Maíra Paula Tir Cortez

Aspectos ecológicos e sua relação com o
polimorfismo genético e a taxonomia convencional
de cianobactérias da represa Billings

Ecological aspects and their relationship to genetic
polymorphism and conventional taxonomy of
cyanobacteria from Billings reservoir

São Paulo
2013

Maíra Paula Tir Cortez

Aspectos Ecológicos e sua relação com o polimorfismo
genético e a taxonomia convencional de cianobactérias
da Represa Billings

Ecological aspects and their relationship to genetic
polymorphism and conventional taxonomy of
cyanobacteria from Billings reservoir

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Ecologia de Ecossistemas Terrestres
e Aquáticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo L.
M. Pompêo

São Paulo
2013

Cortez, Maíra

Aspectos Ecológicos e sua relação
com o polimorfismo genético e a taxonomia
convencional de cianobactérias da Represa

Billings

60p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Ecologia.

1. Fitoplâncton 2. Represa Billings 3.
Cinobactérias .

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Ecologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Marcelo L. M. Pompêo
Orientador

À minha família pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Agradeço aos amigos que fiz no laboratório de limnologia do Departamento de Ecologia (limnoamigos) por toda a ajuda e auxílio que me prestaram na realização das coletas, nas análises das minhas amostras e nas risadas sempre bem vindas.

Agradeço aos professores que me guiaram em vários aspectos durante esta fase: Cristina Nordi e Suzan Pantarotto. E ao meu orientador pelos bons conselhos e conversas Marcelo Pompêo.

Agradeço também aos doutores Ricardo Honda e à Patrícia Locosque, pois sem eles meu aprendizado das técnicas moleculares seria muito mais difícil e penoso. Vocês deixaram tudo mais fácil.

Agradeço às doutoras Ana Lúcia Brandimarte e Viviane Moschinni Carlos pelas colaborações durante meus estudos e coletas.

Agradeço ao Dr. Ernani Pinto e ao Dr. Ronaldo Leal Carneiro pelo auxílio na liofilização do material.

Agradeço à Universidade Federal de São Paulo pela colaboração com o laboratório da Prof^a. Dr^a Suzan Pantarotto e da Prof^a Cristina Nordi e os equipamentos do Prof. Dr. Wagner.

Agradeço à Fundação Parque Zoológico de São Paulo e à Unifesp pela colaboração no uso dos equipamentos do laboratório de biologia molecular comandado pela Dr^a Patrícia Locosque.

Agradeço aos amigos dos laboratórios da Unifesp que tornaram os momentos difíceis mais agradáveis.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio através da bolsa institucional.

Agradeço aos meus familiares. Em especial a minha mãe Janete Tir e ao meu marido Alex Cortez que sempre estiveram ao meu lado apoiando as minhas escolhas.

Obrigada a todos que de alguma forma me colocaram no rumo certo para as minhas realizações.

Índice

Resumo.....	viii
Abstract	ix
Capítulo I: Introdução Geral	1
1- Introdução	1
2- Local de Estudo: Complexo Billings.....	4
3- Objetivos gerais	6
4- Metodologia Geral	6
Capítulo II: Aspectos ecológicos e a comunidade fitoplanctônica na Represa Billings	8
Resumo:.....	8
Abstract:	9
1 Introdução.....	10
2 Metodologia	13
2.1 Campo	13
2.2 Análises.....	13
3 Resultados e Discussão	16
3.1 Profundidade máxima, Disco de Secchi e Zona Fótica	16
3.2 Temperatura	17
3.3 pH.....	19
3.4 Condutividade Elétrica (CE).....	20
3.5 Oxigênio Dissolvido (OD).....	22
3.6 Nutrientes dissolvidos e totais	24
3.7 Clorofila a, b e c e feofitina	25
3.8 Índice de Estado Trófico	25
3.9 Comunidade fitoplanctônica	27
3.10 Análises estatísticas.....	32
4 Discussão.....	35
4.1 Temperatura	35
4.2 Oxigênio Dissolvido (OD).....	36
4.3 Condutividade Elétrica (CE).....	36
4.4 pH.....	37
4.5 Clorofila	37
4.6 Comunidade fitoplanctônica	38
4.7 Nutrientes.....	40
4.8 Índice de Estado Trófico (IET)	43
4.9 Resolução CONAMA nº357	44

Capítulo III: Técnicas de biologia molecular para caracterização de cianobactérias da represa Billings	46
Resumo:.....	46
Abstract:	47
1- Introdução	48
2- Objetivos.....	49
3- Materiais e Métodos	49
4- Resultados e discussão.....	51
Capítulo IV: Conclusões gerais e perspectivas futuras.....	54
Referências Bibliográficas	56

Resumo

Com a rápida e desorganizada expansão humana o processo de eutrofização do complexo Billings está acelerado, afetando a dinâmica das comunidades aquáticas, em particular a fitoplanctônica. Uma das consequências da eutrofização são as florações de cianobactérias. Dentre os 150 gêneros de Cyanobacteria, cerca de 40 são produtores de toxinas (cianotoxinas). O reservatório Billings abrange áreas de 7 municípios e localiza-se a oeste da cidade de São Paulo, a 23° 47' S e 46° e 40' W, e a uma altitude de 746m. Seus usos incluem saneamento, geração de energia elétrica, lazer e abastecimento público.

Este trabalho tem como objetivos principais: a) efetuar análises em duas coletas (época chuvosa e época seca) das variáveis físicas, químicas e biológicas da água em três pontos no complexo Billings e em três profundidades (superfície, meio e fundo) (Capítulo II), b) Identificar e quantificar a comunidade de cianobactérias em cada um dos pontos e relacionar a riqueza e abundância com a qualidade das águas (Capítulo II) e c) Analisar qualitativamente as cianobactérias presentes, com uso de técnicas de biologia molecular, incluindo polimorfismo genético (Capítulo III); d) Comparar os dados obtidos com as análises qualitativas tradicionais com os dados das análises moleculares, associados à diferentes amostragens e em épocas do ano distintas (Capítulo IV).

As concentrações de clorofila-a, fósforo total e oxigênio dissolvido não estão em conformidade com a resolução CONAMA nº357 para corpos hídricos classe II na maioria das amostras dos pontos analisados. As florações fitoplanctônicas, foram presentes neste estudo na represa Billings, apresentando altos biovolumes de cianobactérias (20568,5 $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ no Ponto 1 em fevereiro de 2012) e de outros organismos fitoplanctônicos como os dinoflagelados (1000544 $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ no Ponto 2 em fevereiro de 2012).

Foram observadas florações do dinoflagelado *Ceratium furcoides* e da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* em agosto e fevereiro, respectivamente, levando a preocupações com relação às condições tróficas do reservatório e aos potenciais prejuízos que estas espécies podem causar. O reservatório foi classificado entre supereutrófico e hipereutrófico, indicando forte degradação da qualidade das águas nos pontos amostrados.

As análises moleculares não foram satisfatórias para a caracterização molecular das cianobactérias, pois as enzimas utilizadas para a digestão do DNA extraído e amplificado não encontraram o sítio para clivagem, sendo as adequações das reações e a utilização de outras enzimas as próximas etapas deste trabalho.

Palavras-chave: Billings, fitoplâncton, eutrofização, biologia molecular

Abstract

With the rapid expansion and disorganized human process of eutrophication complex Billings is accelerated, affecting the dynamics of aquatic communities, particularly the phytoplankton. One consequence of eutrophication are cyanobacterial blooms. Among the 150 genera of Cyanobacteria, about 40 are producers of toxins (cyanotoxins). The Billings reservoir covers seven counties and areas located west of the city of São Paulo, at 23 ° 47 'S and 46 ° 40' W, at an altitude of 746m. Its uses include sanitation, power generation, recreation and public supply.

This work has as main objectives: a) conduct analyzes in two samples (wet season and dry season) variables of the physical, chemical and biological characteristics of water at three points in the complex Billings and three depths (surface, middle and bottom) (Chapter II), b) Identify and quantify the community of cyanobacteria in each of the points and relate the richness and abundance with water quality (Chapter II) and c) analyze qualitatively the cyanobacteria present, using molecular biology techniques, including genetic polymorphism (Chapter III); d) Compare the data obtained with the traditional qualitative analyzes with data from molecular analyzes, associated with different samples and different seasons (Chapter IV).

The concentrations of chlorophyll-a, total phosphorus and dissolved oxygen are not in accordance with the Resolution CONAMA 357 for class II water bodies in most of the samples analyzed points. The phytoplankton blooms were present in this study in the Billings, showing high biovolumes cyanobacterial (20,568.5 $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ at Point 1 in February 2012) and other organisms as phytoplankton dinoflagellates (1000544 $\mu\text{m}^3/\text{mL}$ at Point 2 in February 2012).

Were observed blooms of the dinoflagellate *Ceratium furcoides* and the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in August and February, respectively, leading to concerns in relation to trophic conditions of the reservoir and the potential damage that these species can cause. The reservoir was ranked among supereutrophic and hypertrophic, indicating strong degradation of water quality in the sampled points.

Molecular analyzes were not satisfactory for the molecular characterization of cyanobacteria, as the enzymes used for digestion of DNA extracted and amplified not find the site for cleavage, and the adequacy of the reactions and the use of other enzymes the next steps of this work

Keywords: Billings, phytoplankton, eutrophication, molecular biology

Capítulo I - Introdução Geral

1- Introdução

A água é um componente indispensável à vida. O planeta Terra tem aproximadamente 71% de sua superfície coberta por água. Os principais locais de armazenamento dessa água são os oceanos que acumulam 97% da água superficial. Os outros 3% estão divididos entre as geleiras e calotas polares (2,4%) e entre rios, lagos e lagoas (0,6%). Os aquíferos acumulam 1,6% do total de água disponível no planeta e a atmosfera detém 0,001%. Porém, a obtenção de água potável em quantidade e qualidade suficiente para suprir as necessidades humanas será, sem dúvida, um dos desafios da humanidade neste século (TUNDISI, 2003).

O Brasil tem em sua extensão territorial a presença de grandes corpos d'água artificiais na bacia dos seus principais rios, as represas, cuja construção tem como objetivos principais a geração de energia elétrica, acumulação de água para abastecimento público e projetos de irrigação (COOKE, *et al.*, 1993). A construção desses reservatórios de água artificial altera radicalmente não só a limnologia e a ecologia das bacias hidrográficas, como também resulta em grande alteração econômica e social (TUNDISI, *et al.*, 1993). Consequentemente, o estudo e conservação destes ecossistemas artificiais tornam-se essenciais para a manutenção da qualidade de vida de todos os organismos que compõem a comunidade aquática e as comunidades ribeirinhas, incluindo o homem.

Segundo Tundisi (1990), os reservatórios distinguem-se dos outros ecossistemas aquáticos naturais por apresentarem sistemas de circulação horizontal e vertical produzidos por forças naturais e antrópicas que atuam na operação da represa de forma significativa, alterando os mecanismos ecológicos. Tempo de retenção, altura da tomada de água, sequência de operações em conjunto em cadeias dos reservatórios e morfometria complexa são exemplos de ações antrópicas que alteram significativamente o ecossistema de um reservatório.

Com o desenvolvimento sócio-econômico, os reservatórios passaram a ser utilizados como base do desenvolvimento regional (TUNDISI, *et al.*, 1999), intensificando os impactos devido às atividades humanas. Os impactos mais comuns segundo um estudo desenvolvido pelo “*International Lake Environment Committee*” em 600 lagos e represas em todo o planeta são: (1) degradação da qualidade da água, (2) diminuição dos recursos hídricos, (3) perda de biodiversidade, (4) alteração e perturbação do transporte de superfície e (5) deterioração da pesca.

Um dos impactos mais importantes que vem atingindo as represas é o da eutrofização, que afeta, com maior ou menor intensidade, praticamente todos os ecossistemas continentais. O aumento de nitrogênio e fósforo provocado por atividades humanas vem acelerando a eutrofização natural e provocando a deterioração da qualidade das águas de lagos e represas, tornando-as não disponíveis para vários usos e encarecendo o processo de tratamento para abastecimento. Uma das principais fontes desses nutrientes é o esgoto e segundo dados do Atlas de Saneamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), cerca de 50% ou menos do esgoto produzido no Brasil é coletado.

Neste contexto, a comunidade fitoplancônica possui um papel importante, podendo ser considerada como um discriminador ambiental, possibilitando a previsão dos efeitos de mudanças antropogênicas no ambiente através da classificação de espécies de acordo com a sua resposta a determinadas alterações ambientais. Com a análise da dinâmica do fitoplâncton é possível verificar amplas alterações na sua composição em resposta a alterações ambientais, como a eutrofização, sendo esta uma das melhores maneiras de se entender as mudanças no sistema (REYNOLDS, *et al.*, 2002). Além disso, as flutuações temporais e espaciais em sua composição e biomassa podem ser indicadores das alterações naturais ou antrópicas no ecossistema (PADISÀK & GRIGORSZKY, 2006; PADISÀK & REYNOLDS, 1998; PADISÀK, 1992).

As florações de microalgas, isto é, quando algumas espécies ocorrem em altas densidades afetam a qualidade das águas, pois estas aumentam a turbidez e geram um mau aspecto, podendo ainda dependendo da espécie, ocorrer alteração no odor e no sabor. Existe ainda a possibilidade de produção de toxinas por algumas linhagens de algas, especialmente de cianobactérias. Além disso, outros componentes da biota podem ser afetados, como a mortandade de peixes, causada tanto pela baixa concentração de oxigênio quanto pela presença de toxinas (BEYRUTH, 1996).

As cianobactérias são microorganismos procariotos capazes de realizar fotossíntese. Podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas. Cerca de 150 gêneros e 2000 espécies são conhecidas (CARVALHO, 2006) em diversos habitats possíveis como: águas doces, salobras, oceanos e ambiente subaéreo, com grandes amplitudes térmicas (APELDOORN *et al.*, 2007). A habilidade em sobreviver em diferentes intensidades luminosas, por produzir pigmentos acessórios que auxiliam em uma adsorção mais eficiente da luz, a capacidade de estocar nutrientes essenciais e metabólitos em seus citoplasmas, fixar nitrogênio atmosférico através do heterocito e acumular gás em vacúolos gasosos que permitem seu movimento e ajuste na coluna d'água, além da formação de acinetos para sobreviver em condições adversas; são

algumas das condições que favorecem o sucesso das cianobactérias nos ambientes aquáticos (VAN DEN HOEK *et al.*, 1997). O crescimento de cianobactérias é favorecido em ambientes lacustres rasos por suas características físicas e químicas tais como, pH de 6,0 a 9,0, temperaturas entre 15 e 30⁰C e alta concentração de nutrientes, particularmente, nitrogênio e fósforo.

As cianobactérias, portanto, são organismos de grande importância ecológica e sanitária, porém ainda temos escassez de informações mais detalhadas sobre estes organismos em corpos d'água doce brasileiros. O trabalho de Sant'Anna *et al.* (2007) vem cobrir parte desta escassez, ao estudar a composição da flora de cianobactérias em cinco represas da Bacia hidrográfica do Alto Tiete. Foram identificadas 48 espécies de cianobactérias, sendo que 17 delas foram consideradas potencialmente tóxicas. Outra conclusão obtida através desses dados, é que a biodiversidade e distribuição das cianobactérias estão relacionadas com as condições ambientais dos mesmos. A represa Billings mostrou-se o ambiente mais propício para o desenvolvimento de maior número de espécies (34), em função provavelmente de seu pH elevado. Um levantamento realizado recentemente (dados não publicados) realizado na represa Billings, onde a comunidade fitoplanctônica foi identificada e quantificada, apresentando considerável riqueza e elevada concentração. A presença de cianobactérias foi marcante e dominante em todas as amostras realizadas em um ciclo sazonal, portanto corroborando os resultados obtidos anteriormente por Sant'Anna *et al.* (2007).

Dada a importância das análises da estrutura e composição da comunidade de cianobactérias, pretende-se introduzir a utilização de uma abordagem polifásica, isto é, as análises morfológicas utilizadas tipicamente para o monitoramento da microbiota presente acrescidas/associadas ao uso de técnicas de biologia molecular.

Portanto, tendo em vista a importância ecológica, econômica e social dos ecossistemas aquáticos continentais, em particular a represa Billings, os dados a serem obtidos neste projeto fornecerão informações sobre a dinâmica da comunidade fitoplanctônica frente às variáveis físico-químicas, bem como permitirá comparar as análises morfológicas obtidas pela taxonomia tradicional associadas ao uso de técnicas de biologia molecular. Este conjunto de dados propiciará um conhecimento mais detalhado da dinâmica de cianobactérias local, fornecendo subsídios inclusive, para ações futuras de identificar o potencial de produção de toxinas por diferentes espécies de cianobactérias, com perspectiva de utilização destes dados para a detecção precoce de florações tóxicas em reservatório.

2- Local de Estudo: Complexo Billings

A Represa Billings tem um espelho d'água de 106,6km² e uma área de drenagem de 1560km² abrangendo integralmente o município de Rio Grande da Serra e parcialmente os municípios de São Paulo, São Bernardo do Campo, Diadema, Ribeirão Pires e Santo André. Localiza-se à sudeste da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) (Figura 1) e é o maior reservatório de água desta região. É composta por 8 subunidades conhecidas como braços, são elas: braço Rio Grande ou Jurubatuba, separado do Corpo Central pela barragem da Rodovia Anchieta; braço Rio Pequeno; braço Capivari; braço Pedra Branca; braço Taquacetuba; braço Bororé; braço Cocaia e braço Alvarenga (Figura 2).

Figura 1. Localização da bacia hidrográfica da Billings (Região Metropolitana de São Paulo, SP). Fonte: Capobianco (2002).

A represa foi construída em 1927 com a construção da Barragem de Pedreira no curso do Rio Grande. O intuito inicial para a construção da represa era aproveitar as águas da Bacia do Alto Tietê para a geração de energia na Usina Hidrelétrica de Henry Borden, localizada na cidade de Cubatão (WHATELY e CUNHA, 2006). O crescimento da cidade de São Paulo ao redor do rio Tietê e seus afluentes elevou os níveis de esgotos não tratados que lá são despejados. Esta intensificação da quantidade de nutrientes trazidos pelo rio Tietê começou a gerar problemas para a qualidade da água da represa.

A poluição na represa, gerada por esta situação levou à construção da Barragem Anchieta em 1981, isolando o braço Rio Grande onde ocorre o abastecimento público de água para a região do ABC paulista.

Figura 2. Bacia hidrográfica da Billings, municípios limítrofes, principais rios formadores e braços da represa Billings. Modificado de: <http://www.mananciais.org.br/site/mapas>

Devido aos problemas ambientais e aos riscos à saúde pública, em 1992, a Secretaria Estadual do Meio Ambiente restringiu o bombeamento das águas do rio Tietê para a represa Billings apenas às situações de emergência, como por exemplo, no caso de enchentes e riscos de colapso na produção de energia elétrica. Até hoje estes bombeamentos esporádicos ocorrem, aumentando consideravelmente os problemas com relação à qualidade da água.

3- Objetivos gerais

Os objetivos desta pesquisa são:

- a) Efetuar análises em duas épocas do ano (época seca e época chuvosa) das variáveis físicas, químicas e biológicas da água em 3 pontos do Complexo Billings (Capítulo II);
- b) Determinar a composição qualitativa e quantitativa das cianobactérias, utilizando a taxonomia tradicional e relacionar a sua riqueza e abundância com os parâmetros físico-químicos (Capítulo II);
- c) Análises qualitativas de cianobactérias presentes, através do uso de técnicas de biologia molecular, baseadas na avaliação do polimorfismo genético (Capítulo 3);
- d) Comparar os dados obtidos com as análises qualitativas de cianobactérias, com os dados das análises moleculares oferecendo informações mais abrangentes sobre a diversidade de organismos associados às diferentes amostragens, em épocas do ano distintas (Capítulo 4).

4- Metodologia Geral

Foram realizadas duas coletas, a primeira em 18 de agosto de 2011 (representando a estação seca) e a segunda em 29 de fevereiro de 2012 (representando a estação chuvosa).

Em cada período amostrado três pontos foram utilizados para a realização da coleta das amostras: o primeiro ponto está no começo do Taquacetuba, braço da represa onde ocorre a transposição de águas para a represa Guarapiranga que realiza abastecimento público e tem como coordenadas geográficas 23° 33'09.4" m E / 73° 77'06.2" m S; o segundo está no corpo central e próximo à margem da represa onde

existe grande ocupação humana e tem como coordenadas geográficas 23k 331634 m E / 7372672 m S; e o terceiro fica próximo ao local em que as águas do rio Pinheiros são bombeadas para a represa em situações de emergência e tem como coordenadas geográficas os pontos 23k 334604 m E / 7365330 m S (Figura 3). Em cada ponto de coleta foram retiradas amostras em três profundidades (superfície, meio e fundo).

As técnicas de coleta, armazenagem e conservação das amostras estão descritas em detalhes no Capítulo 2 e no Capítulo 3 de acordo com a finalidade da análise.

Figura 3. Localização da represa Billings e a representação dos pontos de coleta sugeridos.

Capítulo II - Aspectos ecológicos e a comunidade fitoplanctônica na Represa Billings

Resumo:

A Bacia Hidrográfica da Represa Billings está localizada na região sudeste da capital do estado de São Paulo e retém o maior volume de água armazenada da região metropolitana de São Paulo (RMSP). A eutrofização e, como consequência, a proliferação de fitoplâncton é uma realidade que vem sendo reafirmada por diversos estudos no local. O objetivo deste estudo foi analisar os aspectos físicos, químicos e biológicos da represa Billings, incluindo análise do fitoplâncton presente nas amostras. Dois pontos no corpo central da represa e um no braço Taquacetuba foram escolhidos para a realização deste trabalho.

Observou-se que as concentrações de clorofila-a, fósforo total e oxigênio dissolvido não estão em conformidade com os padrões estabelecidos pela resolução CONAMA nº 357 para corpos hídricos classe II (corpo central) e classe I (Taquacetuba), sendo equivalentes aos valores estabelecidos para as classes III e IV. Os pontos foram classificados como supereutróficos (Taquacetuba) e hipereutróficos (corpo central).

A densidade de fitoplâncton também foi preocupante, pois além de esperada floração de cianobactérias, principalmente *Microcystis aeruginosa*, houve também floração de um dinoflagelado (*Ceratium furcoides*). Ainda existe pouco conhecimento sobre esta espécie e por isso mais estudos são necessários para compreender quais efeitos para o ecossistema aquático e para saúde humana ela pode causar.

Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores que observam a intensa eutrofização que este ambiente aquático vem sofrendo e as consequências que tal processo pode causar, como a proliferação de fitoplâncton.

Palavras-chave: Fitoplâncton, eutrofização, *Ceratium furcoides*, *Microcystis aeruginosa*

Abstract:

The Watershed Dam Billings is located in the southeast of the state capital of São Paulo and holds the greatest volume of water stored in the metropolitan region of São Paulo (MASP). The eutrophication and, consequently, the proliferation of phytoplankton is a reality that has been affirmed by several studies on site. The aim of this study was to analyze the physical, chemical and biological dam Billings, including analysis of phytoplankton present in the samples. Two points in the main body of the dam and the arm Taquacetuba were chosen for this work.

It was observed that the concentrations of chlorophyll-a, total phosphorus and dissolved oxygen are not in accordance with the standards established by CONAMA Resolution 357 for water bodies class II (central body) and class I (Taquacetuba), being equivalent to the amounts set for classes III and IV. The points were classified as supereutrophic (Taquacetuba) and hypereutrophic (central body).

The density of phytoplankton was also worrying, because besides expected cyanobacterial blooms, especially *Microcystis aeruginosa*, there was also a dinoflagellate bloom (*Ceratium furcoides*). There is still little known about this species and therefore more studies are needed to understand which effects to the aquatic ecosystem and human health it can cause.

The results corroborate previous studies that observe the intense eutrophication that the aquatic environment is suffering and the consequences that this process can cause, such as algal blooms.

Keywords: phytoplankton, eutrophication, *Ceratium furcoides*, *Microcystis aeruginosa*

1 Introdução

Com o aumento da população humana e de atividades potencialmente impactantes o comprometimento da qualidade das águas dos ecossistemas aquáticos também se intensifica (STRASKRABA e TUNDISI, 2000; MARGALEF, 1991). A eutrofização, processo que consiste no aumento da concentração de nutrientes em ecossistemas aquáticos, é um processo que ocorre naturalmente, mas que pode ser acelerada pelas atividades antrópicas (POMPÊO *et al*, 2005). As águas continentais, em especial, apresentam mudanças preocupantes como as alterações no equilíbrio dinâmico das diversas espécies que habitam estes ambientes propiciando a abundância de poucas espécies que se adaptam melhor às constantes perturbações ao meio em detrimento às demais espécies menos versáteis.

Um dos principais problemas relacionados com o avanço da eutrofização é o aumento da incidência de florações fitoplanctônicas. A versatilidade nas adaptações às diversas condições ambientais pode ser muito bem observada nas cianobactérias, organismos datados desde o período Pré-Cambriando. Elas têm capacidade de realizar fotossíntese em ambientes com pouca luz, graças às ficobiliproteínas, seus pigmentos fotossintéticos acessórios; sobrevivem em locais com alta variação de temperatura; possuem heterócitos que são estruturas especializadas em armazenar nitrogênio atmosférico para garantir seu crescimento e desenvolvimento em ambientes com pouca disponibilidade deste nutriente e, além disso, podem armazenar fósforo na forma de grãos de polifosfato em seu citoplasma. Em condições adversas, podem produzir acinetos que possuem um mecanismo semelhante a esporos de resistência, que possibilitam a existência da célula por períodos maiores. Produzem produzir substâncias tóxicas a outros organismos e realizam uma movimentação vertical na coluna d'água com o auxílio de aerótopos, possibilitando a busca tanto pela profundidade ideal de acordo com a concentração de nutrientes, quanto pela intensidade luminosa (CARVALHO, 2006).

Elas são uma parte importante do fitoplâncton e do perifíton nos ecossistemas aquáticos (OLIVER e GRANF, 2000) onde estão presentes em toda a coluna d'água, no sedimento e sobre macrófitas aquáticas. São organismos procariotos que realizam fotossíntese consumindo o gás carbônico (CO₂) e liberando oxigênio (O₂) fato que às relaciona com grandes mudanças na atmosfera da Terra (FARQUHAR *et al*, 2000).

Habitam ambientes dulcícolas, salobros, marinhos e terrestres (CARVALHO, 2006) e habitats extremos (WEHR e SHEATH, 2003).

Alguns gêneros de cianobactérias participam ou formam florações, também conhecidas como *blooms*, que são descritos como uma proliferação de um ou dois táxons fitoplanctônicos gerando uma biomassa significativamente mais elevada do que a média do fitoplâncton presente no ecossistema (ZOKARY e ROBERTS, 1990).

Os fatores que influenciam tais proliferações das cianobactérias baseiam-se nas concentrações de nitrogênio e fósforo, na incidência luminosa, na disponibilidade de oxigênio dissolvido, nos valores de pH, na variação da temperatura e nas relações ecológicas presentes no ambiente.

As florações de cianobactérias são consideradas um grave problema ambiental e de saúde pública, principalmente em reservatórios utilizados para o abastecimento público, como é o caso da Billings. Tal preocupação é baseada no fato de diversas espécies terem potencial para a produção de toxinas (metabólitos secundários) que representam um risco à saúde da comunidade que utiliza esta fonte de água para consumo, além do comprometimento ecológico do ecossistema em questão.

Os reservatórios em geral, são utilizados para a geração de energia elétrica, abastecimento público, irrigação, pesca, práticas esportivas e recreativas e também para fins paisagísticos. Tais usos estão comprometidos pelo intenso e não planejado crescimento dos centros urbanos e também das áreas industriais e agrícolas que aumentam as descargas pontuais e difusas de esgotos que chegam a estes reservatórios. Este aporte de nutrientes ocasiona a aceleração do processo natural de eutrofização do ambiente. A elevação do nível de eutrofização causa a degradação da qualidade da água, pois há mudanças na cor, na turbidez e na transparência, há grande consumo de oxigênio ocasionado pela degradação da matéria orgânica, há proliferação excessiva de fitoplâncton e macrófitas e produção de substâncias tóxicas, gases e odores desagradáveis (AZEVEDO-NETO, 1988). A eutrofização também está relacionada ao desequilíbrio das relações ecológicas levando à diminuição das populações de organismos existentes e até mesmo ao desaparecimento de muitas delas.

Os fatores negativos advindos da degradação dos ecossistemas aquáticos utilizados pela população humana trazem como consequência problemas de saúde pública e dificuldades no tratamento adequado desta água para consumo, além do aumento nos custos deste tratamento.

A ocupação das margens da represa Billings ocorreu de forma intensa e irregular. Em 1976, foi criada a Lei de Proteção aos Mananciais que implementou restrições ambientais que buscam dificultar a ocupação irregular nestas regiões. Mas a ocupação irregular ainda existe e a fiscalização não é tão efetiva como deveria ser (CAPOBIANCO, 2002).

No ano de 2005, os padrões de qualidade de água no Brasil, a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e as condições e padrões para o lançamento de efluentes foram regulamentados através da Resolução CONAMA nº357 (BRASIL, 2005). Nesta resolução encontramos os corpos d'água classificados em 5 classes distintas e com os padrões que as definem.

O enquadramento dos corpos hídricos do Estado de São Paulo foi definido através do Decreto Estadual nº 10.755 em 1977 (SÃO PAULO, 1977) e o braço Taquacetuba da represa Billings foi classificado como corpo hídrico classe I.

Tabela 1 - Padrões de qualidade da água doce com a classe de uso segundo a Resolução CONAMA no. 357 de 17/03/05.

PARÂMETROS	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV
OD*	> 6 mg/L	> 5 mg/L	> 4 mg/L	> 2,0 mg/L
pH	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0	6,0 a 9,0.	6,0 a 9,0.
Fósforo total	< 0,02 mg/L	< 0,030 mg/L	< 0,05 mg/L	
Nitrato	< 10 mg/L	< 10 mg/L	< 10 mg/L	
Nitrito	< 1 mg/L	< 1 mg/L	< 1 mg/L	
N amoniacal	< 3,7 mg/L para pH < 7,5 < 2,0 mg/L para 7,5 < pH < 8,0 < 1,0 mg/L para 8,0 < pH < 8,5 < 0,5 mg/L para pH > 8,5	< 3,7 mg/L para pH < 7,5 < 2,0 mg/L para 7,5 < pH < 8,0 < 1,0 mg/L para 8,0 < pH > 8,5 < 0,5 mg/L para pH > 8,5	< 13,3 mg/L para pH < 7,5 < 5,6 mg/L para 7,5 < pH < 8,0 < 2,2 mg/L para 8,0 < pH < 8,5 < 1,0 mg/L para pH > 8,5	
Clorofila- <i>a</i>	< 10 µg/L	< 30 µg/L	< 60 µg/L	

* em todas as amostras

2 Metodologia

2.1 Campo

Nos pontos de coleta serão determinadas a transparência da água através do disco de Secchi (WETZEL e LIKENS, 1991), perfis de temperatura da água, concentração do oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH.

As amostras de água para análises químicas foram coletadas com auxílio de garrafas de Van Dorn com capacidade para 5 litros e posteriormente armazenadas em galões de polietileno (5 litros), os quais ficaram acondicionados em bolsas térmicas, visando preservar a temperatura da água e proteger as amostras do contato da luz direta.

Para análise quantitativa de fitoplâncton a garrafa de Van Dorn também foi utilizada e 100 mL de amostra foram armazenados em recipientes protegidos da luz e do calor e fixados com lugol acético para cada ponto e profundidade estudada. Utilizando uma rede de plâncton de malha de 20µm o fitoplâncton foi coletado e fixado com formol 4% para análise qualitativa.

2.2 Análises

2.2.1 Variáveis abióticas

As concentrações de nutrientes dissolvidos e em concentração total foram analisadas no laboratório seguindo as seguintes referências (Tabela 2):

Tabela 2 - Concentrações dos nutrientes dissolvidos e em concentração total analisados em todos os pontos amostrados.

Variável	Limite de detecção	Unidade	Método	Referência
	do método			
Nitrogênio total (NT)	< 5,0	µg/L	Espectrofotométrico	Valderrama (1981)
Fósforo total (PT)	< 10,0	µg/L	Espectrofotométrico	Valderrama (1981)
Nitrito (N-NO ₂ ⁻)	< 8,0	µg/L	Espectrofotométrico	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Nitrato (N-NO ₃ ⁻)	< 5,0	µg/L	Espectrofotométrico	Mackereth <i>et al.</i> (1978)
Amônio dissolvido (N-NH ₄ ⁺)	< 4,2	µg/L	Espectrofotométrico	Koroleff (1976)
Silicato (SiO ₂)	< 1,0	mg/L	Espectrofotométrico	Golterman <i>et al.</i> (1978)
Ortofosfato (PO ₄ ³⁻)	< 10,0	µg/L	Espectrofotométrico	Strickland & Parsons (1960)

Os valores de temperatura da água (T), pH, Condutividade elétrica (CE) e oxigênio dissolvido (OD) foram obtidos através do uso de sonda multiparâmetros YSI 556. A profundidade máxima do reservatório nos pontos estudados e a profundidade do Disco de Secchi tiveram seus valores verificados em campo. Realizou-se o cálculo da Zona Fótica (região da massa d'água iluminada com até 1% da luz superficial) utilizando a profundidade do Disco de Secchi multiplicada pelo fator 2,709 (COLE, 1979).

2.2.2 Variáveis bióticas

2.2.2.1 Análises qualitativas de fitoplâncton

Amostras conservadas com formol 4% foram utilizadas para a análise qualitativa do fitoplâncton. Foram utilizados microscópio ótico e microscópio ótico invertido Carl Zeiss Axiovert40C e naquim para visualização da bainha mucilaginosa de algumas espécies. Como referência foram utilizados os trabalho de Van den Hoek *et al* (1997) e para cianobactérias foi utilizada a classificação proposta por Komárek & Anagnostidis (1989, 1998, 2005).

2.2.2.2 Análises quantitativas de fitoplâncton

As amostras para análise quantitativa foram fixadas com lugol acético 1% e antes da contagem as amostras foram homogeneizadas. A densidade de fitoplâncton (célula/mL) foi obtida através do método de Utermöhl (1958), com auxílio de microscópio invertido Carl Zeiss com aumento de 400X, retículo de Whipple e câmaras de sedimentação. Foram considerados como um indivíduo organismos unicelulares, colônias, cenóbios e cada 25µm de tricomas e filamentos. A contagem foi realizada analisando-se campos aleatórios do retículo de Whipple e o número de campos contados foi definido com base em Jardim *et al.* (2002) que recomenda a contagem de 100 indivíduos da espécie predominante para atingir um limite de confiança de 95% e precisão/variação estimada em 20%.

$$Precision \% = \frac{2 * 100}{\sqrt{\text{number of cells counted}}}$$

A transformação das contagens no microscópio para a densidade do fitoplâncton é feita pela equação:

$$Cells\ L^{-1} = N * \left(\frac{A_t}{A_c} \right) * \frac{1000}{V}$$

$$Cells\ mL^{-1} = N * \left(\frac{A_t}{A_c} \right) * \frac{1}{V}$$

V: volume of counting chamber (mL)

A_t: total area of the counting chamber (mm²)

A_c: counted area of the counting chamber (mm²)

N: number of units (cells) of specific species counted

C: concentration (density) of the specific species

2.2.2.3 *Biovolume*

Para o cálculo do biovolume conta-se o número de células existentes e multiplica-se pelo volume celular médio de cada espécie. O volume de cada tipo celular foi calculado de acordo com aproximações geométricas e sempre que possível cerca de 20 a 30 células em cada amostra foram contabilizados e o volume médio final foi o utilizado. Para calcular o volume das células usam-se formas geométricas semelhantes à estrutura do organismo, como demonstrado por Hillebrand *et al.* (1999) e Sun & Liu (2003).

2.2.2.4 *Clorofila e feopigmentos*

Foram determinadas as concentrações das clorofilas *a*, *b* e *c* e feopigmentos, utilizando acetona 90% como solvente, segundo Jeffrey & Humphrey (1975), Strickland & Parsons (1960), Wetzel & Likens (1991).

2.2.2.5 *Índice de Estado Trófico (IET)*

O índice de estado trófico foi calculado segundo Lamparelli (2004) que utiliza as concentrações de fósforo total e de clorofila-*a* para estimar o grau de trofia de reservatórios. As equações utilizadas estão listadas a seguir:

$$IET = [IET (Cl-a) + IET (PT)]/2$$

Onde:

$$IET (Cl-a) = 10\{6 - [(0,92 - 0,34 \ln Cl a) / n 2]\};$$

$$IET (PT) = 10\{6 - [(1,77 - 0,42 \ln PT) / \ln 2]\};$$

PT = fôscoro total ($\mu\text{g/L}$);

Cl-a = Clorofila-a ($\mu\text{g/L}$);

Ln = logaritmo natural

Os limites utilizados foram: ultraoligotrófico ($IET \leq 47$), oligotrófico ($47 < IET \leq 52$), mesotrófico ($52 < IET \leq 59$), eutrófico ($59 < IET \leq 63$), supereutrófico ($63 < IET \leq 67$) e hipereutrófico (> 67).

2.2.3 Estatísticas

As análises estatísticas foram utilizadas com a finalidade de comparar as densidades fitoplancônicas encontradas e as variáveis abióticas obtidas.

Foram calculados os graus de associação entre os fatores bióticos e os abióticos. Tal avaliação foi feita através de um teste não-paramétrico, definido pelo Coeficiente de Correlação de Spearman com nível de significância de $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Profundidade máxima, Disco de Secchi e Zona Fótica

Os dados de profundidade máxima de cada ponto, profundidade do disco de Secchi e o cálculo da zona fótica estão localizados na tabela 1.

Para uma melhor análise comparativa entre os três pontos um gráfico com os dados foi criado (Figura 1).

Tabela 3 - Informações referentes às profundidades máximas, ao Disco de Secchi e às zonas fóticas nos pontos coletados.

Ponto e data	Profundidade máxima (m)	Disco de Secchi (m)	Zona Fótica (m)
Agosto/Ponto 1	10,80	1,3	3,52
Agosto/Ponto 2	7,00	1,4	3,79
Agosto/Ponto 3	5,45	0,5	1,35
Fevereiro/Ponto 1	13,70	0,85	2,30
Fevereiro/Ponto 2	15,30	0,68	1,84
Fevereiro/Ponto 3	10,50	0,57	1,54

Figura 4 - Gráfico com informações referentes às profundidades máximas (m), às profundidades alcançadas com o disco de Secchi (m) e às zonas fóticas dos pontos de coleta.

3.2 Temperatura

A temperatura apresentou um declínio na coluna d'água em direção ao fundo nos 3 pontos das duas datas de coleta, com a formação de microestratificações. No ponto 1 a temperatura variou de 19,34°C a 18,31°C em agosto e de 28°C a 25,4°C em fevereiro (Figura 2). No ponto 2 a maior temperatura encontrada foi de 19,57°C em agosto e 29°C em fevereiro e a menor foi de 19,14°C em agosto e 23,6°C em fevereiro (Figura 3). O ponto 3 apresentou a maior variação em agosto, em relação aos outros pontos, com valores de 20,35°C até 18,85°C, em fevereiro os valores encontraram-se na faixa de 28,7°C a 23,7°C (Figura 4).

Figura 5 - Variação da temperatura no ponto 1 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 6 - Variação da temperatura no ponto 2 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 7 - Variação da temperatura no ponto 3 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

3.3 pH

O perfil de pH também apresentou um declínio em todos os pontos, com acentuada redução do pH em direção ao fundo da represa, principalmente em fevereiro. No ponto 1 (Figura 5) apresentou variação de 8,19 a 6,81 no mês de agosto e de 9 a 7,2 no mês de fevereiro. O ponto 2 (Figura 6) apresentou variação de 7,75 a 7,19 em agosto e de 10,08 a 7,3 em fevereiro. Já o ponto 3 (Figura 7) apresentou em agosto uma variação de 7,34 a 6,83 e em fevereiro de 9,6 a 7,3.

Figura 8 - Variação do pH no ponto 1 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012

Figura 9 - Variação do pH no ponto 2 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 10 - Variação do pH no ponto 3 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012

3.4 Condutividade Elétrica (CE)

Já a condutividade elétrica (CE) não apresentou marcado padrão, como observado para a temperatura e o pH, mas sugere tendência de elevação nos valores em direção ao fundo da represa (Figuras 8, 9 e 10). Pode ser observada pequena variação no ponto 1 em agosto, mas o valor encontrado nas maiores profundidades (182 $\mu\text{S}/\text{cm}$) foi maior do que o encontrado na superfície (179 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Em fevereiro os valores variaram de 190 a 206 $\mu\text{S}/\text{cm}$, mantendo o padrão de aumento da CE com o aumento da profundidade (Figura 8).

No ponto 2 não houve variação na CE em agosto e o valor de 191 $\mu\text{S}/\text{cm}$ foi mantido em todas as profundidades. Em fevereiro houve variação de 167 a 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ com aumento da CE nas maiores profundidades (Figura 9).

Já no ponto 3 ocorreu um declínio em direção ao fundo do corpo d'água (226 a 210 $\mu\text{S}/\text{cm}$) em agosto. Em fevereiro observou aumento da CE em direção ao fundo do corpo d'água com variação de 169 a 197 $\mu\text{S}/\text{cm}$, houve apenas uma pequena variação inicial próximo à superfície (Figura 10).

Figura 11 - Variação da Condutividade Elétrica (CE) no ponto 1 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 12 - Variação da Condutividade Elétrica (CE) no ponto 2 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 13 - Variação da Condutividade Elétrica (CE) no ponto 3 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

3.5 Oxigênio Dissolvido (OD)

As concentrações de oxigênio dissolvido apresentaram um perfil de declínio em direção ao fundo da coluna d'água nos 3 pontos nas duas coletas realizadas (Figuras, 11, 12 e 13), atingindo valores próximos a anoxia no fundo, particularmente em fevereiro.

Em agosto de 2011 o OD no ponto 1 variou de 10,07 a 4,96 mg/L. Em fevereiro a variação no mesmo ponto foi de 7,8 a 1,0 mg/L (Figura 11).

No ponto 2 a variação de OD ficou entre 10,06 e 6,34 mg/L em agosto e entre 8,6 e 1,6 mg/L em fevereiro (Figura 12).

No ponto próximo à barragem Pedreira (ponto 3) no mês de agosto a variação de OD ficou entre 9,1 e 5,0 mg/L, já no mês de fevereiro os valores oscilaram entre 7,4 e 2,1 mg/L (Figura 13).

Figura 14 - Variação da concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) no ponto 1 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 15 - Variação da concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) no ponto 2 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

Figura 16 -Variação da concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) no ponto 3 no mês de agosto de 2011 e fevereiro de 2012.

3.6 Nutrientes dissolvidos e totais

A Tabela 4 apresenta todas as concentrações encontradas com as análises químicas da água.

Tabela 4 - Resultados das concentrações dos nutrientes analisados: Nitrito (N-NO_2), Nitrato (N-NO_3), Amônio (N-NH_4^+), Nitrogênio Total (NT), Fósforo Total (PT), Fostato inorgânico (Pi) e Silica (SiO_2)

Pontos de coleta	Prof. (m)	N- NO_2 ($\mu\text{g/L}$)	N- NO_3^- ($\mu\text{g/L}$)	N- NH_4^+ ($\mu\text{g/L}$)	NT ($\mu\text{g/L}$)	PT ($\mu\text{g/L}$)	Pi ($\mu\text{g/L}$)	SiO_2 (mg/L)
Ponto 1 (agosto/2011)	S	14,8	432,3	<L.D.	666,2	76,9	<L.D.	2,1
	M	22,0	1063,1	<L.D.	1527,0	214,2	<L.D.	2,2
	F	22,1	200,3	83,2	404,5	25,5	<L.D.	<L.D.
Ponto 2 (agosto/2011)	S	18,5	497,9	<L.D.	508,7	72,9	<L.D.	2,5
	M	18,7	408,3	<L.D.	869,8	95,7	<L.D.	2,0
	F	20,8	456,3	56,4	836,7	101,5	<L.D.	<L.D.
Ponto 3 (agosto/2011)	S	28,3	534,3	<L.D.	634,2	85,1	<L.D.	2,6
	M	31,6	389,1	28,3	743,1	181,5	<L.D.	1,7
	F	52,8	328,3	98,2	921,9	107,2	<L.D.	<L.D.
Ponto 1 (fevereiro/2012)	S	24,9	1045,9	<L.D.	1707,6	261,6	<L.D.	1,6
	M	25,0	245,9	48,3	354,7	72,9	<L.D.	1,3
	F	26,2	128,1	68,3	938,5	103,9	<L.D.	<L.D.
Ponto 2 (fevereiro/2012)	S	22,5	328,4	<L.D.	566,7	59,8	<L.D.	2,2
	M	19,7	865,4	21,5	1251,1	282,1	<L.D.	1,9
	F	27,8	997,1	39,4	1402,1	183,2	<L.D.	<L.D.
Ponto 3 (fevereiro/2012)	S	29,6	1098,2	<L.D.	1714,1	268,2	<L.D.	2,9
	M	54,6	694,0	34,8	979,9	128,4	<L.D.	2,1
	F	66,8	789,5	79,8	1330,5	235,5	<L.D.	1,5

3.7 Clorofila a, b e c e feofitina

Em agosto de 2011, a clorofila a (Cl a) apresentou diminuição em direção ao fundo no ponto 3 (57,20 a 26,42 $\mu\text{g/L}$) e aumento nos pontos 1 (39,29 a 45,97 $\mu\text{g/L}$) e 2 (32,61 a 62,01 $\mu\text{g/L}$). A clorofila b (Cl b) diminuiu nos pontos 1 (32,42 a 27,77 $\mu\text{g/L}$) e 3 (45,49 a 10,58 $\mu\text{g/L}$) e aumento no ponto 2 (31,19 a 42,67 $\mu\text{g/L}$). A clorofila c (Cl c) aumentou nos 3 pontos, no ponto 1 os valores encontrados foram 10,53 a 18,64 $\mu\text{g/L}$, no ponto 2 18,22 a 33,03 $\mu\text{g/L}$ e no ponto 3 25,009 a 26,12 $\mu\text{g/L}$. A feofitina a (Feo a) diminuiu nos pontos 1 (17,77 a -19,40 $\mu\text{g/L}$) e 2 (20,52 a -11,49 $\mu\text{g/L}$) e aumentou no ponto 3 (14,64 a 23,15 $\mu\text{g/L}$).

Em fevereiro de 2012 a clorofila a (Cl a) apresentou diminuição em direção ao fundo nos 3 pontos, sendo: 80,19 a 12,83 $\mu\text{g/L}$ no ponto 1, 88,2 a 12,83 $\mu\text{g/L}$ no ponto 2 e 163,05 a 31,0 $\mu\text{g/L}$ no ponto 3. A clorofila b (Cl b) diminuiu em direção ao fundo do reservatório nos pontos 1 (9,54 a 0 $\mu\text{g/L}$) e 3 (38,92 a 9,24 $\mu\text{g/L}$) e variou sem padrão no ponto 2 (15,79 a 2,85 $\mu\text{g/L}$). A clorofila c (Cl c) no ponto 1 apresentou apenas 1,0 $\mu\text{g/L}$ na profundidade do meio e 0 na superfície e no fundo, no ponto 2 variou sem padrão de 7,92 a 0 $\mu\text{g/L}$, no ponto 3 também não houve padrão e a variação ficou em 9,23 $\mu\text{g/L}$ no meio e 0,04 $\mu\text{g/L}$ no fundo. A feofitina a (Feo a) aumentou em direção às maiores profundidades no ponto 1 (0 a 0,64 $\mu\text{g/L}$) e no ponto 3 (0 a 6,78 $\mu\text{g/L}$) e não teve padrão estabelecido no ponto 2 (0 a 9,24 $\mu\text{g/L}$).

3.8 Índice de Estado Trófico

O cálculo do índice de estado trófico para reservatórios utiliza as concentrações de fósforo total (PT) e/ou as concentrações de clorofila-a (Cl-a). Segundo Lamparelli (2004), um melhor resultado se dá quando ambos os valores (PT e Cl-a) são utilizados para os cálculos e relacionados em uma média aritmética simples (Média). O valor desta média indica o nível trófico do corpo hídrico. Os valores obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 5 e uma comparação entre os pontos amostrais é feita na Figura 14.

Tabela 5 – Índices de estado trófico (IET) calculados para todas as profundidades dos pontos amostrais. Incluindo a Média Geral que representa o IET do ponto amostral.

Pontos de coleta		PT (µg/L)	Cl-a (µg/L)	IET (PT)	IET (Cl-a)	IET	Média Geral	Nível Trófico
Ponto 1 (ago/2011)	S	76,9	39,2931	68,61263	64,7343	66,67346		
	M	214,2	33,6798	74,81982	63,97817	69,39899	66,67346	Supereutrófico
	F	25,5	45,9756	61,92419	65,50471	63,71445		
Ponto 2 (ago/2011)	S	72,9	32,6106	68,28896	63,81992	66,05444		
	M	95,7	35,2836	69,93788	64,20635	67,07212	67,07212	Hipereutrófico
	F	101,5	62,0136	70,29441	66,97255	68,63348		
Ponto 3 (ago/2011)	S	85,1	57,2022	69,22657	66,5764	67,90148		
	M	181,5	27,2646	73,81607	62,94166	68,37886	67,90148	Hipereutrófico
	F	107,2	6,42	70,62548	55,84795	63,23672		
Ponto 1 (fev/2012)	S	261,6	66,825	76,03112	67,33908	71,6851		
	M	72,9	47,5794	68,28896	65,67291	66,98093	66,98093	Supereutrófico
	F	103,9	10,692	70,43602	58,34997	64,39299		
Ponto 2 (fev/2012)	S	59,8	110,2613	67,08871	69,79546	68,44209		
	M	282,1	46,5102	76,48826	65,56142	71,02484	68,44209	Hipereutrófico
	F	183,2	15,5034	73,87256	60,17255	67,02255		
Ponto 3 (fev/2012)	S	268,2	203,8163	76,18209	72,80903	74,49556		
	M	128,4	62,5482	71,71891	67,01465	69,36678	70,03068	Hipereutrófico
	F	235,5	38,7585	75,39425	64,6671	70,03068

Figura 17 – Comparação entre os Índices de Estado Trófico dos pontos amostrais nas duas datas de coleta

3.9 Comunidade fitoplanctônica

No total foram identificados 31 táxons de organismos fitoplanctônicos na coleta realizada em agosto de 2011, sendo 2 Cyanophyceae, 12 Chlorophyceae, 2 Zygnemaphyceae, 1 Cryptophyceae, 4 Dinophyceae, 6 Euglenophyceae e 4 Bacillariophyceae (Tabela 8). Houve domínio em biovolume (Tabela 6) da classe Dinophyceae, em especial da espécie *Ceratium furcoides* em todos os pontos e profundidades analisados, seguida da classe Cyanophyceae e Bacillariophyceae.

Tabela 6 - Biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) de organismos em agosto de 2011 em todos os pontos amostrais;

	Biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) de organismos em agosto de 2011								
	P1S	P1M	P1F	P2S	P2M	P2F	P3S	P3M	P3F
CYN	1341,25	827,25	399,875	1229	304	274,75	1574,25	1564,625	536,75
CHL	560	640	0	287	6	3	480	0	0
ZYG	0	35	0	0	0	0	21	28	0
CRP	40	0	90	0	0	0	0	70	50
DIN	2393694	1642878	2332021	2018169	2060737	1676496	2524510	2282410	1366458
EUG	660	915	495	895	615	275	685	750	495
BAC	3390	4920	3000	3840	3000	1380	3840	1080	0
CRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: Ponto 1 Superfície (P1S), Ponto 1 Meio (P1M), Ponto 1 Fundo (P1F), Ponto 2 Superfície (P2S), Ponto 2 Meio (P2M), Ponto 2 Fundo (P2F), Ponto 3 Superfície (P3S), Ponto 3 Meio (P3M) e Ponto 3 Fundo (P3F); Cianobactérias (CYN), Clorofíceas (CHL), Zignemafíceas (ZYG), Criptofíceas (CRP), Dinofíceas (DIN), Euglenofíceas (EUG), Bacilariofíceas (BAC) e Crisofíceas (CRS).

Em fevereiro de 2012 a comunidade fitoplanctônica apresentou 40 táxons, sendo 13 Cyanophyceae, 11 Chlorophyceae, 2 Zygnemaphyceae, 1 Cryptophyceae, 4 Dinophyceae, 6 Euglenophyceae e 3 Bacillariophyceae (Tabela 8). Houve floração de cianobactérias na data da coleta com predomínio de *Microcystis aeruginosa*. O biovolume novamente apresentou maiores valores para a classe Dinophyceae, com destaque para a espécie *Ceratium furcoides*, seguida das classes Chlorophyceae e Dinophyceae (Tabela 7).

Tabela 7 - Biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) de organismos em fevereiro de 2012.

Biovolume ($\mu\text{m}^3/\text{mL}$) de organismos em fevereiro de 2012									
	P1S	P1M	P1F	P3S	P3M	P3F	P2S	P2M	P2F
CYN	20581	20568,5	15576,75	34748	16885,25	6982,5	12355	10420,25	2833,5
CHL	40673	23818	294	16621	20564	64	8782	8064	1929
ZYG	119	91	42	140	126	56	98	112	35
CRP	80	120	240	290	140	280	30	100	120
DIN	330272	731945	723229	828482	621439	889260	347704	650272	1000544
EUG	505	1100	660	1260	955	715	490	855	450
BAC	3330	4770	2880	3090	1680	4320	4530	3390	960
CRS	30	30	0	30	0	0	0	0	0

Legenda: Ponto 1 Superfície (P1S), Ponto 1 Meio (P1M), Ponto 1 Fundo (P1F), Ponto 2 Superfície (P2S), Ponto 2 Meio (P2M), Ponto 2 Fundo (P2F), Ponto 3 Superfície (P3S), Ponto 3 Meio (P3M) e Ponto 3 Fundo (P3F); Cianobactérias (CYN), Clorofíceas (CHL), Zignemafíceas (ZYG), Criptofíceas (CRP), Dinofíceas (DIN), Euglenofíceas (EUG), Bacilariofíceas (BAC) e Crisofíceas (CRS).

Tabela 8 - Relação de táxons encontrados em todos os pontos e nas duas coletas realizadas.

TÁXONS	Agosto de 2011									Fevereiro de 2012								
	P1 S	P1 M	P1 F	P2 S	P2 M	P2 F	P3 S	P3 M	P3 F	P1 S	P1 M	P1 F	P2 S	P2 M	P2 F	P3 S	P3 M	P2 F
Cyanophyceae																		
<i>Anabaena circinalis</i> Rabenhorst										X	X	X	X	X		X	X	X
<i>Anabaena</i> sp.				X						X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Anabaena spiroides</i> Klebahn										X	X	X	X	X		X	X	X
<i>Aphanocapsa</i> sp.													X		X			
<i>Chroococcus</i> sp.					X					X	X		X	X		X		
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju																		
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützinger) Kützinger	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Microcystis panniformis</i> Komárek <i>et al</i>		X								X			X	X	X		X	
<i>Microcystis protocystis</i> Crow	X			X			X	X		X				X		X		
<i>Phormidium</i> sp.																		
<i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek										X	X		X	X				
<i>Pseudoanabaena galeata</i> Böcher, K.		X		X	X								X	X	X			
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X		X	X	X
<i>Raphidiopsis</i> sp.																		
<i>Snowella</i> sp.										X			X	X				
<i>Sphaerocavum brasiliensis</i> Azevedo & Sant'Anna		X						X			X							
<i>Woronichinia</i> sp.											X			X				
Chlorophyceae																		
<i>Actinastrum</i> sp.				X						X	X		X	X	X	X		
<i>Chlamydomonas</i> sp.										X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Coelastrum</i> sp.										X				X		X		
<i>Coelastrum microporum</i> Nägeli										X	X		X	X				

Legenda: Ponto 1 Superfície (P1S), Ponto 1 Meio (P1M), Ponto 1 Fundo (P1F), Ponto 2 Superfície (P2S), Ponto 2 Meio (P2M), Ponto 2 Fundo (P2F), Ponto 3 Superfície (P3S), Ponto 3 Meio (P3M) e Ponto 3 Fundo (P3F).

<i>Desmodesmus spp.</i>				X						X	X		X	X	X	X	X	
<i>Elakatothrix sp.</i>																X		
<i>Eudorina elegans</i>										X				X				
<i>Eudorina sp.</i>										X								
<i>Golenkinia sp</i>											X			X				
<i>Golenkiniopsis sp.</i>				X									X				X	
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchn.) Möb											X							
<i>Kirchneriella sp.</i>										X			X	X			X	X
<i>Micractinium sp.</i>													X					
<i>Monoraphidium contortum</i> (Thuret) Kom. & Legn.				X	X	X						X	X	X	X	X		
<i>Monoraphidium sp.</i>										X	X						X	
<i>Pandorina sp.</i>	X	X					X			X							X	
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen var. <i>duplex</i> f. <i>duplex</i>													X	X	X			
<i>Pediastrum sp.</i>														X				
<i>Pediastrum tetras</i> (Ehrenberg) Ralfs										X	X		X				X	
<i>Scenedesmus nygaardii</i> (Huber-Pestalozzi) Holtmann										X			X			X		
<i>Scenedesmus arcuatus</i> (Lemmermann) Lemmermann										X		X	X	X			X	
<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerheim) Chodat										X			X	X			X	X
<i>Scenedesmus spp.</i>										X	X		X	X				
<i>Oocystis sp.</i>										X							X	
<i>Selenastrum sp.</i>										X								
Zygnemaphyceae																		
<i>Staurostrum anaidium</i> Cooke & Wills		X						X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Staurodesmus spp</i>							X			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cryptophyceae																		
<i>Cryptomonas spp.</i>	X		X					X	X		X	X	X	X	X		X	X

Legenda: Ponto 1 Superfície (P1S), Ponto 1 Meio (P1M), Ponto 1 Fundo (P1F), Ponto 2 Superfície (P2S), Ponto 2 Meio (P2M), Ponto 2 Fundo (P2F), Ponto 3 Superfície (P3S), Ponto 3 Meio (P3M) e Ponto 3 Fundo (P3F).

Dinophyceae																		
<i>Ceratium furcoides</i> (Levander) Langhans	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Gymnodinium</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X
<i>Peridinium gatunense</i> Nygaard	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X
<i>Peridinium umbonatum</i> F. Stein	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X
Euglenophyceae																		
<i>Euglena</i> sp.		X			X		X	X		X	X		X	X	X	X	X	
<i>Phacus longicauda</i> (Ehrenberg) Dujardin										X			X	X	X		X	
<i>Phacus</i> sp.					X									X				
<i>Phacus tortus</i> (Lemmermann) Skvortsov				X							X			X		X		
<i>Trachelomonas</i> sp.	X												X					
<i>Trachelomonas raciborskii</i> Woloszynska	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Trachelomonas volvocinopsis</i> Svirenko	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bacillariophyceae																		
<i>Não identificada</i> sp.																		
<i>Aulacoseira granulata</i> Ehrenberg Simonsen	X	X	X	X	X	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>angustissima</i> (O.F. Müller) Simonsen	X			X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	X	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X		X	
Crysophyceae																		
<i>Mallomonas</i> sp.										X	X					X		

Legenda: Ponto 1 Superfície (P1S), Ponto 1 Meio (P1M), Ponto 1 Fundo (P1F), Ponto 2 Superfície (P2S), Ponto 2 Meio (P2M), Ponto 2 Fundo (P2F), Ponto 3 Superfície (P3S), Ponto 3 Meio (P3M) e Ponto 3 Fundo (P3F).

3.10 Análises estatísticas

Foram calculados os graus de associação entre os fatores bióticos e os abióticos. Tal avaliação foi feita através de um teste não-paramétrico, definido pelo do Coeficiente de Correlação de Spearman com nível de significância de $p < 0,05$.

No mês de agosto de 2011 (Tabela 9), as associações que foram mais representativas foram Temperatura e Cyanophyceae (0,859153), Temperatura e Chlorophyceae (0,879873), Oxigênio Dissolvido e Chlorophyceae (0,868663), Temperatura e pH (0,958982), Temperatura e Oxigênio Dissolvido (0,96689) e Oxigênio Dissolvido e pH (0,926244).

No mês de fevereiro de 2012 (Tabela 10) as relações significativas encontradas foram pH e Temperatura (0,986292), pH e Oxigênio dissolvido (0,991504), pH e Clorofila a (0,970945), pH e Feofitina (-0,90764), Temperatura e Clorofila a (0,972315), Temperatura e oxigênio dissolvido (0,983438), Condutividade elétrica e CRYPTOPHYCEAE (0,823049) e Condutividade elétrica e Dinophyceae (0,861863), Oxigênio dissolvido e clorofila a (0,960403), Oxigênio dissolvido e feofitina (-0,91662), Clorofila a e feofitina (-0,80854).

Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis bióticas e abióticas no mês de agosto de 2011 no Complexo Billings. Estão representados em destaque os valores significativos no nível de 5% ($p < 0,05$).

	CYN	CHL	ZYG	CRP	DIN	EUG	BAC	CRS	pH	T	CE	OD	Cla	Feo	Clb	Clc	NT	PT
CYN	1																	
CHL	0,590158	1																
ZYG	0,562723	0,297259	1															
CRP	0,12437	-0,48482	-0,13426	1														
DIN	0,460154	0,263277	0,168224	0,127276	1													
EUG	0,718895	0,610203	0,509248	-0,08715	0,294249	1												
BAC	0,191707	0,493674	0,243757	-0,41676	0,678221	0,301378	1											
CRS	0	0	0	0	0	0	0	1										
pH	0,754301	0,914411	0,192474	-0,30107	0,443467	0,58511	0,42321	0	1									
T	0,859153	0,879873	0,376246	-0,2661	0,504752	0,720294	0,480046	0	0,958982	1								
CE	0,510796	-0,13287	0,035724	0,533568	0,315063	0,239813	-0,30275	0	0,199463	0,191844	1							
OD	0,748886	0,868663	0,279034	-0,36123	0,536088	0,718453	0,520723	0	0,926244	0,96689	0,094282	1						
Cla	-0,15988	-0,23796	-0,67473	0,419245	-0,13914	0,023105	-0,40773	0	-0,0764	-0,20472	0,519985	-0,18781	1					
Feo	0,161981	0,28247	0,51283	-0,32233	0,268274	0,066227	0,455176	0	0,126062	0,26957	-0,5927	0,319154	-0,91377	1				
Clb	0,22755	0,434028	-0,17973	-0,01078	-0,41984	0,491482	-0,2799	0	0,348795	0,328281	-0,09	0,34053	0,371244	-0,20371	1			
Clc	-0,77139	-0,41334	-0,18066	-0,05275	-0,77574	-0,53092	-0,40555	0	-0,67746	-0,77187	-0,46669	-0,78539	0,052477	-0,1937	-0,0004	1		
NT	-0,21514	-0,37487	0,307701	0,055435	-0,67714	-0,24894	-0,41563	0	-0,5461	-0,4284	-0,41769	-0,50275	-0,42809	0,314424	0,076564	0,533445	1	
PT	-0,19735	-0,25805	0,242123	0,062442	-0,55491	0,158483	-0,4345	0	-0,47927	-0,33274	-0,37429	-0,26991	-0,16929	0,264195	0,382073	0,395093	0,703933	1

Tabela 10 - Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis bióticas e abióticas no mês de fevereiro de 2012 no Complexo Billings. Estão representados em destaque os valores significativos no nível de 5% ($p < 0,05$).

	CYN	CHL	ZYG	CRP	DIN	EUG	BAC	CRS	pH	T	CE	OD	Cla	Feo	Clb	Clc	NT	PT
CYN	1																	
CHL	0,525301	1																
ZYG	0,740117	0,760808	1															
CRP	0,104076	-0,47929	-0,24311	1														
DIN	-0,36563	-0,5024	-0,50361	0,761708	1													
EUG	0,620522	0,243375	0,51563	0,522692	0,381509	1												
BAC	0,523409	0,003339	0,391082	-0,13649	-0,3845	0,268328	1											
CRS	0,660743	0,583492	0,492446	0,097561	-0,17355	0,393182	0,328813	1										
pH	0,603903	0,652269	0,685769	-0,4621	-0,68025	0,018247	0,421635	0,628649	1									
T	0,644293	0,725973	0,775061	-0,47655	-0,70532	0,078151	0,377384	0,598636	0,986292	1								
CE	-0,25098	-0,53377	-0,40838	0,823049	0,861863	0,342797	-0,51863	-0,36019	-0,67983	-0,65806	1							
OD	0,587566	0,619317	0,66426	-0,44142	-0,68712	-0,02448	0,358688	0,583307	0,991504	0,983438	-0,63255	1						
Cla	0,669368	0,722178	0,714539	-0,44675	-0,65631	0,113685	0,420223	0,701792	0,970945	0,972315	-0,67938	0,960403	1					
Feo	-0,42589	-0,34055	-0,5588	0,342068	0,608628	0,107725	-0,4677	-0,44091	-0,90764	-0,8707	0,560525	-0,91662	-0,80854	1				
Clb	0,610326	0,760015	0,686357	-0,46086	-0,57411	0,233535	0,255304	0,510778	0,649424	0,720756	-0,55508	0,64986	0,79796	-0,36916	1			
Clc	0,331627	0,182409	0,481676	-0,07678	-0,01004	0,49732	0,722265	0,368048	0,420792	0,384342	-0,29479	0,332064	0,395126	-0,4478	0,158984	1		
NT	-0,2337	-0,22682	-0,10347	-0,32828	-0,50364	-0,63781	-0,00918	-0,3219	0,069736	0,085846	-0,26124	0,156049	0,060709	-0,24063	0,1591	-0,43799	1	
PT	-0,28987	0,107807	-0,00471	-0,51626	-0,52926	-0,66168	-0,31826	-0,26967	0,146067	0,194795	-0,30512	0,231791	0,160803	-0,18774	0,328248	-0,54593	0,885128	1

4 Discussão

4.1 Temperatura

A temperatura da água altera propriedades como a capacidade de saturação de oxigênio dissolvido (OD), pH e condutividade elétrica (CE), por isso, tais variáveis acompanham, de modo geral, tendências da temperatura da água (CALIJURI *et al*, 1999), tal afirmação é corroborada pelas análises estatísticas que indicaram associação positiva entre todos estes parâmetros nas duas coletas realizadas. Neste trabalho, em todos os pontos, de modo geral, a temperatura influenciou os dados relativos ao OD e pH como esperado, pois com o aumento da profundidade houve diminuição da temperatura e consecutivamente os valores e concentração de OD e pH também tenderam a este declínio. Com relação à CE o padrão declínio dos valores com aumento da profundidade não foi observado com clareza nos pontos 1 e 2 da coleta realizada em agosto de 2011. Tal acontecimento pode estar relacionado com a pequena amplitude de temperatura nesses dois pontos (1,03°C no ponto e 0,43°C no ponto 2), sugerindo um provável período de mistura na massa d'água ocorrido a poucos dias da coleta realizada.

Neste trabalho, as cianobactérias apresentaram maior biovolume no mês de fevereiro de 2012, mês em que a temperatura variou entre 23 e 31 °C por toda a coluna d'água, com relação ao mês de agosto onde as temperaturas mantiveram-se sempre abaixo de 21°C, corroborando com o que foi observado em outros estudos envolvendo cianobactérias. A análise estatística indicou uma associação positiva entre a temperatura e a densidade de cianobactérias em agosto (0,859153) e entre temperatura e clorofila-a em fevereiro (0,972315), indicando que quando a temperatura se eleva a densidade de cianobactérias também se eleva. Segundo Chorus & Bartram (1999) as cianobactérias tem taxa de crescimento máximo em temperaturas superiores à 25°C, o que também é colaborado pelos estudos de Jöhnk *et al* (2008), realizado com populações de clorofíceas, diatomáceas e cianobactérias do gênero *Microcystis*. Em temperaturas abaixo de 23°C o crescimento das cianobactérias foi inferior ao das algas, mas em temperaturas superiores à 23°C a taxa de crescimento de *Microcystis* superou as taxas das algas verdes e de diatomáceas, demonstrando que cianobactérias, como *Microcystis*, são altamente competitivas em temperaturas elevadas (JÖHNK *et al.*, 2008).

4.2 Oxigênio Dissolvido (OD)

O oxigênio é importante elemento químico nos ecossistemas aquáticos, produzido como subproduto da fotossíntese realizada pelo fitoplâncton, macrófitas e perifíton nos estratos superiores e na região litorânea de lagos e reservatórios (BEZERRA-NETO e PINTO-COELHO, 2001). Outras formas de ganho de oxigênio na superfície estão associadas aos processos de decomposição e respiração, à ação dos ventos, aos processos de mistura e em menor grau à contribuição atmosférica (TOWNSEND, 1999). Nas zonas mais profundas da coluna de água, há sedimentação da matéria orgânica em decorrência altas taxas de decomposição, resultando em consumo líquido de oxigênio (HENRY *et al*, 1989). Em todos os pontos nas duas coletas o OD acompanhou o comportamento de diminuição da temperatura com o aumento da profundidade. Segundo a resolução CONAMA nº357 de 2005 os corpos d'água classificados como classe II, o caso da Represa Billings, devem apresentar um limite mínimo de concentração de oxigênio dissolvido de 5 mg/L. No ponto 1 da coleta de agosto este limite não foi respeitado, pois na maior profundidade a concentração foi de 4,96 mg/L. Já na coleta de fevereiro todos os pontos chegaram a valores menores do que o limite estabelecido pela resolução nas suas maiores profundidades sendo 1, 1,6 e 2,1 mg/L as menores concentrações nos pontos 1, 2 e 3. Em todos os pontos o baixo teor de OD é alarmante, mas em especial, o ponto 1 localiza-se no braço Taquacetuba da Represa Billings e é através dele que realiza-se a transposição de água da Represa Billings para a Represa Guarapiranga que é utilizada para abastecimento público, possivelmente prejudicando a qualidade da água.

4.3 Condutividade Elétrica (CE)

A condutividade elétrica (CE) é a expressão numérica da capacidade da água conduzir a corrente elétrica. Depende das concentrações iônicas e da temperatura e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta da concentração de poluentes. Em geral, níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, indicam ambientes impactados (CETESB, 2001). Neste estudo os valores de CE se mantiveram sempre acima de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, levando a indicação de um ambiente fortemente impactado. Na coleta de agosto de 2011 e fevereiro de 2012, no ponto 3

foi encontrado o maior valor de CE (226 e 206 $\mu\text{S}/\text{cm}$) reafirmando o impacto causado pela sua proximidade com o local de bombeamento de águas do rio Pinheiros.

4.4 pH

O padrão de redução no pH em direção ao fundo da coluna d'água relaciona-se com a zona fótica e a realização de fotossíntese na porção superficial, uma vez que os organismos fotossintetizantes se posicionam preferencialmente na zona fótica, retirando gás carbônico da água e, assim, influenciando diretamente no aumento do pH (ESTEVES, BOZELLI, *et al.*, 1988; WETZEL, 2001). As altas concentrações de matéria orgânica depositada no sedimento influenciam nos baixos valores de pH observado nas camadas mais profundas da massa de água, devido ao processo de decomposição com alto consumo de oxigênio e liberação de gás carbônico (THOMAS e MAYBECK, 1992), como pode ser claramente observado em todos os pontos de coleta analisados. Pela aptidão das cianobactérias em utilizar o bicarbonato como fonte de carbono inorgânico e de sua limitada habilidade em regular e manter o pH neutro em ambientes ácidos é em habitats com pH variando entre 7,5 e 10 que ocorre o crescimento máximo de cianobactérias (GIRALDEZ-RUIZ *et al.*, 1999), sendo inibido em valores de pH abaixo de 5 (BROCK, 1973). Tal relação entre a densidade de cianobactérias e o pH elevado também foi observada por Souza (2008) e Tucci & Sant'Anna (2003). Neste estudo, nas duas coletas os valores de pH estavam em média ligeiramente alcalinos, no mês de fevereiro observou-se os maiores valores de pH, oscilando entre 7,19 e 10,08, e também a ocorrência de floração de cianobactérias. As análises estatísticas de fevereiro apontaram a existência de uma relação positiva entre pH e Clorofila a (0,970945) e uma associação negativa entre pH e Feofitina (-0,90764), indicando a possibilidade de que com o aumento do pH a densidade fitoplanctônica também aumentou e que nos locais com pH mais baixo havia mais populações fitoplanctônicas em declínio.

4.5 Clorofila

A determinação das concentrações dos pigmentos clorofilianos proporciona uma estimativa da biomassa fitoplanctônica e os feopigmentos indicam o seu grau

fisiológico, uma vez que numa população em declínio, os teores de clorofilas diminuem, enquanto que seus produtos de degradação (feopigmentos) e os carotenóides aumentam (MARGALEF, 1970). A atividade do fitoplâncton por unidade de biomassa e as respostas à luz são de importância fundamental para o conhecimento dos processos e mecanismos que controlam a transferência de energia e o ciclo de matéria orgânica nos lagos (TUNDISI e SAIJO, 1985).

A clorofila *a* é o pigmento fitoplanctônico mais abundante nos ambientes aquáticos, por ser encontrada em todas as classes fitoplanctônicas. Nas cianobactérias, assim como nas demais algas a clorofila *a* é o principal pigmento para absorção da luz para realização da fotossíntese (CHORUS e BARTRAM, 1999). Neste estudo, manteve-se como a mais abundante em todas as amostras.

A clorofila *b* é encontrada nas classes Chlorophyceae, Euglenophyceae e Zygnemaphyceae e a clorofila *c* nas classes Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Cryptophyceae, Dinophyceae, e Xanthophyceae (VAN DEN HOEK *et al*, 1997).

A clorofila *c* foi a única que não apresentou queda na sua concentração com o aumento da profundidade em agosto de 2011, este fato está relacionado à grande floração de dinoflagelados (classe Dinophyceae) encontrada nos locais em todas as profundidades e em todos os pontos amostrados.

Os feopigmentos indicam o grau fisiológico dos pigmentos clorofilianos, uma vez que numa população em declínio, os teores de clorofilas diminuem, enquanto que seus produtos de degradação (feopigmentos) aumentam (MARGALEF, 1970). A análise estatística indica uma associação negativa da clorofila-*a* com o feofitina (-0,80854). A diminuição dos feopigmentos em relação às concentrações de clorofila, indica que a comunidade fitoplanctônica encontrada não está em declínio em nenhuma das duas coletas.

4.6 Comunidade fitoplanctônica

Contrariando as expectativas criadas pelos constantes estudos na represa Billings indicando as frequentes florações de cianobactérias, na coleta de agosto de 2011 não se observou a esperada floração. Foi classe Dinophyceae que se destacou nesta coleta, principalmente pela presença massiva da espécie *Ceratium furcoides*. A espécie *Ceratium furcoides* foi identificada em todas as amostras e manteve

biovolume elevado, mas teve maior representatividade nos dados apresentados pela amostragem de agosto de 2011.

O primeiro registro de *C. furcoides* no país foi observado no ano de 2007 no reservatório de Furnas, em Minas Gerais (SANTOS-WISNIEWSKI *et al.*, 2007). Na represa Billings também foi observado e registrado em 2007 (CETESB, 2008). No ano de 2008, Matsumura-Tundisi *et al* (2010) observaram uma floração desta espécie e constataram que as frequentes florações de algumas espécies de cianobactérias em ambientes tropicais eutrofizados eram inibidas quando existia alta densidade de *C. furcoides*, situação possivelmente causada por alguma vantagem competitiva desta espécie de dinoflagelado com relação às cianobactérias, mas ainda há pouco conhecimento sobre esta relação. Ainda segundo os mesmos autores, a mistura na coluna d'água favorece o aumento de *C. furcoides*, uma vez que ressuspende cistos (estratégia adaptativa de resistência do gênero *Ceratium*) e fósforo (nutriente facilmente assimilado pela espécie) do sedimento e este seria o principal motivo para a floração da espécie em seus estudos.

Neste trabalho, também observou-se a inibição das frequentes florações de cianobactérias quando o biovolume de *C. furcoides* apresentou-se elevado (mês de agosto de 2011). Nesta data de amostragem houve pouca variação de temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido na coluna d'água indicando que houve mistura (desestratificação) da massa d'água antes da coleta, fato que pode ter favorecido o crescimento de *C. furcoides*.

Nishimura (2012) também observou alta densidade de *C. furcoides* no ano de 2009 no braço Taquacetuba da represa Billings e a ocorrência na represa Guarapiranga, ressaltando a importância em monitorar a transferência de fitoplâncton da represa Billings para a represa Guarapiranga, pois pode prejudicar a qualidade da água da represa Guarapiranga e trazer problemas para o tratamento que é feito para disponibilizar essa água para abastecimento público.

Como são poucos os registros de *C. furcoides* nos trópicos pouco se sabe sobre sua ecologia nesses ambientes e a demanda sobre estudos nesta área é crescente.

Apesar da inesperada ausência das constantes e intensas florações de cianobactérias, os relatórios de qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo produzidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB,

sobre os anos de 2011 e 2012, indicam que houve aumento da densidade de comunidades fitoplanctônicas de 2011 para 2012, em especial de cianobactérias no reservatório Billings (CETESB, 2013; CETESB, 2012).

Em fevereiro foi observada uma floração de cianobactérias representada pela espécie *Microcystis aeruginosa* que é potencialmente tóxica, podendo causar sérios prejuízos à saúde humana e ao equilíbrio do ecossistema aquático.

Chlorophyceae foi a classe com maior riqueza de espécies em agosto e o segundo maior em fevereiro, provavelmente por ser o grupo fitoplanctônico com maior diversidade de organização celular, estrutura morfológica e processos reprodutivos em comparação a qualquer outra divisão (HAPPEY-WOOD, 1988). A análise estatística identificou uma relação positiva entre a densidade de clorofíceas e a temperatura (0,879873) e entre a densidade de clorofíceas e o oxigênio dissolvido (0,868663), indicando que nas maiores temperatura e nos locais com maior concentração de oxigênio dissolvido a densidade de clorofíceas tendeu ao crescimento.

Esse predomínio de clorofíceas com relação à riqueza também foi observada em estudos realizados na Billings, como Souza *et al* (1998) no braço Rio Pequeno e Nishimura *et al* (2008) no braço Taquacetuba.

4.7 Nutrientes

O teor de nutrientes nitrogenados é fortemente afetado pelo o balanço de oxigênio e temperatura, pois influenciam nos processos do ciclo do nitrogênio. O oxigênio determina os processos de oxidação e redução dos compostos nitrogenados e a temperatura acelera ou diminui a velocidade das reações químicas e dos processos biológicos (MAIER *et al*, 1985; ESTEVES, 1998).

Perfis verticais crescentes de amônio em direção às maiores profundidades foram observados nos dois pontos de coleta em dezembro, março e setembro, podendo ser atribuídos aos processos de amonificação. O nitrogênio amoniacal é preferencialmente assimilado pelo fitoplâncton (MAIER *et al*, 1985; ARAÚJO *et al*, 2000) o que explica sua menor concentração na superfície em todas as datas. A alta concentração de amônia nas maiores profundidades dos pontos pode estar relacionada à baixa densidade de fitoplâncton nestas profundidades.

Em estudo feito no reservatório Rio Grande do Complexo Billings por Xavier (1981) foi observada a mesma tendência crescente do íon amônia em direção às

maiores profundidades, mas as concentrações encontradas foram inferiores às encontradas neste trabalho. As altas taxas de amônia poderiam representar um indício de um aumento de poluição relativo às atividades antrópicas do entorno da represa. As baixas concentrações de OD também podem ter contribuído para a maior concentração de amônia tanto na superfície quanto no fundo, pois em situações de menor concentração de OD o nitrato é reduzido a amônio.

As concentrações de nitrato apresentaram um perfil vertical decrescente na maioria dos pontos, podendo ser atribuído ao processo de nitrificação (SCHÄFER, 1984). O nitrato inorgânico é altamente solúvel e abundante em águas que recebem altas concentrações de nitrogênio, resultantes de descargas de esgotos domésticos ou de atividades agrícolas. Altas concentrações de nitrato foram encontradas, por exemplo, por (TUNDISI, 1990) na represa de Barra Bonita (de 1000 a 2000 µg/L) e por de (XAVIER, 1981) na represa Billings (865 µg/L), tais concentrações foram similares às observadas em agosto e em fevereiro deste estudo. A alta concentração de nitrato é um fator que influencia nas florações fitoplanctônicas, fato que certamente favoreceu o florescimento do gênero *Microcystis* observado na represa em fevereiro.

A estratégia de fixação de nitrogênio por espécies de cianobactérias com heterócitos (estrutura do filamento responsável pela fixação de nitrogênio atmosférico) parece não ocorrer, pois não foi encontrado heterócitos nos tricomas das amostras analisadas. O fato de poucos ou nenhum tricoma possuírem heterócitos pode ser explicado pela alta disponibilidade do nitrogênio na forma nitrato nos pontos amostrados. De acordo com Padisák e Reynolds (1998), o gênero *Anabaena*, presente nos três pontos de coleta no mês de fevereiro, podem como estratégia, não fixar o nitrogênio disponível no meio se ele for abundante na coluna de água.

O nitrito não é um nutriente abundante em águas naturais, sua concentração é normalmente baixa por causa da possibilidade de ser reduzida quimicamente e/ou através da atividade de bactérias que reduzem nitrato ou oxidam amônio. Pode inclusive ser tóxico em altas concentrações (ARAÚJO, 2000). Baixas concentrações de nitrito foram observadas por Maier *et al* (1985) e por Beyruth e Pereira (2002). Xavier (1981) não detectou este íon no reservatório Rio Grande (pertencente ao complexo Billings), devido à rápida conversão do nitrito a nitrato facilitado pela boa oxigenação. Neste estudo, as concentrações de nitrito encontradas foram maiores.

Mayer *et al* (1985) observaram no Complexo Billings (braços Pedreira, Riacho Grande e Rio das Pedras) valores de nitrato menores aos que foram encontrados neste estudo (entre 44,0 e 795,0 µg/L), enquanto TOLEDO *et al.*, (1988) observaram no Lago Paranoá (DF) valores bem mais baixos (entre 13,0 e 42,0 µg/L). Tais concentrações de substâncias nitrogenadas indica que há maior aporte de nutrientes sendo despejado na represa, depreciando a qualidade da água.

A sílica presente no ambiente aquático é proveniente, principalmente, da decomposição de minerais de silicato de alumínio, frequentes em rochas sedimentares, que escoam com as águas das chuvas. Este nutriente, sob a forma solúvel, é um composto de fundamental importância ecológica, pois é utilizado pelas diatomáceas na elaboração de sua carapaça (ESTEVES, 1998).

As diatomáceas apresentaram baixo biovolume, provavelmente devido à quantidade de sílica em concentrações limitantes no corpo d'água. Segundo Reid e Wood (1976), o crescimento de populações de diatomáceas é, pelo menos parcialmente, limitado por concentrações de sílica inferiores a 0,8 mg/L. As concentrações de sílica foram muito baixas, ficando abaixo do limite de detecção do método (1,0 mg/L) em alguns casos. Provavelmente esses baixos teores foram limitantes à densidade desses organismos nos pontos de coleta. Nas outras amostras, houve um aumento nas concentrações chegando a 2,9 mg/L em fevereiro no ponto 3, mas não o suficiente para propiciar um aumento significativo na densidade de diatomáceas. A dominância massiva de cianobactérias em fevereiro e de dinoflagelados em agosto pode também ter influenciado a densidade baixa deste grupo de microalgas.

Os principais nutrientes mencionados nos estudos quando se fala de florações de algas são o nitrogênio e o fósforo, tal importância se deve ao fato de que são componentes essenciais de muitas funções celulares.

O fósforo é frequentemente citado como limitante ao crescimento de cianobactérias e, ao mesmo tempo, como o principal causador de florações, quando em excesso (PAERL, 2008).

O fósforo é um elemento essencial para o funcionamento e para o crescimento dos organismos aquáticos, uma vez que é componente de ácidos nucleicos e adenosina trifosfato. Agentes biológicos e físico-químicos específicos do ambiente controlam amplamente a distribuição das diversas formas de fósforo nas águas. A

depleção de nutrientes nos fluxos fluviais, especialmente de fósforo pode alterar a produtividade biológica do ecossistema aquático, pois o fósforo é considerado o principal fator limitante da produtividade de águas continentais (ESTEVES, 1998).

Em lagos tropicais, devido à alta temperatura, o metabolismo dos organismos aumenta consideravelmente, fazendo com que o ortofosfato seja ainda mais rapidamente assimilado e incorporado à biomassa (MAIER *et al*, 1985), sendo este provavelmente um dos principais motivos de sua baixa concentração nos pontos amostrados (abaixo do limite de detecção). Araújo *et al* (2000) e Xavier (1981) encontraram baixas concentrações de ortofosfato, sendo esta ocorrência explicada pela rápida incorporação deste íon pelo fitoplâncton e macrófitas ali presentes, na Lagoa de Extremoz (RN) e no braço Rio Grande do reservatório Billings, respectivamente.

Concentrações de fósforo acima de 100 µg/L indicam corpos aquáticos em regiões urbanas eutrofizadas, altamente populosas com descarga de esgotos, sendo esta a condição da represa Billings observada nos pontos estudados.

4.8 Índice de Estado Trófico (IET)

O intuito do IET é avaliar a qualidade das águas de um ecossistema aquático com relação à concentração de nutrientes e suas consequências (LAMPARELLI, 2004).

O processo de eutrofização da represa Billings é intensificado pelo despejo de fontes pontuais e não pontuais de esgoto, sendo o bombeamento de águas do rio Pinheiros um dos grandes colaboradores para os altos índices encontrados (CAPOBIANCO, 2002).

O grande aporte de nutriente que chega à represa Billings é possivelmente o responsável pelos altos IETs encontrados neste estudo. Os pontos 2 e 3, localizados no corpo central do reservatório, são diretamente afetados pelo bombeamento de água do rio Pinheiros para a represa e apresentaram o índice hipereutrófico. O ponto 1 localizado na parte inicial do braço Taquacetuba da represa apresentou índice supereutrófico, portanto menor, indicando a possibilidade de a morfologia dendrítica da represa dificulta a dispersão de nutrientes, como o fósforo, para todas as regiões da represa.

Wengrat e Bicudo (2011) também estabeleceram índices de trofia para o complexo Billings na época seca (inverno) e na época chuvosa (verão) e encontraram as mesmas indicações para o corpo central e para o braço Taquacetuba que foram calculados neste estudo. Neste trabalho, porém, não se observa melhora do IET quando a coleta realizada na época seca (agosto de 2011) é comparada com a realizada na época chuvosa (fevereiro de 2012), indicando que o reservatório continua em estado crítico de degradação da qualidade de suas águas.

4.9 Resolução CONAMA nº357

A resolução CONAMA nº357 de 17 de março de 2005, estabelece padrões de qualidade de água para corpos hídricos de todas as classes (BRASIL, 2005).

Em todas as classes de corpos hídricos os valores de pH devem variar entre 6,0 e 9,0, na coleta realizada em fevereiro os valores de pH nos pontos 2 e 3 ultrapassaram estes padrões, chegando a 9,6 no ponto 2 e a 10,08 no ponto 3 na superfície. Tais valores podem estar relacionados à temperatura elevada da água e à floração de cianobactérias presente nesta data.

Em corpos d'água classificados como classe II, a resolução diz que o limite padrão da concentração de clorofila-a é de 30 µg/L. Neste estudo as concentrações de clorofila se apresentaram acima dos padrões em todos os pontos e nas duas coletas. Em agosto os maiores índices foram 57,20 µg/L no ponto 1, 45,97 µg/L no ponto 2 e 62,01 µg/L no ponto 3. Os maiores valores foram encontrados em fevereiro de 2012 (80,19 µg/L no ponto 1, 88,2 µg/L no ponto 2 e 163,05 µg/L no ponto 3). Estes valores estão em não conformidade com a resolução e seriam equivalentes a corpos d'água classificados como classe III ou até mesmo IV, portanto indicam degradação na qualidade da água intensificada pela proliferação de fitoplâncton.

Com relação à concentração de fósforo total, o padrão utilizado pela resolução é de 30 µg/L, valor superado em quase todas as amostras coletadas, indicando uma não conformidade com a resolução para a classe II e comparado a corpos hídricos classe IV.

As concentrações de oxigênio dissolvido, em pelo menos uma das profundidades apresentaram valores inferiores a 5 mg/L (padrão estabelecido) nos pontos em fevereiro e em agosto os valores encontrados mantiveram-se mais

elevados. Tais concentrações relacionam-se com o aumento da densidade de fitoplâncton no mês de fevereiro.

O braço Taquacetuba, classificado como classe I, com padrões mais rígidos, também apresentou valores em não conformidade com a resolução.

Os resultados apresentados indicam que os pontos analisados neste estudo não estão em conformidade com os padrões estabelecidos pela resolução CONAMA nº357 para corpos hídricos classe II (corpo central) e classe I (braço Taquacetuba).

Capítulo III: Técnicas de biologia molecular para caracterização de cianobactérias da represa Billings

Resumo:

A crescente eutrofização das represas artificiais do Brasil favorece as florações de microorganismos fotossintetizantes (algas e cianobactérias), principalmente de cianobactérias potencialmente tóxicas que podem causar desequilíbrios ecológicos e problemas para a saúde da população que consome a água dos reservatórios. Portanto identificar os microorganismos que fazem parte desta diversidade é essencial para avaliar as condições dos ambientes aquáticos. A identificação tradicional destes microorganismos pode ser difícil graças às pequenas diferenças nos caracteres morfológicos. Assim, as técnicas de biologia molecular são indicadas para auxiliar na melhor caracterização dos ambientes quanto às cianobactérias.

Técnicas moleculares como PCR e ARDRA têm sido empregadas para facilitar e realizar uma caracterização e comparação de ambientes aquáticos. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de cianobactérias através de técnicas moleculares diretamente das amostras ambientais coletadas na superfície de 3 pontos da represa Billings. As amostras foram liofilizadas, em seguida o DNA foi extraído utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA (Promega). Os oligonucleotídeos iniciadores CYA359F e CYA781Ra/b, específicos para cianobactérias, foram utilizados na PCR da região do RNAr 16S. Após amplificação do fragmento de interesse, os produtos da PCR foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição BamHI, HindIII e EcoRI. Os fragmentos amplificados não apresentaram produtos de digestão. Novas condições experimentais de digestão devem ser testadas para caracterizar as amostras ambientais, assim como a escolha de outras enzimas de restrição.

Palavras-chave: cianobactérias, PCR, Billings, EcoRI, BamHI, HindIII

Abstract:

The increasing eutrophication of artificial dams in Brazil favors blooms of photosynthetic microorganisms (algae and cyanobacteria), especially potentially toxic cyanobacteria that can cause ecological imbalances and health problems of the population that consumes water from reservoirs. So the microorganisms that are part of this diversity is essential to assess the condition of aquatic environments. The traditional identification of these microorganisms can be difficult due to small differences in morphological characters. Thus, the techniques of molecular biology are given to aid in better characterization of the environment as cyanobacteria.

Molecular techniques such as PCR and ARDRA have been employed to facilitate and accomplish the characterization and comparison of aquatic environments. The aim of this study was to analyze the diversity of cyanobacteria through molecular techniques directly from environmental samples collected 3 points on the surface of the Billings. The samples were lyophilized, and then the DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Kit (Promega). The primers and CYA359F CYA781Ra / b specific for cyanobacteria, were used in PCR of the 16S rRNA region. After amplification of the fragment of interest, the PCR products were digested with the restriction enzymes BamHI, HindIII and EcoRI. The amplified fragments showed no digestion products. New experimental conditions digestion should be tested to characterize the environmental samples, as well as the choice of other restriction enzymes.

Keywords: cyanobacteria, PCR, Billings, EcoRI, BamHI, HindIII

1- Introdução

As represas artificiais no Brasil apresentam condições favoráveis para o crescimento acelerado de fitoplâncton, em especial de cianobactérias. Diversos estudos que avaliam a qualidade da água armazenada nestes reservatórios são realizados utilizando o fitoplâncton como um dos principais parâmetros de tal avaliação. Desta forma, as flutuações da diversidade fitoplanctônica são utilizadas como bioindicadores de alterações no ambiente.

A identificação taxonômica tradicional da diversidade fitoplanctônica é baseada principalmente nas características morfológicas dos organismos, cujos caracteres diacríticos possibilitam a identificação em níveis genéricos e específicos. Porém, muitas vezes pequenas variações morfológicas ligadas ao polimorfismo das populações podem dificultar a identificação do fitoplâncton (WILLAME *et al.*, 2006). Isso está relacionado também às variações ambientais (ecologia) que geram diferentes ecotipos no meio ambiente. Assim, a crescente utilização de técnicas moleculares para a identificação tem como uma das finalidades auxiliar nesta questão.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Saiki *et al* (1985) consiste em gerar múltiplas cópias (amplificação exponencial) pequenos segmentos do DNA utilizando *primers* (iniciadores) específicos que possibilitam a identificação dos microorganismos. Em estudo descrito por Neilan *et al.* (1995), os autores reportam sobre a aplicação de primers especificamente designados para a amplificação do gene *cpc*. A especificidade dos *primers* aplicados mostrou-se apropriada à identificação de cianobactérias em amostras de água fresca. Posteriormente, Nübel *et al.* (1997), também descreveram sobre o desenvolvimento e avaliação de *primers* de oligonucleotídeos para a amplificação específica do gene rRNA 16S de cianobactérias.

Dentre as técnicas de biologia molecular, elas podem ser independentes de PCR ou baseadas em PCR, por exemplo, análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA - *amplified ribosomal DNA restriction analysis*), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE - *denaturing gradient gel*), eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE - *temperature gradient gel electrophoresis*), polimorfismo de tamanho de fragmento terminal de restrição (TRFLP - *restriction fragment length polymorphism*) e análise automatizada do espaço intergênico

ribossomal (ARISA - *automated ribosomal intergenic spacer analysis*) (KUMARI *et al.*, 2009).

O RNA ribossômico é considerado como sendo a molécula com maior grau de conservação entre os organismos, apresentando variabilidade de extensões variadas em determinadas regiões (LANE *et al.*, 1985). O uso do gene rRNA 16S facilitou a identificação de microorganismos em amostras ambientais, pois pode ser aplicada mesmo sem a criação das culturas dos microorganismos que serão analisados (AMANN *et al.*, 1995). A aplicação de técnicas de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores) específicos e técnicas de PCR também têm sido bem descritas, demonstrando excelentes resultados na caracterização de algas e outros microorganismos de diversos ambientes, como é o caso do trabalho descrito por Romeike *et al.* (2002), os quais realizaram análises da diversidade genética de algas associadas a ambientes antárticos.

A técnica ARDRA foi criada sobre estas características do rRNA. Utiliza enzimas para determinados segmentos de genes do rRNA que possuem sítios de restrição específicos que variam entre os táxons filogenéticos, possibilitando uma rápida análise da diversidade genética.

2- Objetivos

O objetivo deste trabalho foi comparar a diversidade de cianobactérias presentes nos pontos de coleta através do uso de técnica de biologia molecular, baseada na avaliação do polimorfismo genético.

3- Materiais e Métodos

As amostras de fitoplâncton utilizadas neste estudo foram coletadas na superfície dos três pontos de coleta com auxílio de uma rede de plâncton de abertura de 20µm. A rede foi passada cerca de 10 vezes em cada ponto para que as amostras ficassem bem concentradas. Em seguida, as amostras foram alíquotadas, em triplicata, em tubos Falcon de 50 mL devidamente identificados, congeladas e liofilizadas para conservá-las até a sua utilização. Para as amostras obtidas no mês de agosto e fevereiro, a seguinte nomenclatura foi utilizada: AP1 (Agosto – Ponto 1), AP2

(Agosto – Ponto 2), AP3 (Agosto – Ponto 3), FP1 (Fevereiro – Ponto 1), FP2 (Fevereiro – Ponto 2) e FP3 (Fevereiro Ponto 3). O ponto 1 localiza-se no início do braço Taquacetuba, o ponto 2 localiza-se no corpo central da represa, próximo a uma margem intensamente habitada e o ponto 3 também localiza-se no corpo central, mas mais próximo à barragem Pedreira.

O DNA genômico total das amostras ambientais foi extraído a partir do material liofilizado utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA (Promega) para bactérias Gram-negativas, de acordo com as instruções do fabricante. Para verificar a integridade e qualidade, o DNA extraído foi analisado em corrida eletroforética em gel de agarose 1%, tampão TBE 1X (TBE 1X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), à 80V por 60 minutos e corado com SYBR Safe (Invitrogen) por 30 minutos. Como padrão de peso molecular foram utilizados os marcadores GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoScientific). Posteriormente, o gel foi registrado em luz ultravioleta (UV) utilizando o fotodocumentador L-Pix Touch Loccus Biotecnologia.

O fragmento de interesse foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores CYA359F e CYA781Ra/b (NÜBEL *et al.*, 1997) (Tabela 1). As condições da PCR foram: 95°C/5 min, 35 ciclos de 94 °C/1 min, 63 °C/1 min, 72 °C/1 min, seguidos de extensão final a 72 °C/7 min. Os produtos da PCR foram analisados em corrida eletroforética, em gel de agarose 1 %, com GelRed™ (Biotium), tampão TBE 1X (TBE 1X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), à 80V por 60 minutos. Os géis foram fotodocumentados UVITec (Cambridge), programa Alliance (UVITec,Cambridge). Quando necessário, o produto da PCR foi utilizado para realização de “nested-PCR”, nas mesmas condições da PCR inicial, melhorando portanto o rendimento da PCR.

Tabela 11 - Sequência dos iniciadores específicos de cianobactérias utilizados para amplificação do fragmento do gene RNAr 16S

Iniciador	Seqüência 5'- 3'	Referência
CYA359Fc	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	NÜBEL <i>et al.</i> , 1997
CYA781Ra	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T	NÜBEL <i>et al.</i> , 1997
CYA781Rb	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T	NÜBEL <i>et al.</i> , 1997

Após amplificação, os fragmentos da PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição BamHI, EcoRI e HindIII (ThermoScientific), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram analisados em corrida eletroforética em gel de agarose 2 %, com GelRed™ (Biotium), tampão TBE 1X (TBE 1X: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), à 40V por 120 min. Os géis foram fotodocumentados como descrito anteriormente.

4- Resultados e discussão

O DNA extraído das amostras foi quantificado com NanoVue (Tabela 2).

Tabela 12 – Quantificação do DNA extraído do material liofilizado

Amostras	AP1	AAP2	AP3	FP1	FP2	FP3
Quantidade de DNA (ng/μL)	138,5	212,0	166,5	249,5	393,5	366,0

Após extração do DNA total (Figura 1), as amostras foram submetidas à PCR para amplificação do fragmento do RNAr 16S (Figura 2). As amostras A1, A2 e A3 apresentaram menor rendimento na extração do DNA genômico total. Por outro lado, as amostras F1, F2 e F3 tiveram melhores resultados. Assim, a metodologia de extração de DNA utilizada gerou produto para realização das amplificações por PCR.

Figura 18 - Gel representativo da extração de DNA das amostras da represa Billings. M- Marcador 1 kb, 1 (A1), 2 (A2), 3 (A3), 4 (F1), 5 (F2) e 6 (F3)

Figura 19 - Gel representativo de algumas reações de PCR utilizando os iniciadores CYA359F e CYA781Ra/b. M – marcador 1kb, 1 (F1), 2 (F2), 3 (A1), 4 (A2), 5 (“nested-PCR” A1), 6 (“nested-PCR” A2), 7 (F3), 8 (Branco)

Todas as seis amostras ambientais da represa Billings geraram produto de PCR com cerca de 400-500 pb, sendo alguns representados na Figura 2. Algumas reações como F1 e A2, tiveram bom rendimento, enquanto que outras como F2 e A1, apresentaram pouco produto de PCR (Figura 2). Posteriormente, “nested-PCR” foram realizadas para as amostras cujas reações de PCR iniciais não mostraram bom rendimento. O resultado disso pode ser exemplificado nas colunas 5 e 6 da Figura 2, referentes às amostras A1 e A2. A região amplificada foi descrita como específica de cianobactérias e foi utilizada em diferentes trabalhos com DGGE (GILL, 2006; NÜBEL *et al*, 1997; RIGONATO *et al.*, 2012.).

As digestões dos produtos de PCR foram feitas com as enzimas BamHI (Figura 3), HindIII (Figura 4) e EcoRI (Figura 5). Os resultados mostraram que as três enzimas utilizadas não apresentaram sítio de reconhecimento e clivagem dos fragmentos de DNA amplificados.

Figura 20 - Gel representativo da digestão dos produtos da PCR com a enzima BamHI. M – marcador 1 kb, 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3), 4 (A1), 5 (A2), 6 (A3) e 7 (F1)

Figura 21 - Gel representativo da digestão dos produtos da PCR com a enzima HindIII. M – marcador 1 kb, 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3), 4 (A1), 5 (A2) e 6 (A3)

Figura 22 - Gel representativo da digestão dos produtos da PCR com a enzima EcoRI. M – marcador 1 kb, 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3), 4 (A1), 5 (A2) e 6 (A3)

Os resultados mostraram que as três enzimas utilizadas não apresentaram sítio de reconhecimento e clivagem dos fragmentos de DNA amplificados.

Capítulo IV: Conclusões gerais e perspectivas futuras

Conclusões

Aspectos ecológicos:

- ✓ As concentrações de Clorofila-a, fósforo total, pH e oxigênio dissolvido apresentaram valores que não estão em conformidade com a resolução CONAMA nº357 para corpos hídricos classe II (corpo central da represa) e classe I (braço Taquacetuba). Os valores se enquadram nos padrões para as classes III ou IV, indicando a degradação da qualidade na água nos pontos amostrados. A ação antrópica pode ter cooperado para essa situação ou para a sua intensificação.
- ✓ Neste trabalho, a preocupação com a transposição de águas da represa Billings pelo braço Taquacetuba para a represa Guarapiranga é reafirmada pelo elevado grau de eutrofização, pelas altas concentrações de nutrientes, pelas grandes densidades fitoplanctônicas e pelas baixas concentrações de oxigênio que os pontos analisados na represa Billings apresentaram.
- ✓ Os altos níveis de nutrientes trouxeram como consequência a floração de *Microcystis aeruginosa*, cianofícea que possui alto potencial de produção de toxinas, com vários efeitos prejudiciais na biota e no homem. Este fato gera preocupações quando observamos que um dos pontos analisados está localizado no braço Taquacetuba que faz a transposição de suas águas para a represa Guarapiranga que tem como uma de suas atividades principais, o abastecimento público.
- ✓ Contrariando as expectativas, no mês de agosto de 2011 não houve floração de cianobactérias, mas sim uma grande densidade da espécie *Ceratium furcoides*, um dinoflagelado. Como existem poucos estudos sobre os potenciais e os possíveis riscos que esta espécie pode trazer aos ecossistemas aquáticos tropicais e qual a sua relação com outros organismos aquáticos, como as cianobactérias, é necessário uma demanda maior por trabalhos relacionados com esta espécie (sobre este assunto).

Análises Moleculares:

- ✓ As técnicas moleculares aplicadas neste trabalho não apresentaram resultado satisfatório para caracterização das cianobactérias presentes nas amostras, pois na etapa de digestão do DNA amplificado, as enzimas BamHI, HindIII e EcoRI não encontraram sítios de restrição para a clivagem. Há, por tanto, a necessidade de prosseguir com as análises.

Perspectivas Futuras

Aspectos ecológicos:

- ✓ Há a necessidade de mais estudos sobre os dinoflagelados, em especial sobre a espécie *Ceratium furcoides* que nos últimos anos tornou-se frequente em alguns reservatórios brasileiros. Estudos sobre suas características fisiológicas, sobre os prejuízos que florações desta espécie podem causar e sobre sua interação com outros organismos fitoplanctônicos como as cianobactérias.

Análises Moleculares:

- ✓ Continuar a caracterização molecular das amostras ambientais experimentando novas condições de digestão, utilizando outras enzimas de restrição e, inclusive, experimentando outras metodologias como DGGE.
- ✓ Caracterizar por técnicas moleculares a comunidade de cianobactérias presentes nas amostras e compará-las com os resultados obtidos com as análises taxonômicas tradicionais, a fim de realizar uma identificação mais precisa.

Referências Bibliográficas

- AMANN, R. T.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification an in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- APELDOORN, M. E. V. et al. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 7-60, 2007.
- ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, I. A. S.; CHELLAPPA, N. T. Comunidade fitoplanctônica e variáveis ambientais na Lagoa de Extremoz, Natal - RN, Brasil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 12, p. 127-140, 2000.
- AZEVEDO-NETO, J. M. Novos conceitos sobre eutrofização. **DAE**, v. 48, n. 151, p. 22-28, 1988.
- BEYRUTH, Z. **Comunidade fitoplanctônica da represa Guarapiranga: 1991-92 - Aspectos ecológicos, sanitários e subsídios para reabilitação da qualidade ambiental (tese de Doutorado)**. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 191. 1996.
- BEYRUTH, Z.; PEREIRA, H. A. D. S. L. O isolamento do Rio Grande da Represa hidrológico completo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, p. 111-123, 2002.
- BEZERRA-NETO, J. E.; PINTO-COELHO, R. M. O déficit de oxigênio em um reservatório urbano Lagoa do Nado, Belo Horizonte - MG. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 13, n. 1, p. 107-116, 2001.
- BRASIL. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo. Brasília (DF). 2005.
- BROCK, T. D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, v. 197, p. 480-483, 1973.
- CALIJURI, M. C.; DEBERDT, G. L.; MINOTI, R. T. A produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Salto Grande. In: HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu: [s.n.], 1999. p. 21-38.
- CAPOBIANCO, J. P. R. **Ameaças e perspectivas para o maior reservatório de água da região metropolitana de São Paulo**. Instituto Socioambiental. São Paulo. 2002.
- CARVALHO, L. R. Cianotoxinas. In: SANT'ANNA, C. L., et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de Cianobactérias de água Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência - Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006. p. 9-19.
- CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2000**. Companhia de tecnologia e saneamento ambiental. São Paulo. 2001.
- CETESB. **Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007**. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, p. 537. 2008.
- CETESB. **Qualidade nas águas superficiais no estado de São Paulo 2011**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo, p. 356. 2012.
- CETESB. **Qualidade nas águas superficiais no estado de São Paulo 2012**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo, p. 370. 2013.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London and New York: E & FN Spon, 1999.

- COLE, G. A. **Textbook of Limnology**. 2. ed. [S.l.]: Mosby, 1979.
- COOKE, G. D. et al. **Restoration and management of lakes and reservoir**. [S.l.]: Boca Raton Lewis Publishers, 1993. 548 p.
- DI-BERNARDO, L.; DI-BERNARDO, A.; CENTURIONE-FILHO, P. L. **Ensaio de tratabilidade de água e dos resíduos gerados em estações de tratamento de água**. [S.l.]: Rima, 2002. 237 p.
- ESTEVES, F. A. Level of phosphate, calcium, magnesium and organic matter in the sediments of some brazilian reservoirs and implications for the metabolism of the ecosystems. **Arch. Hydrobiol.**, v. 96, n. 2, p. 129-138, 1983.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciências, 1998. 602 p.
- ESTEVES, F. A. et al. Variação diária (24 horas) de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e alcalinidade em dua lagoas costeiras do estado do Rio de Janeiro e suas implicações no metabolismo destes ecossistemas. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 2, p. 99-127, 1988.
- FARQUHAR, J.; BAO, H.; THIEMENS, M. Atmospheric influence os Earth's earlist sulfur cycle. **Science**, n. 289, p. 756-758, 2000.
- GILL, A. **Molecular characterization of potential geosmin-producing cyanobacteria from lake Ontario**. University of Waterloo. Ontario, p. 186. 2006.
- GIRALDEZ-RUIZ, N.; BONILLA, I.; FERNANDEZ-PIÑAS, F. Role of external calcium in homeostasis of intracellular pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120 exposed to low pH. **New Phytologist**, v. 141, p. 225-230, 1999.
- HAPPEY-WOOD, C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: SANDGREN, C. D. **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton**. [S.l.]: Cambredege University Press, 1988. p. 135-175.
- HENRY, R.; PONTES, M.; TUNDISI, J. G. O déficit de oxigênio no lago Dom Helvécio (Parque Florestal do Rio Doce, Minas Gerais). **Revista de Biologia**, v. 49, p. 251-260, 1989.
- HEUER, H. et al. Analysis of actinomyces communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoresis separation in denaturing gradients. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3233-3241.
- HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **J. Phycol.**, v. 35, p. 403-424, 1999.
- IBGE. Atlas de Saneamento. **IBGE**, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_saneamento.shtm>. Acesso em: 18 jul. 2012.
- JARDIM, F. A. et al. JARDIM, F. A., CAVALIEREI, S. D. O., Metodologia para contagem de cianobactérias em célula/ml - um novo desafio para o analista de laboratórios. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, p. p.109-111, 2002.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 e c2 in higher plants algae and natural phytoplankton. **Physiol. Pflanzen**, v. 167, p. 191-194, 1975.
- JÖHNK, K. D. et al. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. **Global Change Biology**, v. 14, p. 495-512, 2008.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. **Modern approach to the classification system of Cyanophytes. Nostocales**. [S.l.]: Algological Studies, 1989.

- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 1: Chroococcales. In: ETTL, H., et al. **Süsswasserfloravon Mitteleuropa**. Stuttgart: Gustav Fisher, 1998. p. 1-548.
- KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota, 2: Oscillatoriales. In: BÜDEL, B., et al. **Süsswasserfloravon Mitteleuropa**. München: Elsevier, v. 19, 2005. p. 1-759.
- KUMARI, N. et al. Molecular approaches towards assessment of cyanobacterial biodiversity. **African J Biotechnol**, v. 8, p. 4284–, 2009.
- LAMPARELLI, M. C. **Graus de trofia em corpos d'água do Estado de São Paulo: Avaliação dos métodos de monitoramento**. Departamento de Ecologia de Ecossistemas Terrestres e Aquáticos - Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 164-168. 2004.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Neew York: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.
- MAIER, M. H.; MEYER, M.; TAKINO, M. Caracterização física e química da água da represa do Rio Grande (Riacho Grande), SP, Brasil. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 12, n. 1, p. 45-73, 1985.
- MARGALEF, R. Organization and distribution of phytoplankton communities. **Final. Tech. Office Naval. Res.**, p. 1-16, 1970.
- MARGALEF, R. **Teoria de los sistemas ecologicos**. Barcelona: Universitat de Barcelona, 1991.
- MARIANI, C. F. et al. Biota and water quality in the Riacho Grande reservoir, Billings Complex (São Paulo, Brazil). **Acta Limnol. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 267-280, 2006.
- MATSUMURA-TUNDISI, T. et al. Occurrence of *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans 1925 bloom at the Billings Reservoir, São Paulo State, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 70, p. 825-829, 2010.
- NEILAN, B.A., JACOBS, D., GOODMAN, A.E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 61, p. 3875-3883, 1995.
- NISHIMURA, P. Y. **A comunidade fitoplanctônica nas represa Billings e Guarapiranga (Região Metropolitana de São Paulo)**. Departamento de Ecologia de Ecossistemas Aquáticos e terrestres - Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 135. 2012.
- NISHIMURA, P. Y. et al. Phytoplankton primary productivity in Rio Grande and Taquacetuba branches (Billings Reservoir, São Paulo, Brazil). **Verh. Internat. Verein. Limnol**, v. 30, n. 1, p. 50-52, 2008.
- NÜBEL, U., GARCIA-PECHEL, F., MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3327-3332, 1997.
- OLIVER, R. L.; GRANF, G. G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. **The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space**. [S.l.]: Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 6, p. 149-194.
- PADISÁK, J. Seasonal succession of phytoplankton in a Large Shallow Lake (Balaton, Hungary) - A dynamic approach to ecological memory its possible role and mechanisms. **The Journal of Ecology**, v. 80, n. 2, p. 217-230, 1992.

- PADISÁK, J.; GRIGORSZKY, I. Use of phytoplankton assemblages for monitoring ecological status of lakes within the Water Framework Directive the assemblage index. **Hydrobiologia**, n. 553, p. 1-14, 2006.
- PADISÁK, J.; REYNOLDS, C. S. Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. **Hydrobiologia**, v. 384, p. 41-53, 1998.
- PAERL, H. W. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: HUDNELL, H. K. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of science and research needs**. [S.l.]: Advances in experimental medicine and biology, 2008. p. 217-213.
- POMPÊO, M. L. M.; CARDOSO-SILVA, S.; MOSCHINI-CARLOS, V. A deteriorização das águas continentais brasileiras: o processo de eutrofização. **Saneas**, p. 24-28, agosto 2005.
- REID, G. K.; WOOD, R. D. Dissolved solids in natural waters. In: REID, G. K. **Ecology of inland waters and estuaries**. New York: [s.n.], 1976. p. 224-257.
- 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.
- RIGONATO, J. et al. Cyanobacterial diversity in the phyllosphere of a mangrove forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, p. 312-322, 2012.
- ROMEIKE, J. et al. Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of Umbilicaria (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. **Molecular Biology and Evolution**, n. 19, p. 1209-1217, 2002.
- SANT'ANNA, C. L. et al. Planktik Cyanobacteria from Alto Tietê Basin, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 31, p. 1-15, 2007.
- SANTOS-WISNIEWSKI, M. J. et al. First record of the occurrence of Ceratium furcoides (Levander) Langhans 1925, an invasive species in the hydroelectricity power plant Furnas Reservoir, MG, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 67, n. 4, p. 791-793, 2007.
- SÃO PAULO. **Decreto Estadual nº 10.755**. Estado de São Paulo. São Paulo. 1977.
- SCHÄFER, A. **Fundamentos de ecologia e biogeografia das águas continentais**. Porto Alegre: UFRGS, 1984. 532 p.
- SOUZA, B. D. **Estrutura, dinâmica e produtividade primária do fitoplâncton com base para a estimativa do estado trófico de uma lagoa costeira no estado do Espírito Santo (lagoa Mãe-Bá, Guarapari)**. UENF. Campos dos Goytacazes, p. 163. 2008.
- 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. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p. 73-81, 1998.
- STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G. **Gerenciamento da qualidade da água de represas: São Carlos**. [S.l.]: ILEC IIE, v. v9, 2000. 280 p.
- STRICKLAND, J. D.; PARSONS, T. R. A manual os seawater analysis. **Bull Sihs. res. Bel. Can.**, v. 125, p. 1-185, 1960.
- SUN, J.; LIU, D. Geometric models for calculation cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 25, p. 1331-1346, 2003. ISSN 11.

- THOMAS, R.; MAYBECK, M. The use of particulate Matter. In: CHAPMAN, D. **Water Quality assessments**. [S.l.]: Chapman & Hall, 1992. p. 121-170.
- TOLEDO, L. G.; FREITAS, F. S.; FERREIRA, C. J. A. Variações diurnas de padrões limnológicos no lago Paranoá. **Acta Limnol. Brasil**, v. 2, p. 219-238, 1988.
- TOWSEND, S. A. The seasonal pattern of dissolved oxygen, and hypolimnetic deoxygenation, in two tropical Australian reservoir. **Lakes & Reservoir**, 1999.
- TUCCI, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Suba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relação com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 97-112, 2003.
- TUNDISI, J. G. Distribuição espacial, sequência temporal e ciclo sazonal do fitoplâncton em represas: Fatores limitantes e controladores. **Brasileira de Biologia**, v. 50, p. 937-955, 1990.
- TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima, 2003. 248 p.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; CALIJURI, M. C. Limnology and management os reservoir in Brazil. In: STRASKRABA, M.; TUNDISI, J. G.; DUNCAN, A. **Comparative reservoir limnology and water quality management**. [S.l.]: Nethrlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 25-55.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O. Theoretical basis for reservoir management. In: TUNDISI, J. G.; STRAKRABA, M. **Theoretical reservoir ecology and its applications**. [S.l.]: Backhuys Publishers, 1999. p. 505-528.
- TUNDISI, J. G.; SAIJO, Y. **Represas artificiais Perspectivas para o controle e manejo da qualidade da água para usos múltiplos**. IV Simpósio Brasileiro de Hidrologia e Recursos Hídricos. [S.l.]: [s.n.]. 1985.
- UTERMÖL, H. Zur vervollkomnung der quantitativen phytoplankton-methodik. **Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 9, p. 1-38, 1958.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae - An Introduction to phycology**. [S.l.]: Cambridge University Press, 1997. 627 p.
- WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. Freshwater Habitats of Algae. In: WEHR, J. D. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 11-57.
- WENGRAT, S.; BICUDO, D. D. C. Spatial evaluation of water quality in an urban reservoir (Billings Complex, southeastern Brazil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 2, p. 200-216, 2011.
- WETZEL, R. G. **Limnology**. 3ª Edição. ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological Analyses**. [S.l.]: Springer-Verlag, 1991. 391 p.
- WHATELY, M.; CUNHA, P. **Seminário Guarapiranga - Proposição de ações prioritárias para garantir água de boa qualidade para abastecimento público**. Instituto Socio Ambiental. [S.l.], p. 171. 2006.
- XAVIER, M. B. Represa Billings - São Paulo I. Fitoplâncton e características físicas da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 8, p. 23-46, 1981.
- ZOKARY, T.; ROBERTS, R. D. Hyperscums and the population dynamics of *Microcystis aeruginosa*. **J. Plankton**, n. 12, p. 423, 1990.