilação	56

2.2.5	Resultados estatísticos	58
2.3	DISCUSSÃO.....	59
3.	CAPÍTULO 3: EXPERIMENTOS COM CULTURAS LABORATORIAIS	
	68	
3.1	MATERIAL E MÉTODOS	68
3.1.1	Obtenção de culturas isoladas de amostra ambiental	68
3.1.2	Preparo do Meio de Cultivo	69
3.1.3	Análises laboratoriais: clorofila- <i>a</i> , sólidos e absorbância	71
3.1.4	Análise de Densidade e Biovolume	72
3.1.5	Experimento fatorial	74
3.1.6	Quantificação da Assimilação.....	76
3.2	RESULTADOS	77
3.2.1	Resultados da cultura isolada e axênica <i>Scenedesmus</i> sp.....	77
3.2.1.1	Clorofila- <i>a</i> , Sólidos e Absorbância	77
3.2.1.2	Assimilação, Densidade e Biovolume	79
3.2.2	Resultados da cultura isolada <i>Microcystis aeruginosa</i>	84
3.2.2.1	Clorofila- <i>a</i> , Sólidos e Absorbância	84
3.2.2.2	Assimilação, Densidade e Biovolume	86
3.3	DISCUSSÃO.....	90
4.	CONCLUSÕES	94
	RECOMENDAÇÕES.....	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
	APÊNDICE	111
	ANEXOS.....	113

1. CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional nas últimas décadas, vinculado às formas não planejadas de uso e ocupação do solo, gerou uma pressão significativa sobre os recursos hídricos para que a sociedade satisfizesse suas necessidades básicas, como o consumo de água. Os usos múltiplos trouxeram aumento na demanda por água e fizeram com que o seu armazenamento em reservatórios artificiais se tornasse uma alternativa recorrente. A partir da década de 70, o Brasil apresentou uma tendência crescente na utilização de reservatórios, principalmente para a reserva energética (BRANCO; ROCHA, 1977). No entanto, outros usos como o abastecimento de água potável, irrigação, recreação, regularização de vazões dos rios e amortecimento de cheias tornaram-se igualmente importantes.

Apesar do aspecto positivo em armazenar e disponibilizar água para múltiplos fins, a construção de reservatórios pode propiciar diversas alterações no ambiente onde são inseridos. Alterações hidrológicas, geológicas, sobre o microclima, a paisagem e as características físicas e químicas da água, são algumas que podem ser observadas (FILHO, 2006; MOLOZZI, 2011; SOARES et al., 2012). Além disso, os reservatórios podem acarretar modificações econômicas e sociais na região, bem como alterações no rio a jusante. O possível aumento do grau de trofia do sistema aquático, resultante do aporte excessivo de nutrientes e do desenvolvimento acelerado de macrófitas aquáticas, algas e cianobactérias, também tem afetado os reservatórios em diferentes regiões do planeta. A eutrofização artificial é favorecida pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados ou tratados de maneira insuficiente, além do escoamento superficial de áreas agrícolas e urbanas, caracterizando a poluição difusa.

A avaliação da comunidade fitoplanctônica, que é responsável por parcela significativa da produção primária em ecossistemas aquáticos, é fundamental para estudos sobre a eutrofização de cursos de água. Tal comunidade é constituída por grupos taxonômicos de algas e cianobactérias, considerados fotoautotróficos. A comunidade fitoplanctônica pode ser considerada uma bioindicadora, pois responde às alterações do ambiente que sofreu impactos oriundos das atividades antrópicas, apresentando mudanças em sua composição,

estrutura e taxas de crescimento (CARVALHO, 2003). Por meio do estudo desta comunidade, é possível caracterizar o grau de trofia dos sistemas aquáticos, o que é essencial para definir as condições em que o reservatório se encontra e, assim, buscar medidas para sanar ou mitigar os efeitos negativos da eutrofização.

Os organismos fitoplanctônicos, em seus processos metabólicos e do ciclo de vida, são capazes de realizar a assimilação de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, que é regulada por diferentes fatores ambientais (OLIVEIRA, 2010). O processo de assimilação do nitrogênio converte as formas nitrogenadas inorgânicas (e.g., amônio e nitrato) em compostos orgânicos (LAUTENSCHLAGER, 2001) imprescindíveis ao funcionamento celular. Levando-se em conta que ainda existem incertezas sobre o principal nutriente limitante à produção primária fitoplanctônica em sistemas aquáticos tropicais e subtropicais, o entendimento do processo de assimilação de nitrogênio representa um avanço no que diz respeito à busca de medidas de controle do estado trófico desses ambientes. Igualmente, a identificação da forma de nitrogênio preferencialmente assimilada pelo fitoplâncton e os respectivos fatores intervenientes (e.g., radiação solar e temperatura) pode contribuir para o manejo dos reservatórios.

Esse estudo, que faz parte de um projeto maior intitulado “*Fixação biológica e assimilação de nitrogênio pelo fitoplâncton em reservatórios subtropicais com diferentes graus de trofia*” (Auxílio Regular FAPESP – Processo Nº 2014/02088-5), se dedica a aprofundar a compreensão dos fatores relacionados à assimilação de amônio, nitrato e ureia pelo fitoplâncton em águas continentais de regime lântico. Espera-se que a presente pesquisa indique caminhos para solucionar as consequências prejudiciais que a eutrofização traz aos reservatórios e, dessa forma, subsidiar o planejamento e a tomada de decisão para melhoria da qualidade da água, com vistas a garantir uma gestão adequada destes recursos hídricos, compatível com os objetivos desejados e os usos esperados.

1.2 OBJETIVOS

Quantificar a assimilação de diferentes formas de nitrogênio (nitrato, amônio e ureia) pelo fitoplâncton com uso do traçador ^{15}N , de modo a contribuir para o entendimento da influência da temperatura e da disponibilidade de luz sobre esse processo em amostras ambientais provenientes de um reservatório e em culturas laboratoriais.

1.2.1 Objetivos específicos

- Estimar a variação temporal da assimilação de nitrato, amônio e ureia em amostras ambientais do reservatório do Lobo (SP);
- Quantificar e comparar a assimilação das mesmas três formas nitrogenadas por duas espécies fitoplanctônicas isoladas em laboratório (a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e a clorofícea *Scenedesmus* sp.), para verificar a influência da luz e da temperatura sobre o processo;
- Com base nos resultados obtidos para amostras ambientais e culturas laboratoriais, oferecer subsídios para o controle do estado trófico e manejo de reservatórios subtropicais por meio da identificação da forma de nitrogênio preferencialmente assimilada pelo fitoplâncton e os respectivos fatores intervenientes.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Eutrofização artificial e fatores limitantes à produção primária fitoplanctônica

A eutrofização é um fenômeno natural de sucessão que se processa lentamente nos ecossistemas aquáticos por meio do progressivo acúmulo de nutrientes, o que gera um enriquecimento gradual da população fitoplanctônica (RIVERA, 2003). No entanto, como resposta à pressão das atividades humanas, tem ocorrido o processo conhecido como eutrofização artificial ou cultural, com o desenvolvimento acelerado dos produtores primários. Dependendo do incremento do nível de trofia do corpo de água, a eutrofização pode acarretar mudanças significativas na qualidade da água, como alteração da diversidade de espécies, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na água, morte de peixes, aumento da condutividade elétrica, acúmulo de fósforo no sedimento, ocorrência de maus odores,

mudança do pH, possíveis florações de cianobactérias, desenvolvimento excessivo de macrófitas, entre outras (CALIJURI; ALVES; DOS SANTOS, 2006).

Segundo Dodds e Cole (2007), a palavra “trofia” possui um significado de nutrição e, em termos ecológicos, pode ser considerada como a base da cadeia alimentar, ou seja, a produção primária autóctone de alimentos. Para que esse processo nutricional ocorra, são necessários alguns recursos, como a entrada de nutrientes ao meio aquático. Assim, o conhecimento do grau de trofia ou estado trófico dos ambientes aquáticos apresenta importância tanto no entendimento das cadeias alimentares, como na avaliação das características biogeoquímicas e de qualidade da água.

Muitos estudos (CUNHA; CALIJURI; LAMPARELLI, 2013; DODDS; COLE, 2007; LAMPARELLI, 2004; RIVERA, 2003; FIA et al., 2009) têm se dedicado à avaliação do grau de trofia de diferentes corpos hídricos por meio da observação e análise de fatores como a produção primária, o grau de transparência da água e a concentração de nutrientes. Para definir o estado trófico que um reservatório apresenta, alguns índices (IET – Índice de Estado Trófico) foram desenvolvidos, sendo o de Carlson (1977) o mais usado com modificação de Toledo Jr. et al. (1983), aplicável a águas de regiões tropicais (FIA et al., 2009). Mais recentemente, Lamparelli (2004) e Cunha, Calijuri e Lamparelli (2013) propuseram atualizações e aprimoramentos ao IET.

Lamparelli (2004) destacou a preocupação com a eutrofização artificial surgida nos anos 1990 nos Estados Unidos e em diversos países da Europa. Estudos mostravam, à época, que cerca de metade dos rios, lagos e estuários norte-americanos apresentavam os sintomas negativos causados pela eutrofização. Na Europa, um relatório de avaliação de nutrientes desenvolvido pela Comunidade Europeia em 1999 considerou este processo como um dos maiores problemas ambientais do continente. Nesse período, também surgiu um volume significativo de estudos sobre fitoplâncton nos corpos hídricos brasileiros, que comprovaram o predomínio de cianobactérias em corpos de água por todo território nacional, algumas delas potencialmente tóxicas (AZEVEDO et al., 1994; BOUVY et al., 2000; COSTA; CHELLAPPA; ARAÚJO, 1998; GIANI; FIGUEREDO; ETEROVICK, 1999; MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999; NOGUEIRA et al., 1998).

Assim como reforçado por Matsuzaki, Mucci e Rocha (2004), há diversos fatores limitantes à produção primária, tais como luz, temperatura, circulação horizontal e vertical da coluna de água, disponibilidade de nutrientes, competição entre diferentes espécies, além de suas características fisiológicas. Os nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, são provenientes de fontes como despejo de esgoto doméstico, atividades agrícolas e industriais,

além das fontes atmosféricas (e.g., deposição seca ou úmida, fixação atmosférica de nitrogênio). Estudo realizado por Elser et al. (2007) sugeriu que o nitrogênio e o fósforo são fatores limitantes equivalentes para a produção primária em lagos e córregos, e o fósforo é o principal nutriente limitante nos oceanos. No entanto, não há um consenso sobre qual destes nutrientes é mais limitante à produção primária em cada ambiente, ou se a combinação de ambos, a co-limitação, seria mais frequente. Esta falta de consenso é apresentada no trabalho de Huszar et al. (2006), em que modelos empíricos foram propostos para comparar a relação entre fósforo e nitrogênio total com clorofila-*a* em ambientes aquáticos tropicais, subtropicais e temperados. Os autores observaram que houve significativa variação tanto nas concentrações anuais de fósforo e nitrogênio total, como na biomassa fitoplanctônica, e que o acoplamento entre a disponibilidade de nutrientes e a clorofila-*a* nem sempre ocorreu nos sistemas avaliados.

Outro importante fator que regula a produção primária é a incidência da radiação solar e a disponibilidade de radiação subaquática, citadas por diversos autores, como Henry (1998), Matsuzaki, Mucci e Rocha (2004), Mesquita (2009) e Passerini (2010). A luz, de cuja disponibilidade depende a fotossíntese, torna-se um fator limitante quando a presença de matéria orgânica ou sólidos em suspensão, que modificam a cor e a turbidez da água, pode diminuir a penetrabilidade de radiação que incide no sistema aquático.

O aumento da temperatura, em geral, estimula o metabolismo fitoplanctônico, acelera suas taxas de crescimento e, conseqüentemente, a produção primária. A circulação da coluna de água, sua estratificação térmica ou mistura completa dependem da ação dos ventos, das rotinas de operação do reservatório (e.g., vazões turbinadas e vertidas) ou de outras perturbações a que o sistema seja submetido. Tal movimentação, seja na dimensão horizontal ou vertical, pode ressuspender as partículas sedimentadas, aumentar a turbidez e diminuir a transparência da água.

A análise do grau de trofia de rios, lagos e reservatórios deve ser associada à avaliação de quais espécies de fitoplâncton são predominantes, quais fatores são limitantes para a produção primária destes organismos e suas possíveis repercussões sobre os usos múltiplos da água e a saúde humana, incluindo a possibilidade de produção de cianotoxina por algumas cepas de cianobactérias. Assim, a tomada de decisões e o manejo dos sistemas aquáticos se tornarão mais eficientes.

1.3.2 Ciclo do nitrogênio

Além de ser um dos elementos indispensáveis para a sobrevivência dos diferentes organismos na Terra, o nitrogênio é o elemento químico de maior abundância total na biosfera, apresentando uma quantidade total na atmosfera, solos e águas de aproximadamente 4×10^{21} g, mais do que a massa de carbono (C), fósforo (P), oxigênio (O) e enxofre (S) combinados, sendo estes outros elementos também necessários à sustentação da vida (GALLOWAY et al., 2003). De acordo com referências citadas por Ward (2012), os principais reservatórios de nitrogênio existentes na Terra estão na atmosfera, na biosfera, nos oceanos e em reservatórios geológicos. De todas as formas conhecidas, a mais abundante encontra-se como N_2 (gás nitrogênio) na atmosfera, sendo também a principal forma observada nos oceanos, na forma dissolvida.

Apesar de o nitrogênio possuir um papel fundamental no controle da produção primária na biosfera (GRUBER; GALLOWAY, 2008), somente 0,02% apresenta-se em formas diretamente disponíveis aos seres vivos (GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013). Isto se deve pela forma molecular que apresenta uma ligação tripla que demanda significativa energia para rompê-las. Isso requer processos com elevada temperatura ou com a presença de microrganismos especializados em fixar nitrogênio. Assim, o nitrogênio pode ser apresentado em dois grupos diferentes, o nitrogênio não reativo (N_2) e o nitrogênio reativo (N_r), biologicamente disponível, ligado a carbono, oxigênio ou hidrogênio (GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013). Este último inclui formas inorgânicas reduzidas (NH_3 , NH_4^+), formas inorgânicas oxidadas (NO_x , HNO_3 , N_2O , NO_3^-) e compostos orgânicos (ureia, aminas, proteínas, ácidos nucleicos) (GALLOWAY et al., 2003).

O nitrogênio reativo ocorre naturalmente a partir da fixação biológica do nitrogênio, um processo do ciclo do nitrogênio em que ocorre conversão do gás N_2 em formas disponíveis necessárias ao desenvolvimento celular. Além deste caminho, o N_r pode advir da formação de raios em tempestades, com capacidade de quebrar a tripla ligação do N_2 e formar óxidos de nitrogênio (FOWLER et al., 2013; GALLOWAY, 1998; GALLOWAY et al., 2003; GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013). O N_r é passível de diversas transformações biológicas e químicas, uma vez que participa de uma série de processos do ciclo do nitrogênio antes de voltar para a atmosfera como nitrogênio molecular (FOWLER et al., 2015).

A Figura 1 mostra os principais processos do ciclo do nitrogênio, como a fixação do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação, assimilação e mineralização. As transformações e

transferências neste ciclo ocorrem predominantemente por processos biológicos, mediados por significativa diversidade de microrganismos.

A fixação biológica do nitrogênio se refere à transformação do nitrogênio atmosférico em uma forma capaz de ser absorvida pelos organismos, ocorrendo em ambientes terrestres e aquáticos, e considerada a principal rota de entrada deste nutriente nos ecossistemas. Neste processo, alguns grupos restritos de bactérias e Archaea (FOWLER et al., 2015; WARD, 2012) podem converter o N_2 (gasoso) a amônia (NH_3) ou íon amônio (NH_4^+). No ciclo do nitrogênio, também ocorre o processo de nitrificação, no qual o nitrogênio é oxidado a nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-), apresentando subprodutos como óxido nítrico (NO) e nitroso (N_2O), que contribuem para a emissão de gases para a atmosfera. Outro processo é a desnitrificação, no qual ocorre a redução de nitrato a espécies de nitrogênio na forma de gás (N_2 , N_2O , NO). As plantas, algas e bactérias utilizam o N através da conversão das formas inorgânicas para formas orgânicas, tornando, assim, o nitrogênio disponível para a cadeia alimentar (MARTINS et al., 2003).

Figura 1: Fluxos básicos do ciclo do nitrogênio em qualquer ecossistema. Desnitrificação; Fixação do nitrogênio; Nitrificação; "Reamonificação" (redução do nitrato a amônio); Redução assimilatória do nitrato; Mineralização (amonificação); Assimilação. Fonte: modificado de Bowden (1987).

As atividades antrópicas têm contribuído para desbalancear o ciclo do nitrogênio e alterar os fluxos das formas nitrogenadas (STEVENS et al., 2004; VITOUSEK et al., 1997).

O N_r vem sofrendo um aumento considerável em função das alterações ambientais [eutrofização de sistemas terrestres e aquáticos; acidificação global; transformações químicas do nitrogênio ao longo do percurso de transporte no ambiente (GRUBER; GALLOWAY, 2008)], como resultado direto da ação humana. A agricultura é uma das fornecedoras de N_r para o ambiente, com apenas 17% do nitrogênio produzido consumido pelo homem e seu restante, perdido para solo, água doce e atmosfera (FOWLER et al., 2013). Além desta atividade, a queima de combustíveis fósseis também contribui para o aumento de N_r no ecossistema, convertendo tanto N_2 atmosférico como N fóssil a NO_x reativo (GALLOWAY et al., 2003).

Estudos como de Galloway (1998) e Fowler et al. (2013), mostram que o fornecimento antrópico de nitrogênio nos ambientes terrestres globais dobrou (de 70 Tg $N\cdot ano^{-1}$ em 1970, para cerca de 140 Tg $N\cdot ano^{-1}$ na década de 1990). As formas nitrogenadas mais prejudiciais à qualidade dos ecossistemas aquáticos encontram-se como nitrogênio inorgânico dissolvido (nitrato e amônio), compostos orgânicos dissolvidos (aminoácidos e ureia), e nitrogênio particulado (RABALAIS, 2002).

A Figura 2 mostra as transformações principais do ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos. Ambos desnitrificação e oxidação anaeróbia de amônia (anammox) ocorrem em condições anóxicas, e produzem substratos que podem ser usados para a respiração de bactérias desnitrificantes convencionais ou anammox. As interações apresentadas mostram que organismos nitrificantes e desnitrificantes podem se acoplar, desde que estejam em gradientes adequados para que não haja inibição nem da nitrificação nem da desnitrificação. Isso resulta em diferentes gradientes de difusão, o consumo líquido de amônio e a produção líquida do gás N_2 (WARD, 2012).

Figura 2: Transformações no ciclo do nitrogênio enfatizando a ligação entre processos ocorridos em ambientes aquáticos. Setas sólidas: transformações microbianas; setas pontilhadas: transformação química. Fonte: Modificado de Ward (2012).

Em bacias hidrográficas de ambientes tropicais, o nitrogênio total apresenta-se em média com $5,1 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, sendo que deste total 30% encontram-se na forma particulada e 70%, na forma dissolvida (LEWIS et al., 1999). Da fração dissolvida, em média 50% estão na forma orgânica e 50% na forma inorgânica (dos quais 20% de amônio e 80% de nitrato). Os ambientes aquáticos podem desempenhar um importante papel no fornecimento de N para os sistemas costeiros ou atuar como sumidouros do nutriente (i.e. retenção do N por diferentes processos). Lagos e reservatórios são reconhecidos também pela extensa desnitrificação e sedimentação do nitrogênio que pode ocorrer devido ao tempo de residência da água relativamente maior que em córregos e rios (HARRISON et al., 2009).

1.3.3 Assimilação de nitrogênio pelo fitoplâncton

O estudo da assimilação do nitrogênio pelo fitoplâncton vem sendo realizado há muito tempo, visto que existem várias referências das décadas de 1960, 70 e 80 (BATED, 1976; COLLOS, 1987; CONWAY, 1977; DUGDALE; GOERING, 1967; PRICE; HARRISON, 1988). O interesse em tais estudos tem aumentado ainda mais nos últimos anos, visto que tais organismos podem remover os nutrientes dos corpos de água por algumas rotas, incluindo a assimilação intracelular (ASLAN; KAPDAN, 2006; GARCÍA et al., 2006; KHAN; YOSHIDA, 2008). A assimilação do nitrogênio é um processo biológico de transformação do

nitrogênio inorgânico em nitrogênio orgânico, utilizado para o crescimento de plantas, bactérias, fungos e algas (ANTIA; HARRISON; OLIVEIRA, 1991; LAUTENSCHLAGER, 2001), uma vez que são formados compostos para viabilizar o crescimento, como aminoácidos, proteínas, DNA, RNA, pigmentos, carboidratos e lipídios contendo nitrogênio (DORTCH, 1982).

A assimilação do nitrogênio por organismos fitoplanctônicos dá-se pelo transporte deste elemento, principalmente na forma iônica, por meio da membrana plasmática, de fora para dentro da célula. Seu processo caracteriza-se por um encadeamento de reações conduzidas por complexos enzimáticos que possibilitam a incorporação dos íons inorgânicos em substâncias orgânicas da célula, assinalando reações de redução das formas nitrogenadas (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; SEPÚLVEDA, 2000). A primeira etapa das reações enzimáticas ocorridas neste processo é a redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), processo no qual atua a enzima nitrato redutase (NR) e que utiliza o NAD(P)H como agente redutor (FALCÃO, 2006). Desta forma, a presença desta enzima é um dos fatores responsáveis pela realização do processo de assimilação (SOUZA, 2006).

Como a ação da enzima NR responde de acordo com as mudanças diurnas na fotossíntese, a radiação solar é descrita como um dos importantes fatores intervenientes na assimilação de diversas formas do nitrogênio, tal como nitrato e amônio, tanto em ambientes temperados e marinhos como em ambientes subtropicais/tropicais e de água doce (BERMAN et al., 1984; DÖHLER, 1997; SOUZA, 2006; MONETA et al., 2014). Em estudo realizado por Berman et al. (1984) no Lago Kinneret, em Israel, com foco no organismo *Peridinium* sp., os autores observaram que durante o meio-dia, a velocidade de assimilação do nitrato apresentou valor de $7,5 \times 10^{-3} \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, diminuindo durante a noite para $2,0 \times 10^{-3} \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Nesse trabalho, tanto o nitrato como o amônio apresentaram aumento em sua assimilação pelo fitoplâncton sob elevadas intensidades luminosas, porém com alguma diminuição do nitrato em intensidades muito elevadas, por volta de $800 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A segunda etapa do processo de assimilação é a redução do nitrito ao amônio por meio da enzima nitrito redutase (NiR). Após a conversão a amônio, este é incorporado na forma orgânica nos aminoácidos pela ação do glutamato sintase e da glutamina sintetase (GS-GOGAT), caso as concentrações de amônio sejam baixas nas células. Se estas concentrações forem elevadas, a assimilação é mediada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) (CRAWFORD; FORDE, 2002; FALCÃO, 2006; ROJAS, 2012). A glutamina e o glutamato desenvolvem o papel de doadores de nitrogênio na biossíntese de quase todos os aminoácidos,

ácidos nucleicos e outros compostos que possuem nitrogênio, como a clorofila-*a* (CORUZZI, 2003).

Além disso, o carbono também é um elemento requerido durante o processo de assimilação, mais especificamente na síntese de aminoácidos. Desta forma, a assimilação do nitrogênio resulta no estímulo respiratório do carbono (SEPÚLVEDA, 2000). Em uma fase inicial do processo de assimilação, as formas inorgânicas de nitrogênio acumulam-se no citoplasma da célula, formando estoques transitórios. Estes estoques são influenciados pelas concentrações ambientais e pela velocidade de assimilação (BERGES, 1997).

A temperatura mostra-se como outro importante fator de interferência na assimilação. De acordo com Souza (2006), em seu estudo com a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* em ambiente de água doce, a assimilação de nitrogênio ocorreu de maneira facilitada quando o ambiente apresentou uma temperatura elevada. Já em ambientes temperados e marinhos, o melhor desempenho da assimilação foi em temperatura de 0,5 a 3°C, como apresentado por Döhler (1997) em estudo realizado no Mar da Escócia, Antártica. No estudo desenvolvido por Moneta et al. (2014) no Mar do Norte, na Holanda, as temperaturas da água atingiram seu menor valor em janeiro (1,4°C) e maior valor em julho (19,4°C). Nesse caso, a assimilação de amônio, nitrato e ureia apresentaram menores taxas no outono e inverno e maiores taxas na primavera e verão, o que reforça a correlação positiva entre assimilação e temperatura.

A concentração ambiental de nutrientes também se apresenta como fator que interfere no processo de assimilação pelo fitoplâncton. Segundo Berman (1984), Souza (2006) e Falcão (2006), a assimilação do nitrato (NO_3^-) é inibida em fungos, plantas superiores e algas quando a principal fonte de nitrogênio disponível é o amônio (NH_4^+). Este se apresenta em muitos estudos como a principal forma de nitrogênio assimilada pelo fitoplâncton (BERMAN et al., 1984; DÖHLER, 1997; BRADLEY et al., 2010; FILIPPINO et al., 2011; SEEYAVE et al., 2013; GANGULY et al., 2013; MONETA et al., 2014). Alguns destes estudos mostram a ureia como segunda maior forma de nitrogênio assimilável e outros apresentando o nitrato como tal.

A possível interação entre as formas nitrogenadas também é um fator importante na regulação da assimilação do nitrogênio. Jauzein et al. (2008) observaram a diminuição da taxa máxima de assimilação da ureia ($V_{\text{máx N-ureia}}$), em uma concentração constante de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, ao mesmo tempo que houve um aumento no gradiente da concentração de amônio ($0 - 10 \mu\text{g.L}^{-1}$). Já quando a ureia era a forma nitrogenada que sofria alteração do gradiente de concentração, enquanto o amônio mantinha-se constante a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$, não foi observada nenhuma influência da concentração da ureia na $V_{\text{máx N-amônio}}$. Em pesquisa realizada no Mar Báltico, a adição de

NH_4^+ reduziu a assimilação da ureia de forma significativa (JAUZEIN et al., 2008). Alguns estudos constataram que há uma grande variabilidade nas características de inibição, tanto no nível, que pode ser de 15 a 90%, como no limiar de concentração do amônio necessária para dificultar a assimilação da ureia (HEALEY, 1977; IRMISCH, 1991; MCCARTHY; EPPLEY, 1972). Não foi encontrada uma tendência semelhante à interferência do nitrato como foi para a assimilação do amônio e ureia (JAUZEIN et al., 2008).

A cinética de assimilação destas formas nitrogenadas indica que o fitoplâncton apresenta uma assimilação mais rápida pelo nitrogênio, e uma maior afinidade em comparação a macroalgas, além de apresentar uma elevada relação superfície:volume proporcionada pelas microalgas. Como estes nutrientes são transportados através da membrana celular para dentro da célula, organismos menores teoricamente apresentariam uma vantagem em assimilar mais rapidamente o nitrogênio (HEIN; PEDERSEN; SAND JENSEN, 1995). As taxas máximas de assimilação do nitrogênio ($V_{\text{máx}}$), juntamente com a baixa constante de meia saturação (K_m), caracterizam a cinética de assimilação do nitrato e amônio. Isso resulta em uma maior velocidade de assimilação deste nutriente pelo fitoplâncton (HEIN; PEDERSEN; SAND JENSEN, 1995; PEDERSEN; BORUM, 1997).

A assimilação de nitrogênio pode ser descrita pela cinética enzimática de Michaelis-Menten, em que a velocidade da reação aumenta à medida que a concentração do substrato aumenta, até atingir um máximo de velocidade, devido à saturação da enzima utilizada. A cinética de Michaelis-Menten apresenta-se como uma curva que atinge um patamar, de acordo com a Equação 1.

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Em que:

v = velocidade de assimilação

$V_{\text{máx}}$ = taxa máxima de assimilação

$[S]$ = concentração do substrato

K_m = constante de meia saturação

As formas inorgânicas de nitrogênio, amônio e nitrato, além dos aminoácidos, apresentam uma característica comum a toda comunidade fitoplancônica, tanto em ambiente natural como em cultivo, que é sua acumulação dentro das células. Trata-se de uma reserva de nitrogênio, que pode ser totalmente esgotada pelas células em caso de escassez do nitrogênio

externo utilizado para o seu crescimento e sobrevivência (DORTCH et al., 1985; SEPÚLVEDA, 2000). No entanto, para que as funções metabólicas das células sejam mantidas, o fitoplâncton tem a capacidade de selecionar as formas nitrogenadas não essenciais. Primeiramente, as substâncias nitrogenadas inorgânicas são esgotadas, em seguida, pode ocorrer a perda total dos aminoácidos livres, ficobiliproteínas, e parte das proteínas, RNA e clorofilas, respectivamente. Em casos de extremo estresse nutricional, a deficiência de nitrogênio que limita o crescimento das células procede na diminuição da razão N/C, nos teores de clorofila total e proteína total por células, além do rendimento fotossintético.

Fontes de nitrogênio parecem provocar mudanças na composição fitoplanctônica, que por sua vez, apresentam preferências distintas nas formas nitrogenadas para seu desenvolvimento (ANTIA; HARRISON; OLIVEIRA, 1991). Há uma variedade de interações entre a forma nitrogenada preferencialmente assimilável por cada grupo, ou até mesmo espécie fitoplanctônica. Dependendo do armazenamento de determinada forma nitrogenada nas células, um grupo ou espécie de fitoplâncton pode preferir assimilar uma forma nitrogenada a outra, ou apresentar uma ordem de preferência para a captação.

1.3.3.1 Nitrato

A assimilação do nitrato decorre da redução do nitrato a nitrito, seguido da redução do nitrito a amônio (SYRETT; LEFTLEY, 2013). Desta forma, estudos sugerem que a assimilação do nitrato requer maior energia para ser realizada do que a assimilação do amônio, já que o primeiro passa por etapas de síntese de NO_3^- e NO_2^- , necessitando de sistemas de transporte ativo associado e um volume de estoque de ATP e NADPH, além de ser limitado por taxas de nitrificação e pela mistura vertical do corpo de água. Como este processo necessita de fontes de energia para ocorrer, é dependente de luz, oxigênio, enzimas e substratos metabólicos (MULHOLLAND; LOMAS, 2008).

O primeiro passo é catalisado pela enzima nitrato redutase, requerendo dois elétrons por átomo de nitrogênio, e o segundo passo é catalisado pelo nitrito redutase, que requer seis elétrons, conforme a reação a reação:

Normalmente, a enzima catalisa a redução do nitrato a nitrito com NADH como elétron doador. Já a enzima nitrito redutase, contendo ferro, reduz o nitrito a amônio com ferredoxinas reduzidas como elétrons doadores (SYRETT; LEFTLEY, 2013).

O carbono apresenta-se como uma fonte importante para a assimilação do nitrato no escuro, na forma de carboidratos, por exemplo. Já na presença de luz, o nitrato só é assimilado quando as células esgotadas de carbono são capazes de fixar CO₂. No entanto, na falta de CO₂, as células iluminadas são reduzidas a amônio, que se acumula muito mais rapidamente do que em células com armazenamento de CO₂ (SYRETT; LEFTLEY, 2013). Outro fator que reforça a relação entre a luz à assimilação do nitrato é a inibição da atividade da enzima nitrato redutase no escuro, resultante da diminuição da fixação do CO₂.

As concentrações de amônio interferem na assimilação de nitrato e concentrações de 1.10^{-7} a 3.10^{-7} mol.L⁻¹ podem ser suficientes para inibir totalmente a assimilação de nitrato (L'HELGUEN; MAGUER; CARADEC, 2008). O processo de inibição da assimilação do nitrato pelo amônio pode ser representado pela cinética de Michaelis-Mente reversa, já que em concentrações muito baixas de amônio, verifica-se uma potencial inibição do processo.

Outro fator relevante para o entendimento da assimilação desta forma nitrogenada é a fisiologia fitoplanctônica. No estudo de L'Helguen, Maguer e Caradec (2008), espécies fitoplanctônicas com células menores responderam a uma maior inibição da assimilação do nitrato na presença de qualquer concentração de amônio. Isto indicou que independentemente da concentração de amônio, a razão superfície/volume da célula fitoplanctônica pode ser crucial para a assimilação do nitrato.

1.3.3.2 Amônio

Amônio é o substrato inicial da nitrificação e regenerado pela mineralização da matéria orgânica. Trata-se, provavelmente, de fonte preferencial de nitrogênio assimilada pela maioria dos organismos, como sugeriram Twomey, Piehler e Paerl (2005). De acordo com tais autores, a comunidade fitoplanctônica tipicamente prefere assimilar formas reduzidas de N, como o amônio, em vez de formas oxidadas, como nitrato e nitrito.

A assimilação do amônio decorre da atividade da enzima glutamato dehidrogenase, que catalisa a aminação redutiva de 2-oxoglutarato para formar glutamato. O amônio, então incorporado, pode ser transferido para oxoglutarato tal que duas moléculas de glutamato

resultarão na reação da catalise formando glutamina 2-oxoglutarato amino transferase (GOGAT). Outro padrão da assimilação deste é a reação da síntese de glutamato que se combina ao amônio, formando glutamina (SYRETT; LEFTLEY, 2013). O amônio está disponível para uso celular após ser transportado através da membrana celular (CONWAY, 1977) e pode ser utilizado na síntese de compostos orgânicos, tais como os aminoácidos. Em algas como as dos gêneros *Chlorella* e *Ankistrodesmus*, um NADP ligado ao glutamato dehidrogenase provavelmente desempenha funções na assimilação do amônio (SYRETT; LEFTLEY, 2013).

1.3.3.3 Ureia

Para a realização da assimilação da ureia, duas enzimas são conhecidas, a urease e a ATP:ureia amidoliase (UAL-ase). No entanto, foi observado em estudo utilizando diversas espécies fitoplanctônicas em meio axênico, e com a ureia como única fonte nitrogenada, que nenhum organismo apresentava ambas as enzimas (SYRETT; LEFTLEY, 2013). Estas enzimas se diferem pelas seguintes características: a) a atividade da urease é inibida por hidroxiiureia, enquanto a da UAL-ase não; b) a atividade da UAL-ase requer ATP para seu funcionamento, enquanto a urease torna-se ineficiente com a presença de ATP; c) a atividade da UAL-ase é inibida por avidina combinada a biotina, já a urease não sofre nenhum efeito com a avidina (SYRETT; LEFTLEY, 2013).

A ureia também é considerada como uma importante fonte de nitrogênio para o fitoplâncton, contribuindo significativamente para a quantidade total de N utilizado por esta comunidade (TWOMEY; PIEHLER; PAERL, 2005). Foi observado que em condições anaeróbicas e no escuro, a assimilação da ureia foi prejudicada, enquanto que em condições com presença de luz e anaeróbicas ou em condições aeróbicas, mas no escuro, a assimilação foi favorecida (WILLIAMS; HODSON, 1977). Em células com déficit de nitrogênio, a assimilação da ureia pode ocorrer no escuro, enquanto que em células com excesso de nitrogênio, a taxa de assimilação da ureia no escuro é baixa, e altamente estimulada na presença de luz (ANTIA; HARRISON; OLIVEIRA, 1991).

Há estudos que mostram que a ureia tem a capacidade de dificultar a assimilação do nitrato, no entanto, não inibe a um nível igual ao amônio. Outros estudos mostram que o nitrato tem a capacidade de inibir a assimilação da ureia (GRANT; MADGWICK; DAL

PONT, 1967; LUND, 1987; MCCARTHY; EPPLEY, 1972; MOLLOY; SYRETT, 1988; RICKETTS, 1988).

2. CAPÍTULO 2: EXPERIMENTOS COM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Este capítulo descreve a metodologia utilizada para o cumprimento do primeiro objetivo específico desta pesquisa, que foi avaliar a assimilação de nitrogênio em amostras ambientais do Reservatório do Lobo (SP). Além disso, o capítulo apresenta os resultados obtidos e a sua discussão.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Área de estudo

Foi utilizada como área de estudo o Reservatório do Lobo (Figura 3), localizado nos municípios de Itirapina e Brotas, a aproximadamente 15 km de São Carlos, na região centro-leste do Estado de São Paulo, e com as seguintes coordenadas geográficas: 22°15' S 47°49' O (RIVERA et al., 2007). O reservatório encontra-se em uma sub-bacia da UGRHI 13 – Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos do Tietê/Jacaré (PASSERINI, 2010).

Figura 3: Imagem de satélite da Represa do Lobo com seus usos e ocupações ao entorno. Fonte: Google Earth.

O reservatório foi construído em 1936, com intuito de gerar energia elétrica para uso das comunidades e indústrias da região. Atualmente, atende a esta demanda, porém com

menor intensidade, intensificando seu uso para o lazer e recreação (MOTHEO, 2005). Desde 1983, o sistema aquático foi inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) Corumbataí, pelo Decreto Estadual nº 20.960, de 8 de junho de 1983 (SÃO PAULO, 1983). A área de entorno do reservatório apresenta usos agrícolas, como monocultura de eucalipto e cana-de-açúcar, além da mineração de areia (PASSERINI, 2010; PEREIRA, 2005). É encontrado no entorno da represa, além destes usos e ocupações, a presença de vários condomínios residenciais e propriedades particulares, além do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CREA) pertencente a Universidade de São Paulo, e áreas de reflorestamento de *Pinus* sp. e *Eucaliptus* sp. (MILANO et al., 2013).

O clima da região é caracterizado pelos períodos de seca no inverno (maio a outubro) e chuvoso no verão (novembro a abril), classificado como subtropical mesotérmico. Apresenta uma temperatura entre 15°C e 17°C no mês mais frio do inverno (julho) e 21°C a 23°C no mês mais quente do verão (janeiro). Sua pluviosidade anual média é de 1.500 mm (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2013; TUNDISI et al., 2015). O solo da bacia do reservatório do Lobo constitui-se por rochas da formação Serra Geral, com basalto, arenito e outros, além da formação Botucatu-Pirambóia e do grupo Bauru, com arenitos, siltitos e conglomerados (PEREIRA, 2005). A dominância é de sedimentos arenosos holocênicos, e em algumas planícies predomina os solos orgânicos (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2013).

Os principais tributários que desaguam no reservatório são os ribeirões Itaqueri e do Lobo, além dos córregos do Limoeiro, da Água Branca e o ribeirão da Onça (MOTHEO, 2005). Estes tributários caracterizam a sua forma alongada, de contorno irregular e levemente dendrítico. Trata-se de um sistema raso, com profundidade média de 3 m e máxima de 12 m, largura máxima de 2 km, comprimento máximo de 8 km, área total de 6 km² e volume de 22 milhões de m³ (RIVERA et al., 2007).

As características dimensionais, além da presença dos ventos e consequente turbulência no corpo de água do reservatório, são responsáveis pela ausência da estratificação térmica deste, e de uma distribuição homogênea do fitoplâncton na coluna de água (ANGELINI; PETRERE, 2000).

As formas não planejadas de uso e ocupação nas áreas de drenagem do Reservatório do Lobo têm propiciado diversas alterações e impactos ambientais, tais como morte de peixes, presença das cianobactérias potencialmente tóxicas *Microcystis aeruginosa* e *Aphanizomenon* sp., alteração das espécies de macrófitas comuns no reservatório, assoreamento, aceleração da eutrofização, introdução de agentes químicos nocivos ao meio ambiente, aumento da descarga

de esgoto doméstico não tratado e desmatamento de suas margens (MOTHEO, 2005; PEREIRA, 2005; PASSERINI, 2010).

RIVERA et al. (2007) sugeriram que o Reservatório do Lobo é suscetível ao processo de eutrofização pela entrada de resíduos urbanos e industriais no tributário Rio Itaqueri, podendo modificar o nível dos nutrientes no reservatório. O reservatório era classificado como oligotrófico até o início dos anos 1980, mas chegou aos anos 2000 com um estado mesotrófico, tendendo à eutrofização (MOTHEO, 2005). Além disso, vários rios da região têm origem na Serra do Itaqueri, com elevada capacidade de dissolução e transporte de substâncias minerais, podendo causar alterações nos níveis atuais de amônio do reservatório.

2.1.2 Obtenção de dados climatológicos e hidrológicos

Foram obtidos os dados de precipitação mensal (mm), temperatura do ar (°C) e velocidade dos ventos (Km.h⁻¹) para os meses de outubro de 2014 até julho de 2015 da estação do CRHEA, pertencente a Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP).

Estes dados foram usados para melhor caracterizar os aspectos climáticos e hidrológicos durante o período de estudo, e desta forma utiliza-los para possíveis comparações com os resultados encontrados nas análises e experimento realizados.

2.1.3 Procedimentos prévios ao experimento

Para a realização do experimento laboratorial da assimilação do nitrogênio pela comunidade fitoplanctônica do Reservatório do Lobo, alguns procedimentos prévios foram observados. Cálculos para quantificar o volume dos traçadores [nitrato – ¹⁵NO₃⁻; amônio – ¹⁵NH₄⁺; ureia – (¹⁵NH₂)₂CO] adicionados às amostras foram realizados, tendo como base as concentrações ambientais das formas nitrogenadas da coleta anterior. Foi considerada a adição desejável de uma concentração do traçador referente a 5% da concentração *in situ*. Este cuidado foi tomado para que não houvesse um enriquecimento das amostras a serem

analisadas, sendo apontado um limite de concentração de traçador entre 2-10% da concentração ambiental (LIPSCHULTZ, 2008). Com isso, a Equação 2 foi considerada.

$$[] \text{ desejada } \left(\frac{\mu g}{L} \right) = [] \text{ in situ } \left(\frac{\mu g}{L} \right) \times \% [] \text{ in situ desejada } \left(\frac{5}{100} \right) \quad (2)$$

Logo, fez-se a conta para obter o volume a ser pipetado na amostra ambiental:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \quad (3)$$

Onde:

C1 = concentração [] da solução filha (diluída) do traçador (mg.L⁻¹)

V1 = volume desejado a ser pipetado (L)

C2 = concentração [] desejada (mg.L⁻¹)

V2 = volume do frasco incubado (0,25 L)

Para a filtração das amostras, foram utilizados filtros de fibra de vidro GF-6 25 mm (marca Macherey-Nagel), com 0,45 µm de porosidade. Estes filtros foram previamente calcinados em mufla a 550°C por trinta minutos, para eliminar qualquer impureza (APHA, 2005). Após esse procedimento, os filtros foram pesados em balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUW220D, e deixados em placas de petri pequenas dentro de um dessecador.

2.1.4 Análises de campo

Algumas análises em campo foram realizadas para melhor detalhamento das condições do ambiente em estudo, e necessárias para verificar possíveis fatores ambientais que influenciaram a assimilação. Para os perfis verticais foi utilizada a Sonda Multiparamétrica YSI556 (Yellow Springer) para medição das seguintes variáveis: temperatura (°C), pH, condutividade elétrica (µS.cm⁻¹) e oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹). Foi utilizado também o Disco de Secchi para estimativa da transparência da água.

Para a construção de um perfil de RSFA (Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa; $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a escolha de duas profundidades para coleta das amostras, correspondentes a 50% e 10% de RSFA encontrada na superfície – definidas para comparação da quantificação de assimilação em uma maior e menor intensidade luminosa – utilizou-se um radiômetro (Quanta-Meter Ly-Cor, faixa de 400 a 700 nm).

Todas estas análises em campo foram realizadas nas quatro coletas entre as 7h e 8h da manhã.

2.1.5 Experimento da assimilação

As amostras ambientais foram provenientes do Reservatório do Lobo (SP) em quatro períodos distintos do ano, em outubro de 2014 e janeiro, abril e julho de 2015. Estes meses foram referentes aos períodos de inverno seco (maio a outubro) e verão chuvoso (novembro a abril), segundo Passerini (2010), para que a variação temporal fosse avaliada.

Para que as condições de luz e temperatura encontradas nas profundidades coletadas no reservatório fossem reproduzidas em laboratório, foram utilizadas incubadoras e refletores de lâmpada LED com potência de 50 W. A temperatura das incubadoras foi ajustada de acordo com as respectivas temperaturas observadas na coluna de água através da sonda multiparamétrica no momento das coletas das amostras. Já as RSFA observadas nas duas profundidades de coleta também foram reproduzidas nas incubadoras com auxílio das lâmpadas LED e monitoradas com radiômetro de bancada. Desta forma, os frascos incubados permaneceram em posições adequadas a receber a intensidade luminosa desejada (Figura 4).

Figura 4: Disposição dos frascos com as amostras ambientais do Reservatório do Lobo, com a adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, nas condições de luz e temperatura encontradas em campo e reproduzidas em incubadoras para incubação por uma hora.

As amostras de água do reservatório foram transportadas em caixas de isopor ao Laboratório BIOTACE (EESC/USP) e, em seguida, dispostas em frascos de vidro com volume de 250 mL para proceder com o experimento. O experimento foi realizado em triplicata, além da utilização de brancos necessários para posterior cálculo da assimilação. Foram introduzidos os volumes calculados dos traçadores de nitrogênio (^{15}N) nas amostras relativas à profundidade de 50% da RSFA (profundidade um), e colocados na incubadora com as condições referentes a tal profundidade durante o período de 1 h. Os mesmos procedimentos foram observados para as demais amostras (profundidade de 10% da RSFA), que foram dispostas em outra incubadora, com as condições de luz e temperatura ajustadas (Figura 5).

Este período de 1 hora de incubação foi estimado, levando-se em consideração que a assimilação interna se apresenta controlada constantemente por volta de 1 h para o amônio e 2 h para o nitrato (PRÉSING et al., 2001). Dugdale e Wilkerson (1986), apontam que nos primeiros 20 minutos da assimilação, este processo é mais acentuado, fazendo com que o fitoplâncton assimile mais rapidamente os nutrientes, tornando-se mais controlado e constante depois de decorrido esse período inicial.

Além disso, este tempo foi determinado para minimizar os efeitos da regeneração de nutrientes, a diluição isotópica e a diminuição da velocidade de assimilação, ocorridos em longos períodos de incubação (MULHOLLAND; LOMAS, 2008).

Figura 5: Esquema do experimento de assimilação, onde foi adicionado em 24 frascos a amostra ambiental do Reservatório do Lobo, e adicionado os traçadores de nitrato, amônio e ureia para incubação em incubadoras que reproduziram as condições de luz e temperatura observadas em campo.

Após 1 h de incubação, as amostras foram filtradas (cerca de 100-150 mL) com auxílio de bomba a vácuo, utilizando os filtros de fibra de vidro já preparados. Os filtros foram guardados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior secagem em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um dia. Em seguida, foram pesados novamente e acondicionados em local seco e escuro.

Finalmente, os filtros foram acondicionados em cápsulas de estanho e levados ao Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo), onde foi realizada análise elementar para quantificação do nitrogênio particulado e a espectrofotometria de massa para a determinação da composição isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) (C_p), em parceria com o Prof. Assoc. José Albertino Bendassoli.

2.1.6 Análises em laboratório

Além do experimento de assimilação em laboratório, foram armazenadas alíquotas das amostras para análises de variáveis físicas, químicas e biológicas. Da série nitrogenada, o nitrogênio total Kjeldahl (mg.L^{-1}) e o nitrogênio amoniacal ($\mu\text{g.L}^{-1}$) foram quantificados pelos métodos 4.500 N_{org} e NH_3 B e C, pelo Büchi®. Nitrato (mg.L^{-1}) e nitrito ($\mu\text{g.L}^{-1}$) seguiram o método de espectrofotometria através do espectrofotômetro Hach®. Para o fósforo total

($\mu\text{g.L}^{-1}$), adotou-se o método de digestão com persulfato, com utilização do espectrofotômetro Hach®. Os sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) foram filtrados em membrana pré-calcinada de microfibras de vidro (Millipore AP 20; 47 mm de diâmetro e 0,8 – 8,0 μm de porosidade), e analisados pelo método de gravimetria, com balança analítica com até cinco casas decimais. Todas estas análises foram realizadas segundo Standard Methods (APHA, 2005). A amônia foi determinada de acordo com Koroleff (1983), seguindo o método colorimétrico.

A ureia não foi determinada analiticamente, mas estimada empiricamente, considerando-a como 5% da concentração de nitrogênio orgânico total, que representa a subtração do NTK pelo Nitrogênio amoniacal (Equações 4 e 5), de acordo com Maranger (2013) (informação verbal)¹. Os cálculos estão apresentados a seguir:

$$N_{orgT}(\text{mg.L}^{-1}) = NTK - N_{amoniacal} \quad (4)$$

$$N_{ureia}(\mu\text{g.L}^{-1}) = (N_{orgT} \times 0,05) \times 1000 \quad (5)$$

A razão N/P foi calculada através das concentrações de fósforo total, nitrogênio total Kjeldahl, nitrato e nitrito (μM).

A clorofila-*a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) seguiu o método apresentado por Nush (1980) e NEN (1981), com a extração com etanol 80%, utilizando-se de choque térmico. Para esta análise, as amostras foram filtradas em membranas de microfibras de vidro (membrana GF/C de 0,45 μm) em campo, e armazenadas em freezer para posterior extração. Após a extração, foram efetuadas as leituras dos extratos em espectrofotômetro Hach® 4.000V, nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm. As concentrações foram estimadas pela Equação 6.

$$[\text{Clorofila} - a] = 29,6 \times \frac{V}{V_a \times S} \times [(Eu_{665} - Eu_{750}) - (Ea_{665} - Ea_{750})] \quad (6)$$

Em que:

[Clorofila-*a*] = concentração de clorofila-*a* na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

Eu = absorbância da amostra não acidificada;

Ea = absorbância da amostra acidificada;

¹Informação fornecida pro Maranger em Montreal (Canadá), em 2013.

V = volume do extrato (mL);

Va = volume da amostra filtrada (L);

S = espessura da cubeta (cm);

29,6 = Coeficiente de absorção específica da clorofila-*a*.

Com as amostras ambientais também foi realizado, em laboratório, o estudo qualitativo e quantitativo do fitoplâncton no Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC – USP).

Das amostras coletadas, 100 mL foram reservadas, transferidas para frascos de vidro, fixadas com lugol acético e armazenadas em local escuro. Para a realização da análise quantitativa da comunidade, foram utilizadas câmaras de sedimentação (UTHERMÖHL, 1958) e microscópio ótico invertido Olympus CK2® com aumento de 400 vezes. A densidade total fitoplancônica (ind.mL⁻¹) foi calculada, considerando como um indivíduo organismos unicelulares, filamentosos e coloniais, com base em APHA (2005). A identificação dos organismos foi realizada através de chaves de classificação presentes na literatura, ao menor nível taxonômico possível. A abundância relativa (%) dos grupos fitoplanctônicos também foi realizada seguindo APHA (2005).

O cálculo da densidade total seguiu a Equação 7.

$$D = \frac{C \times At}{Af \times F \times V} \quad (7)$$

Em que:

D = densidade total (ind.mL⁻¹)

C = número de organismos contatos

At = área total do fundo da câmara de sedimentação (mm³)

Af = área do campo de contagem (mm²)

F = número de campos contados

V = volume da amostra sedimentada (mL)

O biovolume de cada organismo também foi estimado, baseando-se nas formas geométricas encontradas no estudo de Hillebrand et al. (1999). Utilizando-se uma régua acoplada ao microscópio, foi possível medir as dimensões dos diferentes grupos de organismos e, desta forma, realizar o cálculo de seus volumes, obtendo uma média dos

volumes de um total de 30 indivíduos medidos. A partir da média dos volumes, foi realizado o cálculo do biovolume, pela multiplicação com a densidade total fitoplanctônica (Equação 8).

$$B = D \times V_{méd} \quad (8)$$

Em que:

B = biovolume ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)

D = densidade total ($\text{ind} \cdot \text{mL}^{-1}$)

$V_{méd}$ = volume médio ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{ind}^{-1}$)

2.1.7 Cálculo da assimilação

As etapas do cálculo das taxas de assimilação de nitrato, amônio e ureia foram transferidas para planilha Excel com base na publicação de Dugdale e Goering (1967). As Equações 9-14 foram utilizadas para estimar as taxas de assimilação.

$$^{15}\text{N}_{xs} = \left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right) (\text{após incubação}) - \left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right) (\text{natural}) \quad (9)$$

Em que:

$^{15}\text{N}_{xs}$ = Concentração ^{15}N excedente (Atom %)

$(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$ (após incubação) = C_p = Concentração medida para a amostra (Atom %)

$(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})$ (natural) = C_0 = Abundância natural de ^{15}N (Atom %)

$$^{15}\text{N}_{enr} = \frac{([^{15}\text{N}]_{\text{adicionado}}) \times 100}{[^{15}\text{N}]_{\text{adicionado}} + [^{15}\text{N}]_{\text{natural}}} \quad (10)$$

Em que:

$^{15}\text{N}_{enr}$ = C_d = ^{15}N enriquecido (Atom %)

$[^{15}\text{N}]_{\text{adicionado}}$ = concentração adicionada de ^{15}N (μM)

$[^{15}\text{N}]_{\text{natural}}$ = concentração ambiental da forma nitrogenada em estudo (μM)

$$V_t^N = \frac{15N_{xs}}{[(15N_{enr} - 15N_N) \times t]} \quad (11)$$

Em que:

V_t^N = velocidade de assimilação (h^{-1})

$^{15}N_N = C_0$

t = tempo de incubação (h)

$$NOP_t = NOP_{filtro} / V_{filtrado} \quad (12)$$

Em que:

NOP_t = Nitrogênio Orgânico Particulado total ($\mu g.L^{-1}$)

NOP_{filtro} = Nitrogênio Orgânico Particulado no filtro (μg)

$V_{filtrado}$ = volume filtrado da amostra (L)

$$NOP_{filtro} = massa\ do\ filtrado \times (\% \ elemento / 100) \times 10^6 \quad (13)$$

Em que:

Massa do filtrado = diferença dos pesos do filtro depois e antes de filtrar (g)

% elemento = resultado da análise elementar para quantificação do N particulado

$$\rho_t^N = V_t^N \times NOP_t \quad (14)$$

Em que:

ρ_t^N = Taxa de assimilação - uptake absoluto (ρ ; $\mu gN.L^{-1} h^{-1}$)

2.1.8 Organização dos dados e análises estatísticas

Os resultados foram analisados no programa Statistica 7.0 com uso de teste não paramétrico (Correlação de Spearman), já que os dados não seguiram distribuição normal. Essa análise buscou facilitar a visualização da influência das variáveis bióticas e abióticas da água sobre a assimilação das formas nitrogenadas pelo fitoplâncton no reservatório. Além

disso, utilizando Análise de Variância (ANOVA), foi avaliada a variação sazonal das taxas de assimilação e entre as diferentes profundidades de coleta, a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Dados climatológicos e hidrológicos

Os dados de precipitação mensal (mm), temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e velocidade dos ventos (km.h^{-1}) estão apresentados na Figura 6. Os perfis verticais encontram-se na Figura 7.

A precipitação mostrou-se compatível com o esperado de acordo com as estações do ano, sendo novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março os meses mais chuvosos, com máxima precipitação em dezembro de 2014 (próximo de 250 mm). Os meses de outubro de 2014, abril, maio, junho e julho de 2015 foram os meses com menor precipitação, sendo junho o mês em que quase não houve precipitação (cerca de 10 mm).

Figura 6: Dados de precipitação (mm), temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e velocidade dos ventos (m.s^{-1}) a 0,5 m e 2 m, dos meses de outubro de 2014 até julho de 2015, do Reservatório do Lobo, obtido pela estação do CRHEA da EESC/USP – São Carlos/SP.

A temperatura do ar durante os meses das coletas variou entre 24°C em out/14 até 19°C em jul/15, apresentando um pico em janeiro de aproximadamente 26°C . Assim como a precipitação, a temperatura do ar seguiu as características climatológicas da região, com seus maiores valores no verão (jan/15) e menores no inverno (jul/15).

A velocidade dos ventos no reservatório diminuiu de out/14 a jul/15, sendo maior em out/14 para as duas alturas analisadas na estação do CRHEA ($5,9 \text{ km.h}^{-1}$ na altura de 2m; $3,3 \text{ km.h}^{-1}$ na altura de 0,5m). É possível observar que a velocidade dos ventos sempre foi maior na altura correspondente a 2m.

2.2.2 Resultados de campo

Os resultados observados em campo durante as quatro coletas realizadas estão apresentados na Tabela 1, e os perfis obtidos, na Figura 7.

As profundidades em que foram coletadas amostras durante todo período de estudo variaram de 0,2 a 1,5 m. Estas profundidades corresponderam aos valores de 50% e 10% da Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa observada na superfície, denominadas profundidades 1 e 2, respectivamente.

A RSFA atingiu seu valor máximo em out/14 ($440 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) na prof. 1. A radiação mais baixa durante os meses de coleta ocorreu em jul/15, na prof. 2, com $18 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Exceto no primeiro mês de estudo (out/14), em que a RSFA resultou em valores mais elevados para ambas as profundidades (440 e $99 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, prof. 1 e 2, respectivamente), os meses seguintes apresentaram valores relativamente semelhantes. Para a prof. 1, as radiações encontradas foram: em janeiro, abril e julho de 2015 de 135, 116 e $128 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. A prof. 2 obteve radiações de 29, 24 e $18 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nos mesmos meses em sequência. Importante observar que entre as profundidades a variação da radiação foi bastante expressiva, sendo em média cinco vezes maior na prof. 1 em relação a prof. 2.

Na Figura 7, é possível observar que não houve estratificação térmica em nenhuma das quatro coletas realizadas, caracterizando a mistura completa da coluna de água do reservatório. Os perfis de pH e OD apresentaram, em geral, tendência de diminuição da superfície ao fundo.

Figura 7: Perfil vertical da coluna de água do Reservatório do Lobo, com profundidade máxima de 11,5 m, das variáveis Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA: $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) e porcentagem de saturação do oxigênio dissolvido (%), para as quatro coletas realizadas (outubro/14: 1ª coleta; janeiro/15: 2ª coleta; abril/15: 3ª coleta; julho/15: 4ª coleta).

Considerando as duas profundidades de amostragem, a temperatura mostrou-se coerente as estações do ano em que as coletas foram realizadas: o mês de jul/15 com as menores temperaturas (média das profundidades: 19,4 $^{\circ}\text{C}$), referente ao inverno; e jan/15,

correspondente ao verão, com respectiva média de 26,8 °C. Os meses de out/14 e abr/15 obtiveram médias intermediárias (22,4 e 24,8 °C, respectivamente).

O pH caracterizou o ambiente como sempre próximo da neutralidade, com a água levemente ácida nos meses de out/14 (prof.1: 6,7; prof.2: 6,8) e jan/15 (prof. 1: 6,8; prof. 2: 6,5). O mês de abr/15 mostrou-se com uma água alcalina (prof. 1: 8,5; prof. 2: 8,7). Entre as profundidades, considerando uma mesma coleta, não houve variações significativas.

Os valores da condutividade elétrica (CE) foram de 16 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ em out/14 a no máximo 26 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ em jan/15 (Tabela 1). Em abril e julho de 2015 houve uma pequena oscilação, de 19-21 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ e de 18-21 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, nas profundidades de 50% e 10%, respectivamente.

Tabela 1: Resultados das análises de campo para duas profundidades do Reservatório do Lobo em relação a temperatura (T, °C), pH, Condutividade Elétrica (CE, $\mu\text{S.cm}^{-1}$); Oxigênio Dissolvido (OD, mg.L^{-1} e %), profundidade de desaparecimento do Disco de Secchi (transparência, m) e Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA, $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), durante as coletas de outubro de 2014 e janeiro, abril e julho de 2015

COLETAS	Profun- didade (m)	RSFA ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	T (°C)	pH	CE ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	OD (mg.L^{-1})	Saturação de OD (%)	Transpa- rência (m)
Out/14	Prof. 1	0,2	440	22,4	6,7	16	9,7	112,0
	Prof. 2	0,7	99	22,4	6,8	16	8,8	101,8
Jan/15	Prof. 1	0,5	135	26,8	6,8	26	5,2	71,6
	Prof. 2	1,5	29	26,9	6,5	26	4,9	67,8
Abr/15	Prof. 1	0,3	116	24,8	8,5	19	7,8	104,1
	Prof. 2	0,8	24	24,8	8,7	21	7,9	104,2
Jul/15	Prof. 1	0,2	128	19,4	7,6	21	4,1	48,6
	Prof. 2	0,9	18	19,4	6,7	18	3,2	38,9

Diferente das demais variáveis analisadas, em que seus valores se mantiveram em uma pequena faixa de variação, o oxigênio dissolvido e sua porcentagem de saturação apresentaram significativa mudança durante os meses de coleta. O máximo OD foi de 9,7 mg.L^{-1} no mês de out/14, com mínimo de 3,2 mg.L^{-1} em jul/15. A média da variação de OD entre as duas profundidades foi de 0,5 mg.L^{-1} . As porcentagens de saturação sugeriram ambientes supersaturados em out/14 e abr/15 (médias entre as profundidades: 106,9% em out/14 e 104,2% em abr/15). Em jan e jul/15, as médias foram 69,7% e 43,8%, respectivamente.

2.2.3 Resultados de laboratório

Na Tabela 2, a menor concentração do Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK) durante todas as coletas e profundidades foi de 0,2 mg.L⁻¹ em abr/15 na prof. 2, e o maior valor foi de 3,7 mg.L⁻¹ em jul/15 na prof. 1. Entre os meses de coleta, o NTK apresentou-se mais elevado em jul/15 (prof. 1: 3,7 mg.L⁻¹; prof. 2: 1,0 mg.L⁻¹). O mês em que ambas as profundidades se encontraram com NTK baixo foi abr/15, na faixa de 0,2-0,3 mg.L⁻¹. Out/14 foi o mês que apresentou uma maior variação [0,5 (prof. 1) – 0,9 mg.L⁻¹ (prof. 2)] do NTK entre as profundidades. Para out/14 e jan/15 a prof. 1 apresentou menor NTK em relação a prof. 2, já em abr e jul/15 a prof. 1 obteve valores maiores de NTK.

As concentrações de nitrato (NO₃⁻) apresentaram-se maiores para os dois pontos de coleta na coluna de água no mês de abr/15, com 0,7 mg.L⁻¹ na prof. 1 e 2. O mês com as menores concentrações foi out/14, com 0,2 mg.L⁻¹ e 0,3 mg.L⁻¹, nas prof. 1 e 2, respectivamente. Os meses de jan e jul/15 apresentaram uma maior variação das concentrações entre as profundidades, na faixa de 0,6 mg.L⁻¹ na prof. 1 para 0,4 mg.L⁻¹ na prof. 2.

Tabela 2: Concentrações da série nitrogenada [Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK; mg.L⁻¹), Nitrato (NO₃⁻; mg.L⁻¹), Amônia (NH₃; µg.L⁻¹), Ureia (µg.L⁻¹)], Fósforo Total (PT; µg.L⁻¹), Sólidos Suspensos Totais (SST; mg.L⁻¹); Relação N/P e Clorofila-*a* (Chl-*a*; µg.L⁻¹), durante as coletas de outubro/2014, janeiro, abril e julho/2015, do Reservatório do Lobo.

COLETAS		NTK (mg.L ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	NH ₃ (µg.L ⁻¹)	Ureia (µg.L ⁻¹)	PT (µg.L ⁻¹)	SST (mg.L ⁻¹)	Relação N/P	Chl- <i>a</i> (µg.L ⁻¹)
Out/14	Prof. 1	0,5	0,2	29,8	23,1	42,9	11,2	31	77,0
	Prof. 2	0,9	0,3	59,1	42,6	55,2	10,0	49	64,8
Jan/15	Prof. 1	0,3	0,6	460,2	50,0	68,4	7,0	28	63,0
	Prof. 2	0,4	0,4	416,9	50,0	23,4	7,4	76	46,8
Abr/15	Prof. 1	0,3	0,7	24,8	83,7	36,2	7,5	60	71,6
	Prof. 2	0,2	0,7	32,5	81,4	45,9	7,5	46	74,6
Jul/15	Prof. 1	3,7	0,6	163,2	174,7	37,9	9,8	249	95,9
	Prof. 2	1,0	0,4	219,1	39,3	38,9	9,7	78	104,8

A concentração de amônia nas amostras apresentou grandes variações durante os meses de amostragem. Em jan/15, em ambas as profundidades, as concentrações foram elevadas (média de $438,6 \mu\text{g.L}^{-1}$), se comparadas aos outros meses. Jul/15 foi o segundo mês com maior concentração de NH_3 , apresentando concentrações de $163,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 1 e $219,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 2. Out/14 e abr/15 foram os meses com maior semelhança das concentrações de amônia, com médias entre as profundidades de $44,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $28,6 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Em relação à ureia, o mês de abril apresentou menor variação entre as profundidades, apresentando-se na faixa de $83,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 1 para $81,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 2. O mês de out/14 apresentou uma concentração duas vezes maior na prof. 2 ($42,6 \mu\text{g.L}^{-1}$) do que na prof. 1 ($23,1 \mu\text{g.L}^{-1}$). Jul/15 apresentou maior alteração na concentração de ureia entre as profundidades, com $174,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 1 e $39,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 2.

O fósforo total apresentou maior concentração nas coletas da prof. 2, exceto no mês de jan/15 ($68,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ – prof. 1; $23,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ – prof. 2). Todos os meses de coleta apresentaram médias próximas entre as profundidades (out/14: $55,2 \mu\text{g.L}^{-1}$; jan/15: $45,9 \mu\text{g.L}^{-1}$; abr/15: $41,1 \mu\text{g.L}^{-1}$; jul/15: $38,4 \mu\text{g.L}^{-1}$). Os sólidos suspensos totais foram maiores em out/14 (prof. 1: $11,2 \text{mg.L}^{-1}$; prof. 2: $10,0 \text{mg.L}^{-1}$) e jul/15 (prof. 1: $9,8 \text{mg.L}^{-1}$; prof. 2: $9,7 \text{mg.L}^{-1}$). Nos meses de janeiro e abril de 2015 mantiveram-se similares, em concentrações próximas a $7,0 \text{mg.L}^{-1}$.

A relação N/P apresentou grandes variações entre as profundidades de cada mês, principalmente no último mês de coleta, jul/15 (prof. 1: 249; prof. 2: 78). Em out/14 e jan/15 a maior razão N/P foi na prof. 2, diferente de abr e jul/15, onde a prof. 1 mostrou-se maior.

A clorofila-*a* apresentou as maiores concentrações em jul/15 (prof. 1: $95,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ e prof. 2: $104,8 \mu\text{g.L}^{-1}$). Em out/14 e abr/15, observou-se menor variação entre as profundidades (out/14 – prof. 1: $77,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e prof. 2: $64,8 \mu\text{g.L}^{-1}$; abr/15 – prof. 1: $71,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ e prof. 2: $74,6 \mu\text{g.L}^{-1}$). Em jan/15 já se observou uma variação maior entre as profundidades, em um intervalo de $63,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 1, a $46,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ na prof. 2.

Os resultados da densidade total, em ind.mL^{-1} mostrou ser maior na prof. 1 nos meses de out/14 (prof. 1: $11.885 \text{ ind.mL}^{-1}$; prof. 2: $10.770 \text{ ind.mL}^{-1}$) e jan/15 (prof. 1: $16.007 \text{ ind.mL}^{-1}$; prof. 2: $14.395 \text{ ind.mL}^{-1}$), e na prof. 2 nos meses de abr/15 (prof. 1: $21.420 \text{ ind.mL}^{-1}$; prof. 2: $23.216 \text{ ind.mL}^{-1}$) e jul/15 (prof. 1: $30.190 \text{ ind.mL}^{-1}$; prof. 2: $36.621 \text{ ind.mL}^{-1}$). Importante observar que a densidade total da comunidade fitoplanctônica do Reservatório do Lobo demonstrou tendência de aumento ao longo das coletas, da ordem de três vezes (Figura 8).

Figura 8: Gráfico da densidade total de fitoplâncton (ind.mL⁻¹) nos meses de out/14, jan, abr e jul/2015, no Reservatório do Lobo, nas profundidades de 50% da RSFA (prof. 1) e 10% da RSFA (prof. 2).

A abundância relativa (%) da comunidade fitoplanctônica apresentou seis grupos durante os quatro meses de coleta. Os grupos encontrados nas amostras foram Cyanobacteria, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Chlamydomonadophyceae, Cryptophyceae e Dynophyceae (Figura 9). As espécies de cada grupo encontradas durante as coletas estão apresentadas na Tabela 6 em Apêndice.

O grupo Cyanobacteria apresentou maior abundância relativa em todas as coletas, e com uma porcentagem significativa em relação aos demais. À exceção de jan/15, em que a abundância das cianobactérias foi de cerca de 45%, out/14, abr e jul/15 tiveram uma média da abundância entre profundidades e meses de cerca de 80%. Entre estes três meses de coleta, a abundância variou de 77,5% a 83,0%.

Em out/14 e jan/15, a espécie de cianobactéria mais abundante foi *Cylindrospermopsis raciborskii* e em abr e jul/15, *Aphanizomenon* sp. No entanto, em janeiro, a abundância relativa de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi menor, com médias entre as profundidades de 72,6% (out/14) e 29,1% (jan/15). A espécie *Aphanizomenon* sp. manteve uma abundância relativa semelhante entre os meses de abr e jul/15 (72,5% e 75,0%, respectivamente) (Figura 9).

O segundo grupo de fitoplâncton que se destacou foi Chlorophyceae, principalmente em jan, abr e jul/15 (média entre profundidades: 33,3%, 18% e 14,8%). Neste grupo, as espécies mais abundantes foram *Actinastrum hantzschii* (26,1% em jan/15 e 14,6% em

abr/15) e *Kirchneriella obesa* (7,8% em jul/15). Em out/14, o grupo Bacillariophyceae mostrou a segunda maior abundância (7% e 6% nas profs. 1 e 2, respectivamente), sendo a terceira mais representativa entre os seis grupos encontrados. A espécie deste grupo que obteve maior abundância em out/14 foi *Aulacoseira granulata* (5,35%)

Chlamydomphyceae e Cryptophyceae apresentaram abundância relativamente baixa durante todas as coletas. Chlamydomphyceae chegou a apresentar nenhum indivíduo nas amostras da prof. 2 dos meses de jan e abr/15. Sua maior abundância foi no mês de jan/15 na prof. 1, com 6,5%. Os outros meses tiveram médias entre as profundidades de 2,5%, 1,9% e 2,6%, em out/14, abr e jul/15, respetivamente. Cryptophyceae teve uma maior abundância em out/14 na prof. 2 (4%), e sua menor abundância em jul/15, com 0,6% na prof. 2.

A classe Dynophyceae foi a menos abundante durante as coletas, não se apresentando nos meses de janeiro e abril de 2015 em ambas as profundidades, e no mês de jul/15 na primeira profundidade. Na segunda profundidade deste mesmo mês, a abundância foi de 1,2%, enquanto que nas duas profundidades de out/14 a abundância chegou a 1%.

Figura 9: Gráfico da abundância relativa (%) do fitoplâncton nos meses de coleta (out/14; jan, abr, jul/15) no Reservatório do Lobo, com a presença dos grupos Bacillariophyceae, Chlamydomphyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Cyanobacteria e Dynophyceae, nas profs. 1 e 2.

Assim como a abundância em termos de densidade, a contribuição relativa em termos de biovolume relativo foi maior por parte das cianobactérias (Figura10). No mês de julho, a cianobactéria apresentou-se com biovolume maior em relação aos outros meses de análise

(prof. 1: $15,2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$; prof. 2: $15,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$). Em out/14 e jan/15 as médias entre as profundidades foram semelhantes ($4 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ em out/14 e $4,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ em jan/15). Em abril a média do biovolume de cianobactéria para as duas profundidades foi de $12,8 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$.

Todos os outros grupos de fitoplâncton apresentaram biovolume menor que $1,5 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$. Chlorophyceae teve o maior biovolume em jul/15, na prof. 1 ($0,4 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$), e o menor em out/14 na prof. 1, com $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$. Bacillariophyceae obteve média das profundidades de $1,4 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, $0,6 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, $0,4 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ nos meses de out/14, jan, abr e jul/15, respectivamente.

Nos meses de out/14 e abr/15, o grupo Chlamidophyceae mostrou uma média entre as profundidades de $0,03 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, respectivamente. Nos meses de jan e jul/15, as médias entre as profundidades foram semelhantes, com $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$. Para a classe Cryptophyceae, observou-se pouca diferença entre as profundidades dos meses de out/14 (prof. 1: $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$; prof. 2: $0,2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$) e jul/15 (prof. 1: $0,3 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$; prof. 2: $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$). Em jan/15 a variação entre as profundidades também foi pequena, de $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ da prof. 1 a $0,2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ da prof. 2, e em abr/15 não houve variação, sendo $0,1 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ nas duas profundidades.

Figura 10: Biovolume ($\text{mm}^3.\text{L}^{-1}$) dos grupos Cyanobacteria, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Chlamydomonadales, Cryptophyceae e Dynophyceae, encontrados no Reservatório do Lobo durante o período de estudo (outubro/2014, janeiro, abril e julho/2015).

2.2.4 Resultados da assimilação

Os resultados da assimilação das formas nitrogenadas pela comunidade fitoplancônica no reservatório (Figura 11) mostraram preferências diversas entre as formas nitrogenadas durante todos os meses de amostragem.

Em geral, a forma preferencialmente assimilada foi o amônio (NH_4^+), nas duas profundidades nos meses de jan e jul/2015 (jan – prof. 1: $31,2 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, prof. 2: $16,3 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; jul – prof. 1: $37,0 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, prof. 2: $71,7 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), e na primeira profundidade de out/14 ($0,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

O nitrato obteve uma maior assimilação pelo fitoplâncton no mês de abr/15, porém, só na primeira profundidade ($44,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Na segunda profundidade deste mês, a ureia apresentou maior assimilação ($46,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A ureia também apresentou uma assimilação maior que as outras formas nitrogenadas no mês de out/14 na segunda profundidade, com $1,3 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Nitrato apresentou uma média entre as profundidades de $0,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em out/14 e $38,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em abr/15, variando em $0,2$ e $0,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nas médias entre as profundidades em jan e jul/15, respectivamente.

As médias entre as profundidades para a assimilação do amônio foram de $0,6$, $23,7$, $13,6$ e $54,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nos meses de coleta out/14, jan, abr e jul/15, respectivamente.

A ureia apresentou um média maior no mês de abr/15 ($43,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), e menor média da assimilação em out/14, com $0,8 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, seguido de $1,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em jan/15 e $7,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em jul/15.

Figura 11: Assimilação ($\mu\text{g N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) das formas nitrogenadas (nitrato, amônio e ureia) pelo fitoplâncton do Reservatório do Lobo, nas coletas de outubro de 2014, janeiro, abril e julho de 2015, nas profundidades de 50% (prof. 1) e 10% (prof. 2) da RSFA.

Entre as profundidades houve uma pequena variação das formas nitrogenadas, como se pode observar no gráfico da Figura 11. Observando este gráfico, pode-se sugerir que não há um padrão da assimilação das formas de nitrogênio estudada pela comunidade fitoplanctônica. Contudo, parece haver preferência pelo amônio. Além disso, houve tendência geral de aumento das taxas de assimilação ao longo do tempo, de out/14 a jul/15, como pode ser verificado no gráfico da Figura 12.

Em out/14 foi apenas $1,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ assimilado de todas as três formas nitrogenadas pelo fitoplâncton, seguido de $25,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em jan/15. Abr/15 foi o mês em que ocorreu maior assimilação total pelo fitoplâncton ($95,2 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), apresentando uma diminuição em jul/15, com $62,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ assimilado no total.

Figura 12: Assimilação total do nitrogênio nos meses de out/14, jan, abr e jul/15, somando as três formas nitrogenadas (nitrato, amônio e ureia) pelo fitoplâncton do Reservatório do Lobo.

2.2.5 Resultados estatísticos

De acordo com a ANOVA, houve variação temporal significativa das taxas de assimilação de nitrato, amônio e ureia ($p < 0,05$) ao longo das diferentes coletas. No entanto, não houve variação significativa de tais taxas quando o fator “profundidade de coleta” (50% versus 10% da RSFA) foi considerado: nitrato ($p = 0,874$), amônio ($p = 0,920$) e ureia ($p = 0,917$). O teste de correlação de Spearman entre as taxas de assimilação das formas nitrogenadas e as variáveis bióticas e abióticas da água apresentou alguns coeficientes significativos ($p < 0,05$) (Tabela 3). Os coeficientes sugeriram relação positiva entre a assimilação de nitrato e ureia com o pH e com as concentrações de nitrato na água. Houve correlação negativa entre a assimilação de amônio e as concentrações de oxigênio dissolvido. Maiores taxas de assimilação de amônio estiveram associadas a menores relações N:P ($\rho = -0,548$) e a maiores densidades fitoplanctônicas ($\rho = 0,786$).

Tabela 3: Teste de correlação de Spearman (ρ) entre as taxas de assimilação de nitrato (Ass. NO_3), amônio (Ass. NH_4) e ureia (Ass. $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) pelo fitoplâncton e as variáveis bióticas e abióticas do Reservatório do Lobo (SP) entre outubro/2014 e julho/2015, incluindo temperatura (T), pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), radiação solar fotossinteticamente ativa (RSFA), NTK (nitrogênio total Kjeldahl), nitrato (NO_3), amônio (NH_4), ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), fósforo total (PT), sólidos suspensos totais (SST), relação nitrogênio total:fósforo total (NT:PT), clorofila-*a* e densidade fitoplanctônica. As correlações estatisticamente significativas foram marcadas com asterisco ($p < 0,05$)

Variável	Ass. Nitrato (NO_3)	Ass. Amônio (NH_4)	Ass. Ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)
T	0,084	– 0,180	– 0,180
pH	0,826*	– 0,036	0,743*
OD	– 0,309	– 0,952*	– 0,214
CE	0,436	0,521	0,073
RSFA	– 0,190	– 0,381	– 0,548
NTK	– 0,381	0,286	– 0,119
NO_3	0,952*	0,333	0,738*
NH_4	– 0,190	0,690	– 0,381
$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0,838*	0,275	0,682
PT	– 0,190	– 0,167	– 0,238
SST	– 0,476	– 0,429	– 0,119
NT:PT	0,191	– 0,548*	0,429
Clorofila- <i>a</i>	0,095	0,286	0,309
Densidade fito	0,643	0,786*	0,619
Ass. NO_3	-	0,333	0,809*
Ass. NH_4	0,333	-	0,214
Ass. $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0,809*	0,214	-

2.3 DISCUSSÃO

Os perfis verticais mostraram que o reservatório se apresentou em estado de mistura da água, sem estratificação térmica, assim como foi observado por Angelini e Petrere (2000). Isto pode estar associado à velocidade dos ventos da área (DAVIS; KOOP, 2006), além de se tratar de um reservatório relativamente raso, o que segundo Dodds e Whiles (2002) contribui para a mistura da coluna de água, também verificado por Cunha e Calijuri (2011a). Esta desestratificação permite uma maior disponibilidade de nutrientes em toda a coluna de água

aos microrganismos da zona eufótica (DAVIS; KOOP, 2006), onde as amostras foram coletadas.

Assim como foi colocado por Rivera et al. (2007), as características limnológicas observadas no Reservatório do Lobo, em relação às variáveis bióticas e abióticas da água, sugerem incremento contínuo do seu estado trófico e suscetibilidade à eutrofização. Para Tundisi et al. (2015), o Reservatório do Lobo já se encontra eutrofizado, devido a várias pesquisas científicas realizadas no local demonstrando o declínio da qualidade da água. O processo acelerado da eutrofização e as alterações observadas nas variáveis físicas, químicas e biológicas da água do reservatório já foram caracterizados por outros pesquisadores (MOTHEO, 2005; PEREIRA, 2005; PASSERINI, 2010).

Com os resultados apresentados, foi observado entre os meses de out/14 e jul/15 um decaimento do OD em cerca de 60% referente à média das profundidades. No entanto, esta diminuição não foi constante, apresentando um aumento no mês de abr/15, e voltando a diminuir no último mês de coleta. No estudo realizado no inverno de 2003, foram observadas concentrações de OD, em uma profundidade de 10 m, de 6,5-9,5 mg.L⁻¹ (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2013). Isso sugere a significativa deterioração ocorrida ao longo dos últimos dez anos no Reservatório do Lobo para o oxigênio dissolvido, caracterizando uma possível piora da qualidade da água.

A diminuição do oxigênio dissolvido em jul/15, o que de certa forma não seria esperado em função da maior solubilidade deste gás em temperaturas menores, pode estar relacionada principalmente ao despejo de esgoto doméstico, pelos inúmeros condomínios e residências privadas no entorno do reservatório, provocando a demanda de oxigênio para estabilização e decomposição da matéria orgânica. As maiores concentrações de sólidos suspensos totais em comparação aos meses de jan e abr/15 também podem ser consideradas. Estas concentrações elevadas, ao aumentarem a turbidez da água, diminuem a transparência da mesma, o que pode limitar o processo de fotossíntese, e consequentemente diminuir o oxigênio dissolvido.

O pH do reservatório esteve sempre próximo da neutralidade, variando de 6,7 a 8,7, apresentando sua maior média entre as profundidades no mês de abr/15 (8,6), e menor média em jan/15 (6,7). Estes valores também foram encontrados em estudos apresentados por Tundisi e Matsumura-Tundisi (2013), realizados em agosto de 2003. Isto mostra que o pH não sofreu alterações ao longo dos anos, diferente de outras variáveis.

Os valores próximos da neutralidade beneficiam a vida aquática, e quando mais alcalinos, sugerem a ocorrência de proliferação de algas (VON SPERLING; FERREIRA;

GOMES, 2008). Como foi observado, os meses de abr e jul/15 apresentaram uma maior densidade de fitoplâncton, juntamente com maiores valores de clorofila-*a*, indicando um aumento da comunidade fitoplanctônica no reservatório. Logo, o pH pode ser indicador deste aumento, assim como é mostrado no estudo de Gemelgo, Mucci e Navas-Pereira (2009) e Cunha e Calijuri (2011b).

No mês em que houve maior densidade total e concentração da clorofila-*a* (jul/15), foi também o mês em que os SST apresentaram o segundo maior valor, sendo out/14 o mais elevado. Isto contradiz o que foi exposto por Molisani et al. (2010) e Cunha e Calijuri (2011b), que observaram uma relação inversa entre a matéria em suspensão na água com a densidade total fitoplanctônica e a clorofila. Infere-se, portanto, que os SST nos meses estudados apresentaram, majoritariamente, origem orgânica.

As variáveis clorofila-*a* e densidade fitoplanctônica contribuem para determinar a biomassa de fitoplâncton no ambiente aquático, podendo ser relacionadas. Esta relação foi observada neste trabalho, apresentando-se maiores ao longo dos meses, assim como no estudo de Molisani et al. (2010). No entanto, esta relação deve ser estudada com cuidado, pois segundo Cunha, Calijuri e Lamparelli (2013), alguns grupos fitoplanctônicos como dinoflagelados e cianobactérias podem conter outros pigmentos fotossintéticos além da clorofila-*a*, apresentando uma correlação não significativa entre estas variáveis.

Mais do que a densidade total da comunidade de fitoplâncton, a clorofila-*a* é em muitos trabalhos relacionada às concentrações de nutrientes disponíveis da coluna de água, a intensidade de luz solar e temperatura (CHELLAPPA; BORBA; ROCHA, 2008; CUNHA; CALIJURI, 2011b; FELIP; CATALAN, 2000; MOLISANI et al., 2010). Felip e Catalan (2000) destacaram que muitos fatores internos e externos influenciam a clorofila-*a*, tais como composição taxonômica do fitoplâncton, condições fisiológicas das células, temperatura, concentração de nutrientes e intensidade luminosa. A diminuição da intensidade luminosa induzida por um aumento da biomassa, relativa a um aumento dos nutrientes na coluna de água misturada, leva a mudanças no predomínio de espécies e ao desenvolvimento máximo da clorofila. Eles observaram, através da diminuição da intensidade luminosa, mudanças tanto no conteúdo de clorofila nas células quanto uma redução do tamanho das células, além da mudança de dominância de espécies e grupos fitoplanctônicos.

Os resultados deste trabalho mostraram que em abr e jul/15 este padrão apresentado por Felip e Catalan (2000) também foi encontrado, com menores disponibilidades de RSFA coincidindo com as maiores concentrações de clorofila-*a*, além da maior concentração das formas nitrogenadas serem encontradas neste período mais frio e de estiagem. Chellappa,

Borba e Rocha (2008) observaram que as concentrações de clorofila-*a* foram maiores no período de seca, o que também ocorreu no presente estudo.

A clorofila também é relacionada ao biovolume, assim como observado que microrganismos com células menores apresentam uma relação mais significativa com o conteúdo de clorofila do que organismos com células maiores (MALONE, 1980).

Da mesma forma como no estudo de Felip e Catalan (2000), foi observado no presente estudo um biovolume maior do grupo Cyanobacteria no mês com menor RSFA (jul/15). Comparando as profundidades, nos meses de jan e abr/15, o biovolume deste grupo fitoplanctônico se apresentou maior na prof. 2 do que na prof. 1. Em jul/15 o biovolume das duas profundidades foi bem próximo. Logo, sugere-se que a intensidade luminosa pode ser um fator preponderante para a estruturação do biovolume das espécies.

As concentrações de nitrato, ureia e fósforo total foram elevadas nos meses de estiagem, em out/14, abr e jul/15. Isto pode ser devido à baixa precipitação atmosférica, diminuindo os efeitos de diluição das concentrações destes nutrientes. No entanto, as concentrações de amônia, também elevadas em jul/15, foram maiores em jan/15, período chuvoso. Apesar de a precipitação favorecer a diluição das concentrações de nutrientes na água, sugere-se que uma elevada carga de matéria orgânica oriunda de despejo de esgoto doméstico tenha acontecido neste período, carregada pelas chuvas através de seus tributários, chegando próximo a barragem ainda em elevadas concentrações.

Silva, Train e Rodrigues (2005), em estudo desenvolvido em reservatórios do Rio Iguaçu (PR), observaram uma maior biomassa do grupo de cianobactérias em reservatórios que apresentaram uma razão N/P acima de 58. A abundância relativa de cianobactéria neste estudo foi sempre maior que os outros grupos encontrados no reservatório. Em jul/15, a abundância foi próxima de 80%, assim como a razão N/P também foi maior neste mês (média das profs.: 164). No entanto, em out/14 a abundância relativa do grupo Cyanobacteria também foi elevada (aproximadamente 80%), mesmo sob uma relação N/P menor que nos meses seguintes (média das profs.: 40). Isto implica que outras variáveis, além da composição relativa das formas de nitrogênio e fósforo, também interferem na estrutura da comunidade fitoplanctônica.

Calijuri, Dos Santos e Jati (2002) apresentam que a ação conjunta da precipitação com a velocidade dos ventos contribui significativamente para alterações na estrutura desta comunidade. No caso da cianobactéria, que se mostrou mais abundante em todas as coletas, o mês em que se mostrou menor (cerca de 45%), em jan/15, foi também o mês em que a RSFA,

juntamente com as temperaturas do ar e da água, a precipitação, a velocidade dos ventos e a concentração de amônia foram maiores, e o pH, SST, clorofila-*a* e biovolume foram menores.

Alguns trabalhos mostraram que as cianobactérias estão relacionadas a altas concentrações de nitrogênio reduzido, tal como o amônio (BERG et al., 2003). Reynolds et al. (2002) ainda reportaram que este grupo de fitoplâncton encontra-se tipicamente em reservatórios e lagos quentes e eutróficos, e que algumas espécies, como *Aphanocapsa* sp. e *Anabaena* sp., são adaptadas a elevadas temperaturas, acima de 23°C e com grande intensidade luminosa. Silva, Train e Rodrigues (2005) encontraram uma relação com os maiores valores de pH e menor transparência da água na presença de florações de cianobactérias.

No presente estudo, o grupo Cyanobacteria teve uma relação inversamente proporcional à concentração de amônia, diferentemente do estudo de Berg et al. (2003), e diretamente proporcional ao pH, como encontrado por Silva, Train e Rodrigues (2005). Possivelmente, estas diferenças estão relacionadas às espécies encontradas em cada caso. Cada espécie pode apresentar características distintas dentro do mesmo grupo funcional.

Em out/14 e jan/15, a *Cylindrospermopsis raciborskii* foi a cianobactéria mais abundante. Suas características indicam, de acordo com estudos já realizados em reservatórios subtropicais (HUSZAR et al., 2000; SOUZA; CARVALHO; TRUZZI, 1998; TUCCI; SANT'ANNA, 2003), maior preferência por elevadas temperaturas da água, turbidez, pH, oxigênio dissolvido e elevada precipitação, além de alta afinidade com nitrogênio em sua forma reduzida (amônio) e por fósforo. Em geral, todas estas variáveis condizem com os meses em que esta espécie esteve abundante no Reservatório do Lobo.

Nos meses com as temperaturas mais baixas (abr e jul/15), nos quais as concentrações de ureia foram maiores, a cianobactéria *Aphanizomenon* sp. apresentou maior abundância. Segundo estudos de Berman (1997) no Lago Kinneret e Berman e Chava (1999) em culturas isoladas não axênicas em laboratório de amostras do Lago Kinnert, esta cianobactéria apresentou maior crescimento na utilização de nitrogênio orgânico dissolvido (principalmente ureia). Este estudo de Berman (1997) também sugere que a composição e dinâmica do NOD na coluna de água interfere na composição da comunidade fitoplanctônica. Isto foi verificado no presente estudo, em que a abundância relativa da comunidade fitoplanctônica foi parcialmente modificada com o aumento da concentração de ureia ao longo dos períodos de coleta. Indicando, desta forma, que a concentração do nitrogênio orgânico pode ser um dos fatores que influenciam a estruturação do fitoplâncton na coluna de água.

Assim como *Aphanizomenon* sp., a espécie do grupo Chlorophyceae *Actinastrum hantzschii* também apresentou maior desenvolvimento com maior disponibilidade de fontes orgânicas de nitrogênio (BERMAN; CHAVA, 1999). Foi o que ocorreu no mês de abr/15, com as concentrações maiores de ureia, e maior abundância desta espécie.

O grupo Bacillariophyceae foi o segundo mais abundante em out/14, com a espécie *Aulacoseira granulata* com maior abundância entre as espécies deste grupo. Algumas características encontradas para esta espécie apresentar-se dominante na coluna de água em out/14 foram: temperatura da água mais baixa (BORGES; TRAIN; RODRIGUES, 2008); alta disponibilidade de RSFA (BOVO-SCOMPARIN; TRAIN, 2008); maior densidade no período de seca (MOURA et al., 2007; NABOUT; NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006); condições da coluna de água totalmente misturada e alta turbidez, devido a maior concentração de SST (BORGES; TRAIN; RODRIGUES, 2008; BOVO-SCOMPARIN; TRAIN, 2008; WANG et al., 2011).

Por fim, a assimilação das três formas nitrogenadas pela comunidade fitoplanctônica não apresentou um padrão durante um ciclo sazonal. Em janeiro e julho de 2015, a forma nitrogenada mais assimilada foi o amônio, meses em que sua concentração foi mais elevada.

Normalmente, o amônio é a forma nitrogenada preferencialmente assimilada pela comunidade fitoplanctônica, por apresentar uma vantagem energética, demandando menor energia para ser assimilado do que o nitrato, por exemplo (MULHOLLAND; LOMAS, 2008).

No mês de janeiro, a temperatura e RSFA mostraram-se mais elevadas e a assimilação do amônio foi menor. Em jul/15 estas variáveis foram menores, e a assimilação do amônio maior, sugerindo uma possível influência da temperatura e RSFA sobre a comunidade fitoplanctônica no processo de assimilação. Esta variação temporal pôde ser explicada pelo teste estatístico ANOVA, apresentando uma variação temporal significativa das taxas de assimilação de nitrato, amônio e ureia ao longo das coletas.

É sugerido, por conseguinte, que as variáveis temperatura e RSFA influenciam diretamente a assimilação das formas nitrogenadas pelo fitoplâncton, da mesma forma que podem influenciar indiretamente, através das alterações provocadas na estrutura da comunidade fitoplanctônica (e.g. alterações na fotossíntese).

No estudo de Anderson e Roels (1981), realizado com a diatomácea *Chaetoceros curvisetus* isolada da Estação Artificial de St. Croix, Ilhas Virgens, EUA, não foi observada influência da intensidade de luz na assimilação do nitrato. Tanto em condição de escuro como de alta intensidade luminosa ($0 - 2000 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) não houve uma diminuição da assimilação do nitrato, apresentando uma média de assimilação para todas as variações da RSFA de 0,269

$\mu\text{g-at}(\text{NO}_3\text{-N}) \mu\text{g}^{-1}\text{-at proteína-N.h}^{-1}$. Já no estudo de MacIsaac e Dugdale (1972), realizado em ambiente marinho, foi observado que a luz pode limitar a assimilação do nitrato, no entanto, a concentração de nutrientes também se apresenta como um fator limitante. À medida que as concentrações de nitrato diminuem, a assimilação do nitrato na parte superior da zona eufótica torna-se limitada. Neste estudo é mostrado, ainda, que em zonas eufóticas a assimilação do nitrato ocorre mais lentamente.

Yin, Harrison e Dortch (1998) também apresentam uma influência da luz na assimilação de nitrato e amônio. Em condições com $150 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve maior inibição da assimilação do nitrato pelo amônio. Nesta intensidade, na ausência de amônio, a assimilação do nitrato foi cerca de $300 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, já em concentração de $5 \mu\text{M}$ de NH_4^+ , a assimilação foi próxima a $100 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No entanto, a assimilação do nitrato não sofreu inibição por parte das concentrações de amônio em condições de $3 \mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No presente estudo, esta relação com a RSFA e a assimilação de nitrato e amônio também pode ser observada, pois em abr/15, apresentando uma das menores radiações entre as coletas (média de $70 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ocorreu maior assimilação do nitrato em comparação a assimilação de amônio (médias de $38 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para NO_3^- e $13 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para NH_4^+).

No estudo de Lomas e Glibert (1999), nas Baías de Chesapeake e Delaware (EUA), com amostras de diatomáceas, eles obtiveram em todos os experimentos com manipulação da temperatura ($5 - 30^\circ\text{C}$) uma mesma tendência na diminuição das taxas de assimilação de nitrato com o aumento da temperatura, enquanto que as taxas de assimilação de amônio e ureia apresentaram aumento com o aumento da temperatura. A assimilação do nitrato diminuiu em média 46% com temperaturas elevadas, e a assimilação de amônio e ureia aumentaram em média 179% e 86%, respectivamente. Esta relação com a temperatura não foi bem observada no presente estudo, como foi com a RSFA. Provavelmente, outros fatores apresentaram influência mais significativa na assimilação das três formas de nitrogênio do que a temperatura.

Entre as profundidades analisadas não houve grandes alterações na assimilação das formas nitrogenadas, como também foi mostrado na estatística ANOVA. Anderson e Roels (1981) observaram que a taxa de assimilação de nitrato pela espécie *Chaetoceros curvisetus* foi provavelmente máxima na zona fótica, uma vez que em 1% da luz incidente na coluna de água, representada por $26 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a assimilação do nitrato foi metade de seu máximo. Portanto, este estudo serve como exemplo que dentro da zona eufótica a assimilação não apresenta grandes variações.

Sugere-se que a presença mais abundante da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* foi fundamental para a maior assimilação de amônio em janeiro, como já mencionado por Tucci e Sant'Anna (2003). Uma possível justificativa para a maior assimilação do amônio no mês de jul/15, neste estudo, pode ser devido às concentrações também elevadas de ureia neste mês (média de $107 \mu\text{g.L}^{-1}$). Isto porque o enriquecimento da ureia na coluna de água pode se tornar rapidamente fonte de enriquecimento para o amônio, através da hidrólise da ureia (GLIBERT et al., 2016). Com isso, mais da forma nitrogenada amônio estaria disponível para a assimilação do fitoplâncton.

A correlação de Spearman também mostrou uma relação positiva entre a assimilação de amônio e a densidade fitoplanctônica. Jul/15 apresentou a maior assimilação de amônio e maior densidade fitoplanctônica, concordando com o que foi apresentado no trabalho de Glibert et al. (2016), que mostram um maior crescimento do fitoplâncton em resposta às concentrações de amônio em comparação às de nitrato.

Muitos trabalhos já demonstraram que o amônio pode ser um inibidor potencial na assimilação principalmente do nitrato, mas também pode inibir a assimilação da ureia (BERMAN et al., 1984; SEEYAVE et al., 2013). Em abril, para as duas profundidades, tanto o nitrato quanto a ureia foram assimilados, diferentemente do amônio que foi pouco assimilado. Esta preferência da comunidade fitoplanctônica em assimilar mais nitrato e ureia pode ser devido a maior concentração destas formas nitrogenadas encontradas neste mês, e a menor concentração de amônio, da mesma forma que observado por MacIsaac e Dugdale (1972) e Xu et al. (2012). Esta correlação também foi sugerida no teste de Spearman, obtendo uma relação positiva entre as assimilações de nitrato e ureia com a maior concentração do nitrato.

Xu et al. (2012) mostraram em estudo realizado em rios de Hong Kong que na depleção da assimilação de amônio, a ureia se torna a fonte nitrogenada mais assimilada pelo fitoplâncton, da mesma forma como a maior assimilação de nitrato ocorre com a diminuição da assimilação de amônio.

Neste estudo não foi observada estatisticamente uma correlação significativa entre a assimilação de ureia e sua concentração ambiental. Da mesma forma, não houve relação entre as mesmas no trabalho realizado por Twomey, Piehler e Paerl (2005). No entanto, a maior assimilação da ureia (aprox. $3 \mu\text{g at N.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ocorreu quando a concentração desta forma nitrogenada foi menor na coluna de água (aprox. $8 \mu\text{g at N.L}^{-1}$), diferentemente do ocorrido no presente trabalho, em que a concentração em abr/15 (média de $82 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi maior, juntamente com a maior assimilação da ureia (média de $43 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Resultado

semelhante foi observado no estudo de Lomas et al. (2002), em que a maior concentração de ureia (aprox. $0,9 \mu\text{g.L}^{-1}$) esteve correlata a maior assimilação de ureia ($0,19 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Além disso, a mudança da comunidade fitoplanctônica pode ser um fator determinante para esta maior assimilação de ureia e nitrato em abril. A cianobactéria *Aphanizomenon* sp. e a clorofícea *Actinastrum hantzschii* conseguem se desenvolver melhor na utilização de nitrogênio orgânico dissolvido (BERMAN; CHAVA, 1999; BERMAN, 1997). Consequentemente, pode-se sugerir que esta preferência por nitrogênio orgânico, no caso, a ureia, assim como uma maior concentração desta, favoreceu sua maior assimilação neste mês.

Já no mês de outubro de 2014 não houve assimilação considerável para nenhuma das formas nitrogenadas estudadas. Isto pode estar de acordo com os menores valores das concentrações de nitrato, amônio e ureia, assim como ter sido o mês com menor densidade e biovolume da comunidade fitoplanctônica. Como apresentado na estatística de correlação de Spearman, há uma relação positiva na assimilação de nitrato e ureia com maior concentração de nitrato, além disso, há uma maior assimilação de amônio com maior densidade fitoplanctônica. Estas relações não foram observadas no mês de out/14.

Somando a assimilação das três formas nitrogenadas, foi possível observar uma tendência a aumentar ao longo das coletas. De out/14 a abr/15 houve um grande aumento (na faixa de $1,5$ a $95,2 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), seguido de um leve decaimento para $62,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em jul/15. Esta maior assimilação total em abril provavelmente foi devido às três formas nitrogenadas serem assimiladas, comparando os outros meses, em que ou somente uma forma nitrogenada foi preferencialmente assimilada ou nenhuma forma foi assimilada.

Nossos resultados confirmam os resultados de Gilbert et al. (2016), de que o processo de assimilação de nitrogênio pela comunidade fitoplanctônica está relacionado ao grau de trofia do Reservatório do Lobo, mostrando um aumento junto com a crescente elevação da densidade fitoplanctônica, clorofila-*a* e concentração de nutrientes, descrevendo um ambiente eutrofizado.

3. CAPÍTULO 3: EXPERIMENTOS COM CULTURAS LABORATORIAIS

Este capítulo descreve a metodologia utilizada para o cumprimento do segundo objetivo específico desta pesquisa, que foi avaliar a assimilação de nitrogênio em culturas laboratoriais, com diferentes temperaturas e intensidades luminosas. Além disso, o capítulo apresenta resultados obtidos e a sua discussão.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Obtenção de culturas isoladas de amostra ambiental

Nos experimentos com culturas laboratoriais, foram utilizadas duas culturas isoladas e/ou axênicas, uma de cianobactéria e outra de clorofícea, de amostra ambiental do Reservatório do Lobo.

Para isso, estas amostras foram enriquecidas com três meios líquidos diferentes (WC, BG-11 e ASM-1), com seus respectivos protocolos em anexo (ANEXO A, B, e C), nas diluições de 25%, 50% e 75%. Estas diluições foram realizadas para que a diversidade de espécies fosse observada, e então fosse possível escolher pela melhor diluição para a continuação do processo de axenização. As amostras enriquecidas nos meios e nas diluições foram aclimatadas em sala de cultivo a 24°C, 60 $\mu\text{mol fóton.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, com fotoperíodo 12h/12h (SANTOS, 2013).

Após um período de enriquecimento destes meios, realizou-se o plaqueamento por espalhamento nos meios sólidos WC, BG-11 e ASM-1. Nas placas, foram colocados 10 μL e 50 μL dos meios líquidos enriquecidos. Em seguida ao tempo de crescimento das culturas nas placas, foi realizada a verificação das mesmas no microscópio invertido para melhor conhecimento da comunidade presente no reservatório. Esta verificação serviu para determinar qual o meio e a diluição que mais favoreceram o crescimento das culturas, para novos plaqueamentos e repiques.

Na tentativa de isolar as espécies desejadas, *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus* sp., as colônias ou organismos visualizados no microscópio foram transferidos para novas placas pelo método de estriamento com uma alça de platina e pelo método de espalhamento com uma alça Drigalsky, sempre dentro de capela para evitar contaminação. Este processo foi realizado sucessivamente até a obtenção de colônias limpas.

Em seguida, outro isolamento foi feito, assim que se teve certeza de haver apenas uma espécie da colônia coletada, utilizando agulha estéril. Desta forma, o material foi transferido para tubos de cultura, no meio definido e com substância de cicloheximida e antibiótico para axenização da cianobactéria e da clorofícea, respectivamente. Estes tubos foram aclimatados em sala de cultivo com as especificações já citadas ou deixados em incubadoras sem fotoperíodo. Definiu-se, neste momento, a utilização do meio BG-11 e WC para o processo de isolamento das espécies.

Ao longo do processo, foi verificado um melhor crescimento das espécies no meio WC, sendo o definitivo até o final do processo de isolamento. Com as espécies crescendo nos tubos de ensaio, foram realizados repiques de novos tubos com 10% de inóculo para completar 10 mL no tubo com meio WC.

3.1.2 Preparo do Meio de Cultivo

Para as culturas já isoladas de *Microcystis aeruginosa* e de *Scenedesmus* sp. (neste último caso, em condições axênicas), todos os procedimentos necessários para o preparo do meio de cultivo foram iguais.

Para a realização do experimento fatorial, foi necessário determinar a quantidade de meio de cultivo WC necessário para tal. Definiu-se que para o experimento fatorial seriam utilizados apenas 50 mL em cada frasco para a filtração. Como será apresentado no item 3.1.5, foram 81 frascos para cada espécie isolada, totalizando um volume de amostra mínimo de 4,05 L para cada espécie, optando-se pelo volume final de 5L. Após a obtenção das culturas isoladas, que se encontravam em tubos de ensaio com 10 mL, foram feitos repiques objetivando o aumento deste meio até chegar aos 5 L desejados. Foram feitos três repiques para ambas as espécies, como mostrado no esquema da Figura 13.

Figura 13: Esquema de repiques para o aumento das culturas de *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus* sp. em meio WC.

O tempo de repique mudou entre as espécies, sendo de 7 em 7 dias o repique da clorofícea, e de 14 e 14 dias para o repique da cianobactéria. Ao todo, foram feitos quatro meios WC de 5 L, sendo dois, uma para cada espécie, para a realização das análises diárias para a obtenção da curva de crescimento, que será descrito no item 3.1.3. Os outros dois meios foram feitos para a realização do experimento fatorial, explicado no item 3.1.5.

A cultura isolada em tubos de ensaio com 10 mL apresentava o meio WC de acordo com o protocolo disponível no Anexo A. Em seu protocolo original (GUILLARD; LORENZEN, 1972), a única forma de nitrogênio disponível no meio é nitrato, portanto, algumas modificações foram realizadas a partir do primeiro repique.

Para que este experimento apresentasse alguma semelhança com o que é encontrado em amostras ambientais, foi determinado que seria necessário fazer um meio em que as três formas nitrogenadas (nitrato, amônio e ureia) em estudo estivessem disponíveis para o processo de assimilação. Assim, definiu-se que as três formas nitrogenadas teriam a mesma concentração adicionada no preparo do meio.

Para obter a concentração destas formas nitrogenadas, primeiro foi preciso verificar a massa molar do componente que apresenta nitrogênio em sua forma do meio WC. O nitrogênio neste meio encontra-se no componente NaNO_3 (nitrato de sódio) e sua massa molar é 85g, sendo 14g só para o nitrogênio.

Realizando uma divisão simples da massa de nitrogênio, foi determinado que cada forma nitrogenada (nitrato, amônio e ureia) deveria apresentar uma concentração do meio WC de 4,67 mg.L⁻¹.

Um segundo passo foi verificar a quantidade a ser adicionada em mL de cada forma – N. Feito o preparo das soluções destas formas nitrogenadas devidamente esterilizadas por filtração em 0,22 µm e realizada as devidas contas, foi determinado que seria adicionado no meio WC (Figura 14):

Nitrato	1,67 mL para 5 L de meio WC
Amônio	10 mL para 5 L de meio WC
Ureia	5 mL para 5 L de meio WC

Figura 14: Quantidade em mL a ser adicionada no meio WC das soluções de nitrato (NaNO₃), amônio (NH₄Cl) e ureia (CH₄N₂O) para a realização do experimento fatorial de assimilação das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus* sp.

Após o preparo dos meios, estes sempre foram autoclavados e feito o repique pelo menos um dia após seu preparo, em capela com fluxo de ar.

A solução de nitrato foi adicionada no momento do preparo do meio WC, e as soluções de ureia e amônio foram adicionadas no momento do repique do meio de cultura para que não houvesse modificações em suas formas durante o tempo na autoclave.

3.1.3 Análises laboratoriais: clorofila-*a*, sólidos e absorbância

Foi imprescindível a realização de análises diárias de clorofila-*a*, sólidos e absorbância para obter uma curva de crescimento das culturas isoladas, e desta forma, determinar o melhor dia para a realização do experimento fatorial, ou seja, o dia em que as culturas estivessem na metade da exponencial de suas curvas de crescimento.

Para a realização diária das análises de clorofila-*a*, sólidos e absorbância, foi feita a coleta de um volume necessário do meio de cultura crescendo em um galão de 5 L, em

aeração, com fotoperíodo de 12h/12h, a 24°C e com $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa (Figura 15).

Figura 15: Meio de cultura em período de crescimento em galão com 5 L de meio WC modificado, aerando, com $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz, a 24°C e em fotoperíodo de 12h/12h.

Para que não houvesse contaminação das culturas já isoladas no galão, foi feita a coleta sempre dentro de uma capela, com fluxo de ar ligado e utilizando o bico de Bunsen para esterilização da saída do líquido.

As análises finais de clorofila-*a* e sólidos foram realizadas da mesma maneira que decorrido no item 2.1.6.

A análise da absorbância foi realizada no espectrofotômetro Hach®, em onda de comprimento de 540 nm.

3.1.4 Análise de Densidade e Biovolume

Para as análises de densidade e biovolume foi determinada a utilização de amostras com os traçadores antes da incubação e após o período de uma hora incubadas, para verificar se houve alguma diferença durante este tempo.

De cada condição realizada, descrita no item 3.1.5, e para cada forma nitrogenada, foi retirado dos frascos com 50 mL, 1 mL antes e depois da incubação, e dispostos em eppendorf com 1% de lugol. No total foram 54 amostras de *Scenedesmus* sp. e 54 de *Microcystis aeruginosa* para as análises de densidade e biovolume.

Foi utilizada para estas análises uma câmara Fuchs Rosenthal em microscópio ótico invertido, com câmera acoplada, servindo para a contagem da densidade, que é realizada em 16 quadrados menores com volume de 0,0125 μL .

O total de células contadas nestes 16 quadrados é utilizado para o cálculo da densidade em ind.mL^{-1} , apresentado na Equação 15.

$$D = \frac{n^{\circ} \text{ de células (ind)}}{n^{\circ} \text{ de quadrados} \times 0,0125 (\mu\text{L})} \times 10^3 \quad (15)$$

Onde:

D = densidade em ind.mL^{-1}

Nº de células = total de células contadas nos 16 quadrados menores

Nº de quadrados = 16 quadrados menores

0,0125 μL = volume do quadrado menor

O biovolume foi estimado de acordo com a forma geométrica mais semelhante às células das espécies analisadas. No caso da *Scenedesmus* sp., a forma geométrica utilizada foi esferoide, e para *Microcystis aeruginosa*, a esfera (HILLEBRAND et al., 1999).

Para o cálculo do biovolume, foi obtido o volume de 30 células de ambas as espécies em cada amostra. Destes volumes foi feito uma média para cada amostra, e utilizado esta média multiplicada com a densidade para a obtenção do biovolume em $\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$.

Das amostras de *Scenedesmus* sp. a equação do volume das células equivalentes a um esferoide é (Equação 16):

$$V_{\text{esferóide}} (\mu\text{m}^3.\text{ind}^{-1}) = \frac{\pi}{6} \times d^2 \times h \quad (16)$$

Onde:

d = diâmetro

h = altura

Para as amostras de *Microcystis aeruginosa*, o volume equivalente a uma esfera é (Equação 17):

$$V_{esfera} (\mu m^3 \cdot ind^{-1}) = \frac{\pi}{6} \times d^3 \quad (17)$$

Onde:

d = diâmetro

O cálculo do biovolume para ambas as espécies utilizado esta descrito na Equação 18:

$$B = V_m \times D \quad (18)$$

Onde:

B = biovolume ($\mu m^3 \cdot mL^{-1}$)

V_m = volume médio ($\mu m^3 \cdot ind^{-1}$)

D = densidade ($ind \cdot mL^{-1}$)

3.1.5 Experimento fatorial

Após a obtenção das culturas isoladas e/ou axênicas, foi estudada as variáveis luz e temperatura para apenas uma espécie de cianobactéria e uma de clorofícea, com base em um experimento com planejamento fatorial. Utilizaram-se dois fatores (luz e temperatura) e três níveis (valores utilizados para cada fator). Os níveis determinados para cada fator foram: 50 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 250 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ e 450 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (luz); 20 °C, 24 °C e 28 °C (temperatura).

Estes níveis foram escolhidos tendo por base os dados obtidos em coletas anteriores, com vista a refletir condições observadas em diferentes épocas do ano. Esperou-se, assim, elucidar como o processo de assimilação reage a variações extremas de luz e temperatura, para duas espécies isoladas.

A Equação 19 mostra como foi obtido o número de amostras processadas.

$$A = n^f \times e \times N \times 3 \quad (19)$$

Onde:

A = n° de amostras a serem analisadas

n = níveis (3)

f = fatores (2)

e = número de espécies (2)

N = formas nitrogenadas (3)

3 = duplicata + 1

Desta equação, 162 amostras foram processadas, 81 referentes à cianobactéria e 81 à clorofícea. O experimento foi realizado em duplicata, tendo a utilização de brancos para cada forma nitrogenada em cada condição estabelecida.

Ao todo foram nove condições distintas, tendo nove amostras em cada condição. Estas condições de luz e temperatura estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições de RSFA ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) estabelecidas para a realização do experimento fatorial de assimilação para as espécies isoladas de *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus* sp.

CONDIÇÃO	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Luz ($\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
1	20	50
2	20	250
3	20	450
4	24	50
5	24	250
6	24	450
7	28	50
8	28	250
9	28	450

No dia anterior ao experimento fatorial, foram distribuídos os 5 L em nove erlenmeyers de 2 L, anteriormente autoclavados, com cerca de 550 mL cada. Isto foi feito para que as culturas fossem aclimatadas nas nove condições, disponibilizando um tempo de adaptação à luz e temperatura antes do processo de assimilação.

No dia do experimento, frascos de 250 mL devidamente etiquetados foram usados para dispor 50 mL das culturas (cianobactéria ou clorofícea), além de eppendorfs também etiquetados já com 1% de lugol da quantidade total de amostra.

Nos frascos já com as amostras, foram adicionados os traçadores de nitrato, amônio e ureia, dosados em concentrações de ^{15}N equivalentes a 5% da concentração *in situ*. Os brancos foram filtrados logo em seguida da adição dos traçadores.

O esquema de distribuição das amostras nas incubadoras é apresentado na Figura 16.

Figura 16: Esquema de disposição dos frascos em incubadoras com 20°C, 24°C e 28°C, com três intensidades luminosas (50, 250 e 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), e com traçadores de NO_3^- (nitrato), NH_4^+ (amônio) e $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (ureia).

Após o período de incubação, mais 1 mL foi retirado e guardado em eppendorf, para posterior análise de densidade e biovolume. Os procedimentos posteriores à incubação, como filtração, armazenamento e preparo das amostras para as análises de quantificação da assimilação foram semelhantes ao descrito no item 2.1.5.

3.1.6 Quantificação da Assimilação

A quantificação da assimilação das formas nitrogenadas foi desenvolvida de maneira idêntica à descrita no item 2.1.7.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Resultados da cultura isolada e axênica *Scenedesmus* sp.

3.2.1.1 Clorofila-*a*, Sólidos e Absorbância

As análises realizadas diariamente, durante 21 dias, para a cultura isolada e axênica de *Scenedesmus* sp. será apresentada em gráficos (Figura 17).

Os resultados de clorofila-*a*, assim como da biomassa seca e absorbância, tenderam a aumentar ao longo dos dias, como é esperado em uma cultura em fase de crescimento.

No dia 0 (02/set), em que foi feito o repique da cultura para 5L, a clorofila-*a* foi de 142,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O último dia de análise apresentou 6216 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de clorofila-*a*, filtrada com 3 mL, apenas. No entanto, o maior valor de clorofila-*a* foi no dia 21/set (Dia 19), com 7104 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Como observado no gráfico da Figura 17, a clorofila-*a* teve um aumento exponencial entre os dias 9 a 15 das análises, mostrando uma estabilidade e posterior decaimento a partir do dia 16 de crescimento no galão com 5L.

Figura 17: Gráficos de clorofila-*a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (540 nm) para *Scenedesmus* sp. durante 21 dias de análise, em meio WC, para a obtenção da curva de crescimento.

Os sólidos suspensos totais tiveram um crescimento um pouco diferente da clorofila-*a*, apresentando a fase de crescimento exponencial nos primeiros dias, do dia 0 até aproximadamente o dia 13 (Figura 17).

No primeiro dia de análise (Dia 0: 02/set), a biomassa seca foi $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, tendo um aumento de cerca de 8 vezes já no terceiro dia de análise (Dia 2: 04/set – $10,7 \text{ mg.L}^{-1}$). Durante os 21 dias de análise, a biomassa não apresentou diminuição, chegando no último dia a $542,9 \text{ mg.L}^{-1}$.

A absorvância, apresentada na Figura 17 na escala logarítmica, na base 10, mostrou o dia 6 ser a metade da exponencial. Neste dia (08/set) a absorvância apresentou valor 0,2 nm. No dia 0, a absorvância foi de 0,01 nm, chegando a 1,3 nm no último dia.

Logo, com estes dados foi definido a metade da exponencial foi no sexto dia de análise. Com isso, foi determinado que após o último repique de cinco litros, no sexto dia de crescimento da cultura de *Scenedesmus* sp. seria realizado o experimento fatorial.

3.2.1.2 Assimilação, Densidade e Biovolume

A assimilação da cultura isolada e axênica de *Scenedesmus* sp. apresentou uma preferência pela forma nitrogenada de amônio, obtendo taxas muito superiores quando comparadas às de nitrato e ureia.

O nitrato apenas apresentou assimilação de 0,8, 1,6 e $1,1 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ nas condições 1, 3 e 5, respectivamente. A ureia foi assimilada nas condições 6, 7, 8 e 9, com $16,1 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $8,3 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $26,3 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e $9,2 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. O amônio foi assimilado em todas as condições, com menor valor de $157,4 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na condição 2 até $517,1 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na condição 7.

Entre as condições de mesma intensidade luminosa, a maior média de assimilação de amônio ($422,4 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi das condições 7, 8 e 9, com a maior intensidade luminosa de $450 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nas condições 1, 2 e 3, em que a luz era de $50 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a média da assimilação de amônio foi de $166,1 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e nas condições 4, 5 e 6, com intensidade luminosa de $250 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a média da assimilação de amônio foi de $405,5 \text{ } \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, indicando que as condições de maior intensidade (250 e $450 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) apresentaram maior assimilação do amônio em relação a intensidade mais baixa ($50 \text{ } \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Figura 18: Assimilação da cultura isolada e axênica *Scenedesmus* sp. ($\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), em nove condições de luz e temperatura, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, em meio modificado WC. Barra de erros em porcentagem de 5%.

No gráfico da Figura 18, foi possível observar, além dos maiores valores de assimilação serem nas condições com intensidade luminosa de 250 e 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, como já dito, entre as condições com mesma radiação, a assimilação se destacou nas temperaturas mais baixas, a 20°C (condições 1, 4 e 7), com tendência a diminuição até 28°C. Portanto, foi possível observar uma preferência da assimilação de *Scenedesmus* sp. para a forma nitrogenada amônio, e em condições de luz mais elevadas e de temperatura mais baixas.

Já para a densidade e biovolume foi verificado nos gráficos das Figuras 19 e 20, crescimento à medida que as condições de luz e temperatura aumentaram. Nas últimas condições, 7, 8 e 9, em que a intensidade luminosa foi a maior, com 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e entre as temperaturas, nas condições com 28°C. Portanto, notou-se uma densidade e biovolume maiores em condições mais extremas, com luz e temperatura elevadas.

As maiores densidades de *Scenedesmus* sp. ocorreram mais expressivamente antes das amostras serem incubadas, logo após a adição dos traçadores. Nas condições 1, 2, 3, 6 e 9 pelo menos duas formas nitrogenadas apresentaram densidade maior antes da incubação de 1 h.

Figura 19: Densidade total de *Scenedesmus* sp. (ind.mL⁻¹) antes (a) e depois (d) da incubação nas nove condições de luz e temperatura, no meio modificado WC, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.

Antes da incubação as amostras com adição do traçador de ureia apresentaram maior densidade em quase todas as condições. A amostra com adição de ureia que apresentou maior densidade foi na condição 6, com $2,35 \times 10^5$ ind.mL⁻¹, e a menor foi $8,5 \times 10^4$ ind.mL⁻¹ na condição 2. A menor densidade entre as três formas nitrogenadas antes de incubar as amostras foi na condição 1, para amônio ($1,5 \times 10^4$ ind.mL⁻¹).

A menor densidade depois da incubação foi em amônio, na condição 2, com 3×10^4 ind.mL⁻¹, e a maior densidade foi de $2,7 \times 10^5$ ind.mL⁻¹ para ureia na condição 8.

O biovolume, por ser calculado pelo volume das células e da densidade, mostrou-se semelhante aos resultados encontrados na densidade. Com isso, assim como na densidade, os maiores valores de biovolume foram encontrados nas amostras antes da incubação. Foram 16 amostras antes e 9 amostras depois de incubar com biovolume maior.

Antes da incubação as condições em que o biovolume foi maior em pelo menos duas formas nitrogenadas foram 1, 2, 3, 4, 6 e 9.

Das formas nitrogenadas, tanto antes da incubação como após o período de 1 h na incubadora, foram as amostras com adição de ureia que obtiveram maiores valores de biovolume (antes de incubar: de $59,8$ mm³.L⁻¹ na condição 2 até $169,2$ mm³.L⁻¹ na condição 9; depois de incubar: de $60,1$ mm³.L⁻¹ na condição 1, até $231,1$ mm³.L⁻¹ na condição 7).

Observando os gráficos da Figura 20, é possível dizer que mesmo com uma maior frequência de amostras antes da incubação apresentarem biovolume maior, algumas amostras que apresentaram biovolume maior depois da incubação obtiveram valores mais elevados do que todos os valores antes, como por exemplo na condição 7 depois de incubar com o traçador de ureia, seu biovolume foi aproximadamente 225 mm³.L⁻¹, enquanto que o maior biovolume antes de incubar foi de aproximadamente 160 mm³.L⁻¹, na condição 9 com o traçador de ureia.

Figura 20: Biovolume ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) de *Scenedesmus* sp. antes (a) e depois (d) da incubação, em nove condições de luz e temperatura, em meio modificado WC fixado com lugol, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.

3.2.2 Resultados da cultura isolada *Microcystis aeruginosa*

3.2.2.1 Clorofila-*a*, Sólidos e Absorbância

Os resultados de clorofila-*a*, sólidos e absorbância estão apresentados nos gráficos da Figura 21, dos 24 dias de análise.

A clorofila-*a* para a cultura isolada de *Microcystis aeruginosa* apresentou 107,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no dia 0 (16/set) e 6660,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no último dia (23: 09/out). Durante os dias de análise, o crescimento médio da clorofila-*a* foi de 1,23 vezes a cada dia.

A biomassa seca (sólidos: mg.L^{-1}) foi de 5,3 mg.L^{-1} no primeiro dia de análise até 510,0 mg.L^{-1} no último dia. Seu crescimento teve uma média de 1,26 vezes maior a cada dia.

A absorbância foi de 0,06 nm até 1,74 nm, apresentando a metade da exponencial no oitavo dia (24/set).

Foi determinado, portanto, que após o último repique de cinco litros, no oitavo dia de crescimento da cultura de *Microcystis aeruginosa* seria realizado o experimento fatorial.

Figura 21: Gráficos de clorofila-*a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (540 nm) para *Microcystis aeruginosa* durante 23 dias de análise, em meio WC, para a obtenção da curva de crescimento.

3.2.2.2 Assimilação, Densidade e Biovolume

A assimilação pela *Microcystis aeruginosa* apresentou, assim como da *Scenedesmus* sp., o amônio como forma de nitrogênio preferencialmente assimilada. O menor valor da assimilação de amônio ocorreu na condição 8, com $74,7 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e seu maior valor foi na primeira condição, com $159,9 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A assimilação de amônio obteve resultados mais expressivos nas três primeiras condições, em que a radiação luminosa foi a mais baixa, com apenas $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Diferente do que ocorreu com a espécie *Scenedesmus* sp., em que apresentou maior assimilação de amônio nas condições com maior intensidade luminosa ($450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

A média da assimilação de amônio destas três condições (1, 2 e 3) foi de $137,3 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto para as três condições com radiação de $250 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi de $108,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e de $95,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as três últimas condições com radiação de $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O nitrato foi assimilado nas condições 1, 2, 7 e 9, sendo maior na última condição, com $10,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os outros valores foram 4,0, 1,8 e $1,7 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para as condições 1, 2 e 7, respectivamente.

A ureia, assim como o nitrato, foi pouco assimilada, porém apresentou assimilação em mais condições do que este. Foram sete condições assimiladas (1, 2, 4, 6, 7, 8 e 9), sendo a nona condição com maior assimilação de ureia ($13,1 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A menor assimilação foi na condição 4, com $2,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A Figura 22 deixa clara uma diminuição da assimilação de amônio ao longo das condições, a medida que sua radiação aumenta. É possível observar também que entre as condições com mesma radiação, a assimilação maior foi nas condições em que a temperatura se mostrou mais baixa, com 20°C , da mesma forma como ocorreu com a espécie *Scenedesmus* sp.

Figura 22: Assimilação da cultura isolada *Microcystis aeruginosa* ($\mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), em nove condições de luz e temperatura, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia, em meio modificado WC. Barra de erros com porcentagem de 5%.

Assim como *Scenedesmus* sp., foi verificada em *Microcystis aeruginosa* densidade e biovolume maiores em condições com luz e temperatura mais elevadas, diferentemente das condições preferidas pelas espécies para melhor assimilação de nitrato, amônio e ureia.

Microcystis aeruginosa mostrou-se na maioria das condições estudadas maior antes da incubação, com 7 condições (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9) com pelo menos duas formas nitrogenadas com maior densidade do que nas amostras depois da incubação (Tabela 5).

Tabela 5: Densidade (ind.mL^{-1}) da cultura isolada de *Microcystis aeruginosa* em nove condições de luz e temperatura em meio modificado WC fixado com lugol antes e depois do tempo de incubação, com adição dos traçadores de nitrato, amônio e ureia.

Condições			Densidade					
			Nitrato	Amônio	Ureia	Nitrato	Amônio	Ureia
1	RSFA 50 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	20°C	2,2E+06	2,8E+06	4,4E+06	4,9E+06	1,9E+06	2,4E+06
2		24°C	3,7E+06	3,2E+06	2,0E+06	1,7E+06	3,0E+06	2,6E+06
3		28°C	2,7E+06	2,6E+06	4,1E+06	2,6E+06	3,5E+06	2,0E+06
4	RSFA 250 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	20°C	4,2E+06	2,9E+06	1,8E+06	1,6E+06	2,0E+06	1,3E+06
5		24°C	2,6E+06	4,2E+06	2,4E+06	2,5E+06	3,9E+06	9,5E+05
6		28°C	3,5E+06	5,3E+06	5,1E+06	1,9E+06	2,5E+06	3,2E+06
7	RSFA 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	20°C	3,0E+06	1,8E+06	2,1E+06	1,2E+06	3,4E+06	2,3E+06
8		24°C	6,7E+05	2,2E+06	2,3E+06	3,7E+06	2,3E+06	2,4E+06
9		28°C	3,1E+06	2,4E+06	3,1E+06	2,3E+06	3,1E+06	3,1E+06

Obtendo as médias das condições com mesma RSFA, a densidade de nitrato foi maior nas condições com $250 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ antes ($3,4 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$) e depois da incubação nas condições com $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($3,06 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$). O amônio teve a maior média das densidades antes de incubar nas condições com $250 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ depois, sendo $4,13 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$ e $2,93 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$, respectivamente. Já a ureia, obteve maior média das densidades de mesma radiação em condições com $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ antes ($3,49 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$) e $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ depois ($2,58 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$). Em relação as temperaturas, as maiores densidades também variaram bastante observando as formas nitrogenadas.

Em relação ao biovolume de *Microcystis aeruginosa*, foi encontrado valores maiores com mais frequência nas amostras antes de serem incubadas, com pelo menos duas formas nitrogenadas apresentando maior biovolume em seis condições (1, 4, 5, 6, 8 e 9).

Das formas nitrogenadas, a que o biovolume foi maior na maioria das condições antes de incubar foi ureia, nas condições 1, 3, 4, 5, 6, 8 e 9. O maior biovolume para ureia antes foi $109,2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ (condição 6), e o menor foi na condição 4, com $33,7 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$. Depois da incubação, o maior biovolume para ureia foi de $88,5 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, na condição 6, e $21,6 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ na condição 5 como menor biovolume.

Figura 23: Biovolume de *Microcystis aeruginosa* em nove condições de luz e temperatura em meio modificado WC fixado com lugol antes (a) e depois (d) do tempo de incubação, com os traçadores de nitrato, amônio e ureia. Barra de erros com erro padrão.

Observando os gráficos das Figuras 23, não foi possível verificar um padrão dos maiores valores de biovolume em relação às temperaturas estudadas para as amostras com o traçador nitrato. No entanto, para amônio e ureia pode-se sugerir que os maiores valores de biovolume foram quase sempre nas condições com temperatura de 28°C.

Em relação as radiações, feito a média das condições com mesma radiação, foi notado que para as amostras antes de serem incubadas, as três formas nitrogenadas apresentaram maiores médias de biovolume das condições com 250 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Porém, após a incubação, não ocorreu um padrão, sendo que para nitrato a maior média foi para as condições com 50 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e para amônio e ureia nas condições com 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Contudo, analisando todas as amostras, para densidade e biovolume de *Microcystis aeruginosa*, é possível dizer que em sua maioria o melhor crescimento ocorreu em condições semelhante ao observado por *Scenedesmus* sp., com luz (250 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura (28°C) elevadas.

3.3 DISCUSSÃO

Para os resultados de densidade e biovolume, ambas as espécies estudadas mostraram similaridades. Comparando as amostras do mesmo traçador antes e depois da incubação, foi verificado que a maioria dos valores mais elevados se encontrava logo após a adição dos traçadores, e não depois do período de incubação, para as três formas nitrogenadas. Isto pode indicar que houve inibição do crescimento destas espécies devido a algum fator. No entanto, não é plausível dizer que esta inibição ocorreu durante o período de incubação de uma hora, já que não há estudos que comprovem alteração na densidade e biovolume das espécies em pouco tempo (uma hora). Provavelmente, esta diminuição ocorreu devido as intensidades luminosas mais elevadas a partir do processo de aclimação das espécies nas condições estudadas em pelo menos 12 h antes dos experimentos.

Foi observado maior desenvolvimento, relativo a densidade e biovolume, de ambas as espécies isoladas, nas amostras com o traçador de ureia. Este maior desenvolvimento em ureia também foi observado por Berman e Chava (1999) para a espécie *Microcystis aeruginosa*. Eles fizeram experimentos com espécies isoladas com mais de uma fonte de nitrogênio e com somente uma fonte, e em ambos os experimentos se constatou melhor crescimento (densidade

e biovolume) com a ureia. Em nitrogênio inorgânico o crescimento ocorreu de forma mais lenta.

Em relação à *Scenedesmus* sp., estudos mostram que diferentes cepas reagem de formas diferentes a fontes diversas de nitrogênio. Xin et al. (2010) mostraram que *Scenedesmus* sp. LX1 obteve maior densidade em menor tempo com o amônio (dia 0: $\sim 1 \times 10^5$ ind.mL⁻¹ e dia 2: $\sim 1 \times 10^6$ ind.mL⁻¹), no entanto, nas fases de crescimento mais estáveis, a densidade foi maior com as fontes de ureia ou nitrato (dia 7: ureia – 7×10^6 ind.mL⁻¹; nitrato – 5×10^6 ind.mL⁻¹; amônio – 3×10^6 ind.mL⁻¹). Chandra et al. (2016) encontraram um maior crescimento (concentração de biomassa em g.L⁻¹) com a ureia sendo a fonte de nitrogênio no meio. Já para Arumugam et al. (2013), o crescimento de biomassa (peso seco em g.L⁻¹) desta espécie foi mais significativo com as fontes de nitrato, tais como nitrato de potássio (0,32 g.L⁻¹ com 5mM de KNO₃) e nitrato de sódio (0,28 g.L⁻¹ com 5mM de NaNO₃). A ureia apresentou um efeito sobre a biomassa bem semelhante ao nitrato de sódio, já o nitrato de cálcio, nitrato de amônio e cloreto de amônio apresentaram um efeito moderado sobre a biomassa algal.

Para a espécie *Scenedesmus* sp., foram observadas maiores densidades e biovolumes nas condições de luz e temperatura mais elevadas, com radiação de 450 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 28°C, para a maioria das formas nitrogenadas. Isto pode indicar que *Scenedesmus* sp. ou apresenta preferências para seu crescimento em condições extremas ou que possui características de adaptação a variadas condições ambientais. Segundo Xin, Hong-Ying e Yu-Ping (2011), a cepa estudada LX1 desta espécie não apresentou crescimento significativamente diferente em temperaturas variadas, apresentando um bom desenvolvimento em um intervalo de 10 a 30°C, tendo um melhor desempenho a 20°C. Ruiz-Martínez et al. (2015) encontraram um melhor crescimento em temperatura de 26°C, sendo duas vezes maior que o crescimento em 18°C.

Cabello et al. (2015) mostraram em seus experimentos que *Scenedesmus obtusiusculus* apresentou uma atividade fotossintética ótima na faixa de 8 a 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em todas as temperaturas estudadas. Entre 1600 a 2360 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ já ocorreu uma fotoinibição sob temperaturas acima de 35°C.

Fica clara a tolerância desta espécie a elevadas variações de luz e temperatura, como também foi observado por Sánchez et al. (2008). No presente estudo, a cepa isolada do Reservatório do Lobo apresenta características favoráveis a condições relativamente elevadas de intensidade luminosa e temperatura, como em outros estudos.

Os maiores valores de densidade e biovolume para as amostras da espécie *Microcystis aeruginosa* não apresentaram um padrão tão definido como para *Scenedesmus sp.*, variando entre as formas nitrogenadas e antes e depois da incubação. Contudo, observando o antes e depois de todas as amostras, é possível verificar que no geral, a espécie isolada de *Microcystis aeruginosa* apresentou com mais frequência valores maiores de densidade e biovolume nas condições de $250 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em temperatura de 28°C .

Vários estudos têm demonstrado um desenvolvimento maior de *Microcystis aeruginosa* em condições de luz e temperatura mais elevadas, com elevada disponibilidade de nutrientes (DAVIS et al., 2009; JÖHNK et al., 2008; LEHMAN et al., 2013; YANG et al., 2012; ZEHNDER; GORHAM, 1960). Zehnder e Gorham (1960), realizando experimentos com diferentes temperaturas, notaram que o crescimento desta espécie só ocorreu acima de 22°C , obtendo melhores rendimentos em temperatura a 28°C .

Yang et al. (2012) expõem que a temperatura da água é um dos fatores primordiais na condução de florações de *Microcystis sp.*, mas que o efeito desta variável ambiental sobre o crescimento desta espécie depende da intensidade luminosa. Em intensidade luminosa de $35 \mu\text{mol fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a maior densidade em 25°C a uma concentração de $25,47 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrogênio foi de $9 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$, enquanto que a $80 \mu\text{mol fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, na mesma temperatura e concentração, a densidade foi a $11 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$. Já em temperatura a 30°C , na menor intensidade a densidade maior foi semelhante à densidade de 25°C a $35 \mu\text{mol fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e na maior intensidade a 30°C a densidade maior chegou em $15 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$. Da mesma forma ocorreu no presente experimento, obtendo a maior densidade em $250 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 28°C ($5,3 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$) do que na intensidade de $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

As amostras com radiação de $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram os menores valores de densidade e biovolume de *Microcystis aeruginosa*. Isto pode ser devido à característica existente do grupo de cianobactérias de ser suscetível a fotoinibição (SAMUELSSON et al., 1987).

A assimilação das duas espécies apresentou preferência quase que unânime pela forma nitrogenada amônio, assim como é colocado por Twomey, Piehler e Paerl (2005).

O mesmo resultado foi encontrado em experimentos realizados na Baía de São Francisco (CA. - EUA) com a espécie de *Microcystis aeruginosa* (LEE et al., 2015). Os pesquisadores observaram um potencial maior na assimilação pelo amônio, do que por nitrato e ureia. Da mesma forma observaram uma afinidade específica maior pelo amônio, e menor pelo nitrato. Para a mesma espécie esta maior afinidade e preferência em assimilar amônio

também foram observadas em outros estudos (LEHMAN et al., 2013, 2015; TAKAMURA; IWALRUMA; YASUNO, 1987).

Para a espécie *Scenedesmus* sp. também foi verificada uma maior assimilação por amônio em comparação a assimilação de ureia, mas com uma taxa máxima de assimilação de ambas as formas nitrogenadas bem semelhantes, próxima a 100% de assimilação (HEALEY, 1977).

Para *Scenedesmus* sp. a condição em que houve maior assimilação foi com radiação de $450 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura de 20°C . Para *Microcystis aeruginosa* a maior assimilação de amônio se deu com radiação de $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura de 20°C .

Logo, a diferença entre as espécies no processo de assimilação foi em relação à intensidade luminosa. *Scenedesmus* sp. apresentou maior assimilação de amônio nas condições 7, 8 e 9, quando a intensidade luminosa foi mais elevada ($450 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Já *Microcystis aeruginosa* apresentou assimilação maior por amônio nas condições 1, 2 e 3, nas quais a intensidade luminosa era menor ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Em relação à temperatura, para ambas as espécies, foi notada maior assimilação pelo amônio a 20°C , a menor temperatura estudada. Estes resultados contradizem a ideia geral de que o metabolismo é mais acelerado, e consequentemente a assimilação é maior, em condições de maiores temperaturas. Por conseguinte, investigações mais aprofundadas sobre os fatores que levaram a essa preferência em assimilar nitrogênio em temperatura menor merecem ser realizadas.

No estudo de Ruiz-Martínez et al. (2015), foi verificada uma assimilação de amônio para a espécie *Scenedesmus* sp., cultivada em reator com intensidade de luz constante de $180 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 20°C , de cerca de $375,3 \mu\text{gN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, e a 28°C a assimilação de amônio foi maior, cerca de $667,2 \mu\text{gN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Estes dados diferem do que foi encontrado no presente trabalho, pois a maior assimilação de amônio pela *Scenedesmus* sp. ocorreu justamente na menor temperatura (20°C), atingindo $517,1 \mu\text{gN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, estando mais próximo da assimilação encontrada a 28°C por Ruiz-Martínez et al. (2015).

No estudo de Wu, Song e Li (2008), analisando espécies isoladas de *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus quadricauda* em condições de escuro e baixa temperatura (4°C), eles observaram grandes danos morfológicos a espécie de clorófitica após 30 dias nestas condições. Já a cianobactéria não apresentou nenhuma mudança morfológica a estas condições extremas, exibindo tolerância maior a baixas temperaturas e falta de luz. Isto pode servir como indicativo do porquê de uma melhor assimilação nas condições de luz e temperatura mais baixas no presente estudo para *Microcystis aeruginosa*, no entanto, não explica a melhor assimilação da *Scenedesmus* sp. nas condições de 20°C .

A assimilação do amônio pela *Microcystis aeruginosa* mostrou-se maior em condições opostas aos maiores valores de densidade e biovolume encontrados para esta. Este desacoplamento entre a maior densidade e biovolume nas diferentes condições testadas e a maior assimilação das formas nitrogenadas pode sugerir que outros fatores, além da assimilação de nitrogênio, possibilitaram o desenvolvimento da *Microcystis aeruginosa*. Por exemplo, assimilação de fósforo ou outros nutrientes.

Comparando a assimilação entre as duas espécies estudadas, ficou clara uma maior assimilação pela espécie *Scenedesmus* sp., pois somando as três formas de nitrogênio, esta obteve uma maior assimilação de $525,4 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, enquanto a *Microcystis aeruginosa* apresentou a maior assimilação total do nitrogênio de $170,5 \mu\text{gN.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Isto contradiz o exposto por Hein, Pedersen e Sand Jensen (1995), em que algas com tamanho menor apresentam maior facilidade e rapidez em assimilar o nutriente. Isto porque o biovolume de *Scenedesmus* sp. esteve numa faixa de $50\text{-}250 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, enquanto que *Microcystis aeruginosa* apresentou seu biovolume na faixa de $20\text{-}150 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, claramente esta última sendo menor.

Provavelmente, muitas das observações encontradas neste experimento diferem daquelas citadas na literatura principalmente por corresponderem a espécies isoladas. Culturas isoladas em laboratório apresentam condições controladas e muitas vezes são diferentes do que é encontrado *in situ*, justamente para analisar diversas condições de adaptação. No entanto, estas mesmas espécies em seu ambiente natural podem apresentar características distintas, acarretando em alterações influenciadas por diversos fatores químicos, físicos e biológicos no ambiente que variam em escala espacial-temporal.

4. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados com as amostras ambientais do Reservatório do Lobo, concluiu-se que a assimilação das diferentes formas nitrogenadas variou sem padrão definido ao longo das coletas e pareceu estar relacionada à estrutura da comunidade fitoplancônica. Provavelmente, alguns grupos possuem maior flexibilidade metabólica em relação à forma de N a ser assimilada, o que pode explicar a variação da assimilação de nitrato, amônio ou ureia nas diferentes amostragens. No entanto, como se trata de uma amostra ambiental, logo, muitas espécies coexistem, o que ressalta a importância de recursos de que uma espécie pode se valer para competir.

Além das características qualitativas da comunidade do fitoplâncton, outros fatores influenciaram o processo de assimilação. A densidade fitoplanctônica, a concentração de nutrientes, o pH, a razão N:P e o OD foram mais significativos segundo a correlação de Spearman ($p < 0,05$). Não foi encontrada uma correlação significativa entre as variáveis RSFA e temperatura com a assimilação, sendo importantes, contudo, para a estruturação da comunidade fitoplanctônica.

A forma nitrogenada mais assimilada pelo fitoplâncton durante as coletas foi amônio, nos meses de janeiro e julho de 2015. Já nitrato e ureia foram mais assimilados no mês de abril de 2015. Foi verificado um aumento das taxas de assimilação do nitrogênio ao longo do tempo, refletindo o contínuo processo de eutrofização artificial do sistema aquático. Assim, conclui-se que as taxas de assimilação de nitrogênio podem ser um indicador importante do estado trófico do ambiente, já que se mostraram proporcionais ao incremento temporal da disponibilidade de nutrientes e do aumento da concentração de clorofila no Reservatório do Lobo.

A partir dos experimentos realizados com as culturas laboratoriais isoladas, ficou clara a maior preferência pela assimilação do amônio pelas espécies *Scenedesmus* sp. e *Microcystis aeruginosa*, em todas as condições de luz e temperatura testadas. A temperatura e intensidade luminosa influenciaram significativamente o processo de assimilação nesses testes. Para *Scenedesmus* sp., a maior assimilação de amônio ocorreu em condições com $450 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 20° . Já para a *Microcystis aeruginosa*, a maior assimilação de amônio ocorreu em condições com $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 20°C .

Conclui-se, deste experimento, que as espécies isoladas apresentaram maior preferência em assimilar nitrogênio a baixas temperaturas, porém a cianobactéria em intensidade menor e a clorofícea em intensidade maior de luz. No entanto, não é possível extrapolar esse comportamento obtido em culturas isoladas a ambientes naturais, em que diferentes condições ambientais podem gerar estresse e uma diversificada comunidade biológica compartilha as fontes para seu desenvolvimento e compete por elas. Logo, estudos como o desenvolvido pela presente pesquisa são imprescindíveis para o melhor entendimento de como o fitoplâncton isolado ou compartilhando recursos com outros organismos responde à assimilação do nitrogênio em diferentes condições. Espera-se que os resultados obtidos ofereçam subsídios para o monitoramento ambiental e para ações de melhoria da qualidade das águas represadas, de modo a garantir seus legítimos usos.

RECOMENDAÇÕES

- Realizar experimentos adicionando duas formas nitrogenadas concomitantes em amostras ambientais ou em culturas laboratoriais, verificando assim, se há inibição da assimilação de uma forma nitrogenada por outra, assim como foi realizado em estudos na Califórnia (LEE et al., 2015). Este tipo de experimento torna-se importante, uma vez que as formas disponíveis nitrogenadas não se encontram isoladas no ambiente para o fitoplâncton, e sim em conjunto.
- Após definidas as condições de luz e temperatura favoráveis a assimilação de uma espécie ou uma comunidade fitoplanctônica, analisar períodos de incubação diferentes para verificar se há uma curva padrão da assimilação em relação ao tempo. Desta forma, seria possível contribuir com observações inicialmente realizadas por Dugdale e Wilkerson (1986), que verificaram que no início da assimilação, antes de 20 minutos da incubação, o processo é mais rápido. Além disso, verificar se esse padrão temporal da assimilação varia entre espécies ou grupos fitoplanctônicos. Isso contribuiria para gerar maior conhecimento sobre o processo de assimilação em ambientes de água doce em regiões subtropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S. M.; ROELS, O. A. Effects of Light Intensity on Nitrate and Nitrite Uptake and Excretion by *Chaetoceros curvisetus*. **Marine Biology**, v. 62, n. 4, p. 257–261, 1981.

ANGELINI, R.; PETRERE, M. A model for the plankton system of the Broa reservoir, Sao Carlos, Brazil. **Ecological Modelling**, v. 126, n. 2-3, p. 131–137, 2000.

ANTIA, N. J.; HARRISON, P. J.; OLIVEIRA, L. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. **Phycologica**, v. 30, n. 1, p. 1–89, 1991.

APHA. Stanard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 25th ed. Jointly published by American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, USA. p. 1360, 2005.

ARUMUGAM, M. et al. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 246–249, 2013.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64–70, 2006.

AZEVEDO, S. M. F. O. et al. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 3, p. 261–265, 1994.

BATED, S. S. Effects of light and ammonium on nitrate uptake by two species of estuarine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 2, p. 212–218, 1976.

BERG, G. M. et al. Plankton community composition in relation to availability and uptake of oxidized and reduced nitrogen. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 30, p. 263–274, 2003.

BERGES, J. Algal nitrate reductases. **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 3–8, 1997.

BERMAN, T. et al. The characteristics of ammonium and nitrate uptake by phytoplankton in Lake Kinneret. **Limnology and Oceanography**, v. 29, n. 2, p. 287–297, 1984.

BERMAN, T. Dissolved organic nitrogen utilization by an *Aphanizomenon* bloom in Lake Kinneret. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 5, p. 577–586, 1997.

BERMAN, T.; CHAVA, S. Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. **Journal of Plankton Research**, v. 21, n. 8, p. 1423–1437, 1999.

BORGES, P. A. F.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L. C. Spatial and temporal variation of phytoplankton in two subtropical Brazilian reservoirs. **Hydrobiologia**, v. 607, n. 1, p. 63–74, 2008.

BOUVY, M. et al. Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 23, n. 1, p. 13–27, 2000.

BOVO-SCOMPARIN, V. M.; TRAIN, S. Long-term variability of the phytoplankton community in an isolated floodplain lake of the Ivinhema River State Park, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 610, n. 1, p. 331–344, 2008.

BOWDEN, W. B. The biogeochemistry of nitrogen in freshwater wetlands. **Biogeochemistry**, v. 4, n. 3, p. 313–348, 1987.

BRADLEY, P. B.; SANDERSON, M. P.; FRISCHER M. E.; BROFFT, J.; BOOTH, M. G.; KERKHOF, L. J.; BRONK, D. A. Inorganic and organic nitrogen uptake by phytoplankton and heterotrophic bacteria in the stratified Mid-Atlantic Bight. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 88, p. 429–441, 2010.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.

CABELLO, J. et al. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 128–135, 2015.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; DOS SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. Edição 1. São Carlos: Rima Editora, 2006. 118 p.

CALIJURI, M. D.; DOS SANTOS, A. C. A.; JATI, S. Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP – Brazil). **Journal of Plankton Research**, v. 24, n. 7, p. 617–634, 2002.

CARLSON, R. E. A Trophic State Index for Lakes. **Limnology and Oceanography**, v. 22, n. 2, p. 361–369, 1977.

CARVALHO, M. D. C. **Comunidade fitoplanctônica como instrumento de biomonitoramento de reservatórios no Estado de São Paulo**. 2003. 167 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CHANDRA, T. S. et al. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of Carbon dioxide , light and nutrient source on growth and biochemical characteristics. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 430–439, 2016.

CHELLAPPA, N. T.; BORBA, J. M.; ROCHA, O. Phytoplankton community and physical-chemical characteristics of water in the public reservoir of Cruzeta, RN, Brazil. **Brazilian journal of biology**, v. 68, n. 3, p. 477–494, 2008.

COLLOS, Y. Calculations of ^{15}N uptake rates by phytoplankton assimilating one or several nitrogen sources. **International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part**, v. 38, n. 4, p. 275–282, 1987.

CONWAY, H. L. Interactions of inorganic nitrogen in the uptake and assimilation by marine phytoplankton. **Marine Biology**, v. 39, n. 3, p. 221–232, 1977.

CORUZZI, G. M. Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. **The Arabidopsis Book**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2003.

COSTA, I. A S.; CHELLAPPA, N. T.; ARAÚJO, M. F. F. Estudo do fitoplâncton da barragem Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves, Assu-RN. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 10, n. 1, p. 67-80, 1998.

CRAWFORD, N. M.; FORDE, B. G. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. **The Arabidopsis Book**, v. 1, n. 3, p. 1–24, 2002.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. D. C. Variação sazonal dos grupos funcionais fitoplanctônicos em braços de um reservatório tropical de usos múltiplos no estado de São Paulo (Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 822–831, 2011a.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. D. C. Limiting factors for phytoplankton growth in subtropical reservoirs: the effect of light and nutrient availability in different longitudinal

compartments. **Lake and Reservoir Management**, v. 27, n. February 2015, p. 162–172, 2011b.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. D. C.; LAMPARELLI, M. C. A trophic state index for tropical/subtropical reservoirs (TSI_{tr}). **Ecological Engineering**, v. 60, p. 126–134, 2013.

DAVIS, J. R.; KOOP, K. Eutrophication in Australian rivers, reservoirs and estuaries - a southern hemisphere perspective on the science and its implications. **Hydrobiologia**, v. 559, n. 1, p. 23–76, 2006.

DAVIS, T. W. et al. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. **Harmful Algae**, v. 8, n. 5, p. 715–725, 2009.

DODDS, W. K.; COLE, J. J. Expanding the concept of trophic state in aquatic ecosystems: It's not just the autotrophs. **Aquatic Sciences**, v. 69, n. 4, p. 427–439, 2007.

DODDS, W. K.; WHILES, M. R. Lakes and Reservoirs: Physiography. In: **Freshwater Ecology: concepts and environmental applications of limnology**. 2nd. ed. 2002. p. 139–166.

DÖHLER, G. Impact of UV radiation of different wavebands on pigments and assimilation of ¹⁵N-ammonium and ¹⁵N-nitrate by natural phytoplankton and ice algae in antarctica. **Journal of Plant Physiology**, v. 151, p. 550–555, 1997.

DORTCH, Q. Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine diatoms. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 61, n. 81017, p. 243–264, 1982.

DORTCH, Q. et al. Nitrogen storage and use of biochemical indexes to assess nitrogen deficiency and growth-rate in natural plankton populations. **Journal of Marine Research**, v. 43, n. 2, p. 437–464, 1985.

DUGDALE, R. C.; GOERING, J. J. Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. **Limnology and Oceanography**, v. 12, n. 2, p. 196–206, 1967.

DUGDALE, R. C.; WILKERSON, F. P. The use of ¹⁵N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans: experimental considerations. **Limnology and Oceanography**, v. 31, n. 4, p. 673–689, 1986.

ELSER, J. J.; BRACKEN, et al. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 10, p. 1135-1142, 2007.

FALCÃO, V. R. **Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha *Gracilariaria tenuistipitata* (RHODOPHYTA):** sequenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FELIP, M.; CATALAN, J. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 1, p. 91–105, 2000.

FIA, R. et al. Estado trófico da água na bacia hidrográfica da Lagoa Mirim, RS, Brasil. **Revista Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 4, n. 1, p. 132–141, 2009.

FILHO, R. A. R. **Relações tróficas e limnológicas no Reservatório de Itaipu:** uma análise do impacto da biomassa pesqueira nas comunidades planctônicas. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

FOWLER, D. et al. The global nitrogen cycle in the twenty-first century : introduction. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 368, n. 1621, p. 2013–2015, 2013.

FOWLER, D. et al. Effects of global change during the 21st century on the nitrogen cycle. **Atmospheric Chemistry and Physics Discussions**, v. 15, n. 2, p. 1747–1868, 2015.

GALLOWAY, J. N. The global nitrogen cycle: Changes and consequences. **Environmental Pollution**, v. 102, n. 1, p. 15–24, 1998.

GALLOWAY, J. N. et al. The Nitrogen Cascade. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 341, 2003.

GANGULY, D.; ROBIN, R. S.; VARDHAN, K. V.; MUDULI, P. R.; ABHILASH, K. R.; PATRA, S.; CUBRAMANIAN, B. R. Variable response of two tropical phytoplankton species at different salinity and nutrient condition. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 440, p. 244-249, 2013.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. Da Escassez ao Estresse do Planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1468–1476,

2013.

GARCÍA, J. et al. Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 14, p. 1709–1715, 2006.

GEMELGO, M. C. P.; MUCCI, J. L. N.; NAVAS-PEREIRA, D. Population dynamics: seasonal variation of phytoplankton functional groups in Brazilian reservoirs (Billings and Guarapiranga, São Paulo). **Brazilian journal of biology: Revista brasileira de biologia**, v. 69, n. 4, p. 1001–1013, 2009.

GIANI, A.; FIGUEREDO, C. C.; ETEROVICK, P. C. Algas planctônicas do reservatório da Pampulha (MG): Euglenophyta, Chrysophyta, Pyrrophyta, Cyanobacteria. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 107–116, 1999.

GLIBERT, P. M. et al. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. **Limnology and Oceanography**, v. 61, p. 165–197, 2016.

GRANT, B. R.; MADGWICK, J.; DAL PONT, G. Growth of *Cylindrotheca closterium* var. *californica* (Mereschk.) Reimann & Lewin on nitrate, ammonia, and urea. **Aust. J. mar. Freshwat. Res.**, v. 18, n. 2, p. 129–136, 1967.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293–296, 2008.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid C. **J. Phycol.**, v. 8, p. 10–14, 1972.

HARRISON, J. A. et al. The regional and global significance of nitrogen removal in lakes and reservoirs. **Biogeochemistry**, v. 93, n. 1-2, p. 143–157, 2009.

HEALEY, F. P. Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, n. 1, p. 61–69, 1977.

HEIN, M.; PEDERSEN, M. F.; SAND JENSEN, K. Size-dependent nitrogen uptake in micro- and macroalgae. **Marine Ecology Progress Series**, v. 118, n. 1-3, p. 247–254, 1995.

HENRY, R.; NUNES, M. A.; MITSUKA, P. M.; LIMA, N.; CASANOVA, S. M. C. Variação espacial e temporal da produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Jurumirim (Rio Paranapanema, SP). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 571–590, 1998.

HILLEBRAND, H. et al. Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. **J. Phycol**, v. 35, p. 403–424, 1999.

HUSZAR, V. L. M. et al. Cyanoprokaryote assemblages in eight productive tropical Brazilian waters. **Hydrobiologia**, v. 424, n. 1-3, p. 67–77, 2000.

HUSZAR, V. L. M. et al. Nutrient–chlorophyll relationship in tropical - subtropical lakes: do temperate models fit? **Biogeochemistry**, v. 79, p. 239-250, 2006.

IRMISCH, A. Investigations on the Urea Uptake by Phytoplankton in the Baltic Sea. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 19, n. 1, p. 39–44, 1991.

JAUZEIN, C. et al. Interactions between ammonium and urea uptake by five strains of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 53, n. 3, p. 271–280, 2008.

JÖHNK, K. D. et al. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology**, v. 14, n. 3, p. 495–512, 2008.

KHAN, M.; YOSHIDA, N. Effect of l-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 3, p. 575–582, 2008.

KOROLEFF, F., Determination of ammonia-nitrogen. In: **Methods of sea water analysis** (GRASSHOFF, K., EHRHARDT, M AND KREMLING, K. eds.). Verlag chemie, Weinheim, pp 150-157. 1983.

L'HELGUEN, S.; MAGUER, J. F.; CARADEC, J. Inhibition kinetics of nitrate uptake by ammonium in size-fractionated oceanic phytoplankton communities: Implications for new production and f-ratio estimates. **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 10, p. 1179–1188, 2008.

LAMPARELLI, M. **Graus de trofia em corpos d ' água do Estado de São Paulo: Avaliação dos métodos de monitoramento**. 2004. 238 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LAUTENSCHLAGER, S. F. **Modelagem do desempenho de Wetlands construídas**. 2001. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Sanitária) – Escola Politécnica,

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LEE, J. et al. Uptake and inhibition kinetics of nitrogen in *Microcystis aeruginosa*: Results from cultures and field assemblages collected in the San Francisco Bay Delta, CA. **Harmful Algae**, v. 47, p. 126–140, 2015.

LEHMAN, P. W. et al. Long-term trends and causal factors associated with *Microcystis* abundance and toxicity in San Francisco Estuary and implications for climate change impacts. **Hydrobiologia**, v. 718, n. 1, p. 141–158, 2013.

LEHMAN, P. W. et al. Characterization of the *Microcystis* Bloom and Its Nitrogen Supply in San Francisco Estuary Using Stable Isotopes. **Estuaries and Coasts**, v. 38, p. 165–178, 2015.

LEWIS, W. M. et al. Nitrogen yields from undisturbed watersheds in the Americas. **Biogeochemistry**, v. 46, n. 1–3, p. 149–162, 1999.

FILIPPINO, K. C.; MULHOLLAND, M. R.; BERNHARDT, P. W. Nitrogen uptake and primary productivity rates in the Mid-Atlantic Bight (MAB). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 91, p. 13–23, 2011.

LIPSCHULTZ, F. Isotope Tracer Methods for Studies of the Marine Nitrogen Cycle. In: **Nitrogen in the Marine Environment**. 2nd. ed. Elsevier Inc., 2008. p. 1345–1384.

LOMAS, M. W. et al. Temporal and spatial dynamics of urea uptake and regeneration rates and concentrations in Chesapeake Bay. **Estuaries**, v. 25, n. 3, p. 469–482, 2002.

LOMAS, M. W.; GLIBERT, P. M. Temperature regulation of nitrate uptake: A novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 3, p. 556–572, 1999.

LUND, B. A. Mutual interference of ammonium, nitrate, and urea on uptake of ^{15}N sources by the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 113, n. 2, p. 167–180, 1987.

MACISAAC, J. J.; DUGDALE, R. C. Interactions of light and inorganic nitrogen in controlling nitrogen uptake in the sea. **Deep Sea Research**, v. 19, p. 209–232, 1972.

MALONE, T. C. Size-Fractionated primary productivity of marine phytoplankton. **Environmental Science Research**. v. 19, p. 301–319. 1980.

MARTINS, C. R. et al. Ciclos Globais de Carbono, Nitrogênio e Enxofre: a importância na química da atmosfera. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 5, p. 28-41, 2003.

MATSUZAKI, M.; MUCCI, J. L. N.; ROCHA, A. A. Comunidade fitoplanctônica de um pesqueiro na cidade de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 679–686, 2004.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 361–376, 1999.

MCCARTHY, J. J.; EPPLEY, R. W. A comparison of chemical, isotopic, and enzymatic methods for measuring nitrogen assimilation of marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 17, n. 3, p. 371–382, 1972.

MESQUITA, T. P. N. **Eutrofização e capacidade de carga de fósforo de seis reservatórios da bacia do rio Seridó, região semi-árida do Estado do RN**. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

MILANO, C. B. DE et al. Análise da percepção ambiental de moradores e visitantes da Represa do Broa, Itirapina e Brotas, SP, Brasil. In: Congresso de Medio Ambiente, 7, 2013, Buenos Aires, Argentina. **Anais...** Buenos Aires: Universidade Nacional de La Plata, 2013. p. 26, 2013.

MOLISANI, M. M. et al. Trophic state, phytoplankton assemblages and limnological diagnosis of the Castanhão Reservoir, CE, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2010.

MOLLOY, C. J.; SYRETT, P. J. Effect of light and N deprivation on inhibition of nitrate uptake by urea in microalgae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 118, n. 2, p. 97–101, 1988.

MOLOZZI, J. **Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta na avaliação da qualidade ecológica de reservatórios tropicais**. 2011. 197 f. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

MONETA, A. et al. Dissolved inorganic and organic nitrogen uptake in the coastal North Sea: A seasonal study. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 147, p. 78–86, 2014.

MOTHEO, D. F. **Estudo limnológico na Represa Carlos Botelho (Itirapina/Brotas - SP): uma reavaliação comparativa do sistema Lobo-Broa**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

MOURA, A. D. N. et al. Phytoplanktonic associations: a tool to understanding dominance events in a tropical Brazilian reservoir. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 641–648, 2007.

MULHOLLAND, M. R.; LOMAS, M. W. Nitrogen Uptake and Assimilation. In: **Nitrogen in the marine environmental**. 2nd. ed. v. 1, Elsevier, 2008 Elsevier, 2008. p. 303-384.

NABOUT, J. C.; NOGUEIRA, I. S.; OLIVEIRA, L. G. Phytoplankton community of floodplain lakes of the Araguaia River, Brazil, in the rainy and dry seasons. **Journal of Plankton Research**, v. 28, n. 2, p. 181–193, 2006.

NEN 6520. **Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll a Content** Netherlands Normalisatie-Instituut, Delft, The Netherlands [in Dutch]. 1981

NOGUEIRA, N. M. C. et al. Variação mensal da condição trófica do Lago das Garças (São Paulo, SP, Brasil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 10, n. 2, p. 21-34, 1998.

NUSH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment. **Arch.Hydrobiol. Bech. Stuttgart**. 14: 14-36, 1980.

OLIVEIRA, M. S. R. **Avaliação da comunidade fitoplanctônica da lagoa facultativa do módulo III da estação de tratamento de esgoto de Mangabeira (João Pessoa –PB)**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

PASSERINI, M. D. **Influência das frentes frias no mecanismo de funcionamento da represa da UHE Carlos Botelho (Lobo/Broa) – Itirapinas – SP, nos pontos de vista químico, físico e biológico**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

PEDERSEN, M. F.; BORUM, J. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements. **Oceanographic Literature Review**, v. 44, n. 4, p. 315, 1997.

PEREIRA, J. M. DE A. **A atividade pesqueira na Represa do Lobo - Broa (Itirapina, Brotas - SP): caracterização e composição da captura**. 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PRÉISING, M. et al. Nitrogen uptake and the importance of internal nitrogen loading in Lake Balaton. **Freshwater Biology**, v. 46, n. 1, p. 125–139, 2001.

PRICE, N. M.; HARRISON, P. J. Urea uptake by Sargasso Sea phytoplankton: saturated and in situ uptake rates. **Deep Sea Research**, v. 35, n. 9, p. 1579–1593, 1988.

RABALAIS, N. N. Nitrogen in aquatic ecosystems. **Ambio**, v. 31, n. 2, p. 102–112, 2002.

REYNOLDS, C. S. et al. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 24, n. 5, p. 417–428, 2002.

REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G. H. M. Enumeration of natural *Microcystis* populations. **British Phycological Journal**, v. 13, p. 269–277, 1978.

RIVERA, E. A. C. **Modelo Sistêmico para Compreender o Processo de Eutrofização em um Reservatório de Água**. 2003. 152 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

RIVERA, E. C. et al. Systems models to evaluate eutrophication in the Broa Reservoir, São Carlos, Brazil. **Ecological Modelling**, v. 202, p. 518–526, 2007.

ROJAS, O. I. A. **Avaliação fisiológica e bioquímica de cana-de-açúcar variedades RB83-5089 e SP80-3280 em fase inicial de crescimento submetidas a doses de nitrato**. 2012. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências da Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

RUIZ-MARTÍNEZ, A. et al. Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 346–349, 2015.

SAMUELSSON, G. et al. The Susceptibility of Photosynthesis to Photoinhibition and the Capacity of Recovery in High and Low Light Grown Cyanobacteria, *Anacystis nidulans*. **Plant physiology**, v. 83, n. 2, p. 438–441, 1987.

SÁNCHEZ, J. F. et al. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 398-405, 2008.

SANTOS, P. V. DOS. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SÃO PAULO (Estado). Decreto nº 20.960, de 8 de junho de 1983. Declara área de proteção ambiental a regiões situadas em diversos municípios, dentre os quais Corumbataí, Botucatu e Tejuapá. Acesso em: < <http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/decreto/1983/1983-Dec-20960.pdf> >. Disponível em: 13 de maio de 2016. 1983.

SEELYAVE, S. et al. Nitrogen uptake of phytoplankton assemblages under contrasting upwelling and downwelling conditions: The Ría de Vigo, NW Iberia. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 124, p. 1–12, 2013.

SEPÚLVEDA, P. L. L. **Nitrogênio inorgânico intracelular: extração, papel fisiológico e acumulação por microalgas marinhas, em cultivos estanques**. 2000. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2000.

SILVA, C. A.; TRAIN, S.; RODRIGUES, L. C. Phytoplankton assemblages in a Brazilian subtropical cascading reservoir system. **Hidrobiologia**, v. 537, p. 99-109, 2005.

SOARES, M. C. S. et al. Eutrophication and retention time affecting spatial heterogeneity in a tropical reservoir. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 42, n. 3, p. 197–203, 2012.

SOUZA, A. O. **Modulação do sistema de assimilação de nitrogênio da cianobactéria tóxica de água doce *Microcystis aeruginosa***. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, R. C. R.; CARVALHO, M. C.; TRUZZI, A. C. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz.) Seenaya and Subba Raju (Cyanophyceae) dominance and a contribution to the knowledge of Rio Pequeno arm, Billings Reservoir, Brazil. **Reservoir Water Quality**, v. 13, n. 1, p. 73–81, 1998.

STEVENS, C. J. et al. Impact of nitrogen deposition on the species richness of grasslands. **Science**, v. 303, p. 1876-1879, 2004

SYRETT, P. J.; LEFTLEY, J. W. Nitrogen Metabolism. In: **Perspectives in Experimental Biology**. 2 ed. Pergamon Press,. p. 221-272, 2013.

TAKAMURA, N.; IWALRUMA, T.; YASUNO, M. Uptake of ^{13}C and ^{15}N (ammonium, nitrate and urea) by *Microcystis* in Lake Kasumigaura. **Journal of Plankton Research**, v. 9, n. 1, p. 151–165, 1987.

TOLEDO Jr., A. P. et al. A aplicação de modelos simplificados para a avaliação do processo da eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 12. Camboriú, 1983. **Anais...** Camboriú, 1983.p. 1-34.

TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 97–112, 2003.

TUNDISI, J. G. et al. A bloom of cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in UHE Carlos Botelho (Lobo / Broa) reservoir : a consequence of global change ? **Braz. J. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 507–508, 2015.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. The ecology of UHE Carlos Botelho (Lobo-Broa Reservoir) and its watershed, São Paulo, Brazil. **Freshwater Reviews**, v. 6, n. 2, p. 75–91, 2013.

TWOMEY, L. J.; PIEHLER, M. F.; PAERL, H. W. Phytoplankton uptake of ammonium, nitrate and urea in the Neuse River Estuary, NC, USA. **Hydrobiologia**, v. 533, n. 1, p. 123–134, 2005.

UTHERMÖHL, H. On the perfecting of quantitative phytoplankton method. **Inst. Ass. Theor. Comm.** v. 9. 1958.

VITOUSEK, P. M. et al. **Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences**. Washington, DC, US: Ecological Society of America, 1997.

VON SPERLING, E.; FERREIRA, A. C. DA S.; GOMES, L. N. L. Comparative eutrophication development in two Brazilian water supply reservoirs with respect to nutrient concentrations and bacteria growth. **Desalination**, v. 226, n. 1-3, p. 169–174, 2008.

WANG, L. et al. Weekly dynamics of phytoplankton functional groups under high water level fluctuations in a subtropical reservoir-bay. **Aquatic Ecology**, v. 45, n. 2, p. 197–212, 2011.

WARD, B. The Global Nitrogen Cycle. **Fundamentals of Geobiology**, v. 1, p. 36–48, 2012.

WILLIAMS, S. K.; HODSON, R. C. Transport of urea at low concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Bacteriology**, v. 130, n. 1, p. 266–273, 1977.

WU, Z.; SONG, L.; LI, R. Different tolerances and responses to low temperature and darkness between waterbloom forming cyanobacterium *Microcystis* and a green alga *Scenedesmus*. **Hydrobiologia**, v. 596, n. 1, p. 47–55, 2008.

XIN, L. et al. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 4, p. 379–381, 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3098–3102, 2011.

XU, J. et al. Nitrogen Sources and Rates of Phytoplankton Uptake in Different Regions of Hong Kong Waters in Summer. **Estuaries and Coasts**, v. 35, n. 2, p. 559–571, 2012.

YANG, Z. et al. Combined effects of temperature, light intensity, and nitrogen concentration on the growth and polysaccharide content of *Microcystis aeruginosa* in batch culture. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 130–135, 2012.

YIN, K.; HARRISON, P. J.; DORTCH, Q. Lack of ammonium inhibition of nitrate uptake for a diatom grown under low light conditions. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 228, n. 1, p. 151–165, 1998.

ZEHNDER, A.; GORHAM, P. R. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* KÜTZ. EMEND. ELENKIN. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 6, p. 645–660, 1960.

APÊNDICE

Tabela 6: Abundância relativa (%) das espécies encontradas no Reservatório do Lobo durante as coletas de out/14 a jul/15, nas duas profundidades estudadas, de 50% e 10% da RSFA.

Gênero	Espécie	Out/14		Jan/15		Abr/15		Jul/15	
		50% RSFA	10% RSFA	50% RSFA	10% RSFA	50% RSFA	10% RSFA	50% RSFA	10% RSFA
<i>Bacillariophyceae</i>	<i>Aulacoseira granulata</i>	5,4	5,3	2,2				2,1	0,6
	<i>Aulacoseira</i> sp.					0,6			
	<i>Cyclotella meneghiniana</i>							0,7	0,6
	<i>Cyclotella</i> sp.	1,6	0,9	6,5	12,0				
	<i>Synedra</i> sp.			2,9	8,0		0,6		
<i>Chlamydo- phyceae</i>	<i>Chlamydomonas gracilis</i>	1,6	2,7	6,5		1,9		2,1	3,1
	<i>Actinastrum hantschii</i>			26,6	25,6	14,8	14,3	4,9	2,5
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Ankistrodesmums falcatus</i>			1,4					
	<i>Ankistrodesmums</i> sp.		0,9						
	<i>Chlorella vulgaris</i>	3,1	1,8	2,9	3,2	2,6	2,4	2,8	1,3
	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>			0,7			0,6		
	<i>Kirchneriella obesa</i>			0,7	0,8		0,6	4,9	10,7
	<i>Monoraphidium contortum</i>	2,3		0,7					
	<i>Pediastrum duplex</i>				0,8				
	<i>Scenedesmus opoliensis</i>	0,8		2,2					
	<i>Scenedesmus</i> sp.					0,6		2,8	
	<i>Staurastrum corpulentum</i>				0,8				
	<i>Staurastrum</i> sp.		0,9						
<i>Cryptophyceae</i>	<i>Cryptomonas brasiliensis</i>							2,1	
	<i>Cryptomonas</i> sp.					1,3	1,8		
	<i>Cryptomonas tetrapyrenoidosa</i>	1,6	4,4	1,4	3,2				
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Anabaena</i> sp.		7,1	0,7					
	<i>Aphanizomenon</i> sp.				4,0	73,5	71,4	73,2	76,7
	<i>Aphanocapsa elachista</i>	8,5	1,8	2,9	4,0	3,2	2,4	0,7	
	<i>Aphanotece</i> sp.			13,7	1,6				

	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	73,6	71,7	24,5	33,6			
	<i>Geitlerinema</i> sp.		1,8					
	<i>Lyngbya</i> sp.					1,3	5,4	1,4
	<i>Merismopedia</i> sp.				0,8			
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,8		3,6	1,6		0,6	1,4
	<i>Pseudoanabaena limnetica</i>							2,5
							0,7	0,6
Dinophyceae	<i>Ceratium</i> sp.	0,8						1,3
	<i>Peridinium gatunense</i>		0,9					

ANEXOS

ANEXO A – Meio de Cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972)

Componente	Solução estoque (mg/L dH ₂ O)	Quantidade usada
Tris	--	500 mg
NaNO₃	85,01	1 ml
CaCl₂.2H₂O	36,76	1 ml
MgSO₄.7H₂O	36,97	1 ml
NaHCO₃	12,6	1 ml
NaSiO₃.9H₂O	28,42	1 ml
K₂HPO₄	8,71	1 ml
Trace Metals solution	ver receita seguinte	1 ml
Vitamins solution	ver receita seguinte	1 ml

**ANEXO B – Meio de Cultivo ASM -1 (GORHAM et al., 1964 modificado por
REYNOLDS; JAWORSKI, 1978)**

	Componente	Solução estoque (g/100 ml)	ml estoque/L de ASM-1
A	NaNO ₃	0,85	
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,204	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246	20
B	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,147	
	K ₂ HPO ₄	0,87	
	Na ₂ HPO ₄	0,71	2
	H ₃ BO ₃	2,48	
C	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,39	
	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,08	
	ZnCl ₂	0,44	0,1
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,019	
D	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,00014	
	EDTA.Na ₂	1,86	0,4

ANEXO C – Meio de Cultivo BG-11

Componente	Quantidade	Concentração da Solução Estoque
NaNO₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	30 g/200 mL dH ₂ O
K₂HPO₄ (Sigma P 3786)	10 mL/L	0.8 g/200 mL dH ₂ O
MgSO₄·7H₂O (Sigma 230391)	10 mL/L	1.5 g/200 mL dH ₂ O
CaCl₂·2H₂O (Sigma C-3881)	10 mL/L	0.72 g/200 mL dH ₂ O
Citric Acid·H₂O (Fisher A 104)	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O
Ferric Ammonium Citrate	10 mL/L	0.12 g/200 mL dH ₂ O
Na₂EDTA·2H₂O (Sigma ED255)	10 mL/L	0.02 g/200 mL dH ₂ O
Na₂CO₃ (Baker 3604)	10 mL/L	0.4 g/200 mL dH ₂ O
BG-11 Trace Metals Solution	1 mL/L	
Sodium Thiosulfate Pentahydrate (agar media only, sterile) (Baker 3946)	1 mL/L	49.8 g/200 mL dH ₂ O