LEILANE BARBOSA RONQUI

**ESTUDO DE REDE TRÓFICA MICROBIANA (PROTOZOOPLÂNCTON E BACTERIOPLÂNCTON)
E ASPECTOS LIMNOQUÍMICOS EM LAGO ÁCIDO DE MINA DE URÂNIO
(CAVA DA MINA OSAMU UTSUMI), NO RESERVATÓRIO DAS ANTAS E NO
RESERVATÓRIO BORTOLAN, SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES DA
UNIDADE DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS, CALDAS, M.G.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2013

LEILANE BARBOSA RONQUI

ESTUDO DE REDE TRÓFICA MICROBIANA (PROTOZOOPLÂNCTON E BACTERIOPLÂNCTON) E ASPECTOS LIMNOQUÍMICOS EM LAGO ÁCIDO DE MINA DE URÂNIO (CAVA DA MINA OSAMU UTSUMI), NO RESERVATÓRIO DAS ANTAS E NO RESERVATÓRIO BORTOLAN, SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES DA UNIDADE DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS, CALDAS, M.G.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Heliana de Azevedo Franco do Nascimento

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Ronqui, Leilane Barbosa.

Estudo de rede trófica microbiana (Protozooplâncton e Bacterioplâncton) e aspectos limnoquímicos em lago ácido de mina de urânio (cava da mina Osamu Utsumi), no reservatório das Antas e no reservatório Bortolan, sob influência de efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios, Caldas, M.G. / Leilane Barbosa Ronqui. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Heliana de Azevedo Franco do Nascimento

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Meio ambiente.

Versão do título para o inglês: Microbial food web study (Protozooplankton and Bacterioplankton) and limno-chemical aspects in Uranium acid mine lake (Osamu Utsumi Pit Mine), in Antas and Bortolan reservoirs under the influence of effluent Ore Treatment Unit, Caldas - Minas Gerais State.

1. Biologia 2. Ecologia 3. Limnologia 4. Microbiologia 5. Impacto ambiental 6. Recursos hídricos I. Nascimento, Profa. Dra. Heliana de Azevedo Franco do II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB096/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Leilane Barbosa Ronqui.

Título da Tese: Estudo de rede trófica microbiana (Protozooplâncton e Bacterioplâncton) e aspectos limnoquímicos em lago ácido de mina de urânio (cava da mina Osamu Utsumi), no reservatório das Antas e no reservatório Bortolan, sob influência de efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios, Caldas, M.G.

Orientador(a): Profa. Dra. Heliana de Azevedo Franco do Nascimento

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais (Luís e Luiza) pelo incentivo, paciência, amizade, participação, apoio psicológico e financeiro no período de realização desta tese e durante toda minha vida. Aos grandes amigos antigos e aos novos que conheci na Espanha pelos momentos de descontração e alegria e ao meu companheiro, por me fazer passar por momentos na vida que nos obrigam a ser fortes e seguir em frente, sem olhar para trás.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Heliana de Azevedo pelo empenho e paciência na orientação desta tese de doutorado e, especialmente pela confiança mais uma vez depositada em mim.

- Aos técnicos e amigos de tantos anos, Cláudio Vítor Roque e Armando Bruschi do Laboratório de Radioecologia da CNEN, por terem me auxiliado nas análises laboratoriais e na realização das coletas, sendo de suma importância para os resultados contidos neste estudo.

- Aos meus colegas e amigos de laboratório Michelle Burato de Campos, Msc. Carla Rolim Ferrari, Dra. Suzelei Rodgher, Palvo Joubert Borba Júnior e Thiago Villas Boas pela participação nas coletas e nas análises laboratoriais.

- Às também colegas de laboratório e amigas Dra. Poliana de Paula Brito por me ouvir e me aconselhar tantas vezes e a Msc. Roberta D'Ângelo por me auxiliar em conhecimentos sobre biologia molecular.

- À nossa grande ajudante Eva Mariano e Sonia de Cássia Carvalho por me ajudar lavando e autoclavando todas as vidrarias utilizadas na pesquisa, organizando nosso laboratório e sempre sabendo onde encontrar nossos materiais e amostras.

- Agradeço à responsável TI do Lapoc/Cnen Maria do Rêgo Gomes sempre me ajudando com os computadores e os problemas relacionados à informática e pela ajuda na obtenção de artigos científicos e impressão da tese.

- À Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim pela atenção, auxiliando me na identificação das comunidades protozooplactônicas.

- Ao Prof. Dr. Rafael Barrionuevo Giménez por me aceitar como aluna Erasmus Mundus e supervisionar-me em minha estadia na Faculdade de Engenharia de Minas no Departamento de Tecnologia do Meio Ambiente da Universidad de Vigo (Galícia, Espanha); sendo não só um professor e tutor pero um grande amigo.

- *A el Profesor PhD. Rafael Barrionuevo Giménez por haberme aceptado cómo estudiante de Erasmus Mundus y supervisar me en mi estancia en la Facultad de Ingeniería de Minas en el Departamento de Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Vigo (Galicia, España), siendo no sólo un profesor y tutor pero un gran amigo.*

- Ao Dr. José Flávio Macacini pelo auxílio nas fórmulas matemáticas e incentivo em momentos de problemas com os resultados.

- Ao Dr. Marcos Roberto Lopes do Nascimento pela realização das análises químicas e de metais totais e a todos os técnicos de seu laboratório.

- A todos os funcionários da CNEN que participaram deste trabalho pela colaboração e ajuda.

- Ao Prof. Dr. Tito Cesar Marques de Almeida (CTT-Mar/Univali - SC) pelo auxílio nas análises estatísticas Multivariadas.

- Ao Prof. Msc. Leo Lynce Valle de Lacerda (CTT-Mar/Univali - SC) pelo auxílio nas análises estatísticas de Teste t-pareado e no Teste de WILCOXON.

- Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão (ESALQ - USP) e ao aluno Msc. João Vitor Teodoro pelo auxílio nas análises estatísticas ANOVA.

- À CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear pela infraestrutura oferecida para este trabalho.

- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG pelos recursos financeiros concedidos para a realização do trabalho e pela primeira bolsa de estudos concedida para a inicialização deste estudo.

- À União Europeia e ao Programa de Intercâmbio Estudantil ERASMUS MUNDUS 2010-2011 pela bolsa de estudos concedida para a realização de meu doutorado sanduiche na Espanha.

- Ao Conselho Nacional de Apoio a Pesquisa Científica - CNPq e à Pró-Reitoria de Pós Graduação da Universidade de São Paulo pela bolsa de estudos concedida para o término deste estudo.

- Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos Aquáticos da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

- Ao Departamento de Botânica do Laboratório de Ficologia Vegetal - UFSCar pelas análises de carbono.

- Agradeço ao meu companheiro Breno Guinart Marques pela paciência, apoio, carinho e compreensão nos momentos em que foi possível estarmos juntos.

- Agradeço aos meus pais, acima de tudo, por existirem e estarem sempre presentes em todos os momentos de dificuldade, nervosismo e ansiedade, medo, derrota, confortando-me e apoiando-me integralmente.

*Nosso propósito não deve ser prejudicado pelas oito preocupações mundanas: ganho ou perda, prazer ou dor, **elogio ou crítica**, fama ou infâmia"*

Dalai Lama

"O trabalho duro supera o talento quando o talento não trabalha duro"

autor desconhecido

RESUMO

RONQUI, L. B. Estudo de rede trófica microbiana (Protozooplâncton e Bacterioplâncton) e aspectos limnoquímicos em lago ácido de mina de urânio (cava da mina Osamu Utsumi), no reservatório das Antas e no reservatório Bortolan, sob influência de efluentes da Unidade de Tratamento de Minérios, Caldas, M.G. 2013. 257 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Foi realizada neste estudo a avaliação dos aspectos limnoquímicos, bem como o estudo da rede trófica microbiana (protozooplâncton e bacterioplâncton) pertencente ao lago ácido de mina de urânio (CM) e a avaliação dos possíveis efeitos dos efluentes ácidos tratados e liberados pela UTM/INB sobre a Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas no reservatório das Antas (ponto P41) e a jusante deste, no reservatório Bortolan. Além da realização das análises físicas e químicas e a quantificação do protozooplâncton e do bacterioplâncton, foi realizada a padronização e implantação de técnica independente de cultivo Hibridização Fluorescente "In Situ" - FISH utilizando-se sondas de oligonucleotídeos marcadas com o corante Cy3, para a detecção de bactérias dos domínios Archaea e Bacteria, tanto para o lago ácido de mina de urânio quanto para os reservatórios. De acordo com os resultados verificados neste estudo, o CM apresentou os maiores valores para as variáveis químicas avaliadas, os menores valores de pH, a menor diversidade e densidade de protozooplâncton, porém, elevada biomassa protozooplanctônica, evidenciando a presença de espécies tolerantes a tais condições ambientais extremas. Os reservatórios das Antas e Bortolan apresentaram diferenças em relação às variáveis abióticas e bióticas, o RA mostrou sofrer maior interferência dos efluentes ácidos tratados e liberados no ponto P41 e a jusante desse, no ponto P14, apresentando menor biomassa do protozooplâncton, menor densidade bacteriana, menor índice de estado trófico e fontes de poluição características de fontes inorgânicas, provavelmente devido a falhas no sistema de tratamento dos efluentes tratados e lançados neste reservatório. Por outro lado, o RB apresentou maior índice de estado trófico, maior densidade e biomassa tanto de protozooplâncton quanto de bacterioplâncton, maiores valores para as concentrações de clorofila *a*, nutrientes e fontes de poluição características de origem orgânica, provavelmente devido sua proximidade da malha urbana da cidade de Poços de Caldas. Utilizando-se a técnica FISH refinada, neste estudo, para os corpos de água avaliados, foi possível detectar a presença de micro-organismos do domínio Archaea nos três corpos de água avaliados, bem como a presença de Bacteria. Sendo assim, os resultados do presente estudo contribuem para o conhecimento a nível limnológico de lagos de cava de mina, os quais têm se tornado fonte de grande preocupação devido ao aumento das explorações mineiras, bem como detectar possíveis efeitos dos efluentes ácidos e radioativos lançados no meio ambiente.

Palavras-chave: Lago de Cava de Mina Ácido. Mina de Urânio. Protozooplâncton. Bacterioplâncton. Reservatório Bortolan. Reservatório das Antas.

ABSTRACT

RONQUI, L. B. **Study of microbial trophic network (Protozooplankton and Bacterioplankton) and limnochemical aspects in a uranium mine acid lake (mine Osamu Utsumi's open pit) in Antas and Bortolan reservoirs, under the influence of the effluents from the Ore Treatment Unit in Caldas, M.G.** 2013. 257 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In this study, the evaluation of limnochemical aspects, as well as the study of the microbial trophic network (protozooplankton and bacterioplankton) belonging to the uranium mine acid lake (CM) and the assessment of possible effects of acidic effluents treated and released by the UTM/INB into the Ribeirão das Antas Sub-Basin of the Antas reservoir (P41) and into its downstream - the Bortolan reservoir - were conducted. In addition to the execution of a series of physical and chemical analyses and quantification of protozooplankton and bacterioplankton, the standardization and implementation of the independent technique of *Fluorescent In Situ Hybridization* -FISH - was conducted using oligonucleotides probes stained with Cy3 for bacteria detection of the domains Archaea and Bacteria, both for the uranium mine acid lake and for the reservoirs. According to the results observed in this study, CM presented the highest values for the chemical variables evaluated, the lowest pH values and the least diversity and density of protozooplanktons. However, it presented high protozooplanktonic biomass, demonstrating the presence of species tolerant to such extreme environmental conditions. The Antas and Bortolan reservoirs presented differences in relation to abiotic and biotic variables; the RA indicated greater interference from the acidic effluents treated and released into point P41, and on its downstream, point P14, presenting less protozooplankton biomass, lower bacterial density, lower trophic state index and sources of pollution characteristic of inorganic sources, probably due to flaws in the treatment system of the effluents released into this reservoir. On the other hand, RB presented higher trophic state index, higher density and biomass of both protozooplanktons and bacterioplanktons, greater values for chlorophyll a concentrations, nutrients and sources of pollution characteristic of organic origin - probably due to its proximity to the urban area of the city of Poços de Caldas. Through the use of the refined FISH technique in this study, for the water bodies assessed, it was possible to detect the presence of microorganisms of the Archaea and Bacteria domains in the three water bodies assessed. Thus, the results of the current study contribute to the knowledge, at a limnological level, of open pit lakes (which have become a source of great concern due to the increase of mining operations), as well as the detection of possible effects of acid and radiological effluents released into the environment.

Keywords: Mine pit acid lake. Uranium mine. Protozooplankton. Bacterioplankton. Bortolan reservoir. Antas reservoir.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da região do Planalto de Poços de Caldas – MG englobando os reservatórios das Antas e Bortolan e a Instalação Nuclear da UTM/INB (Caldas-MG).....	46
Figura 2a - Esquema dos processos de fixação, preparo da amostra para hibridização e a hibridização em estufa.	61
Figura 2b - Esquema dos processos de lavagem da amostra hibridizada, coloração com Dapi e montagem da lâmina para visualização em microscopia de epifluorescência.	63
Figura 3a - Valores mínimos e máximos para temperatura do ar e umidade relativa e somatória dos valores para índice pluviométrico, na região dos reservatórios das Antas e Bortolan e na cava da mina - UTM/INB no período de 2008-2009.....	70
Figura 3b - Velocidade do vento, na região dos reservatórios das Antas e Bortolan e da cava da mina - UTM/INB no período de 2008-2009.....	70
Figura 4 - Variação dos valores de pH em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.	73
Figura 5 - Variação dos valores de condutividade elétrica da água em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) nos meses de amostragem avaliados.	73
Figura 6 - Variação dos valores da concentração de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico (MSO) e material em suspensão inorgânico (MSI) em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) nos meses de amostragem avaliados.....	76
Figura 7 - Variação dos valores da concentração de clorofila <i>a</i> em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.	77
Figura 8 - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT) e suas frações dissolvidas de carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água dos pontos de Superfície do reservatório das Antas e Bortolan (Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.	78
Figura 9a - Concentração de Fósforo total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	80
Figura 9b - Concentração de Fosfato total dissolvido e Fosfato Inorgânico em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.	80

Figura 9c - Concentração de Nitrogênio total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	82
Figura 9d - Concentração de Nitrato em amostras de água dos pontos de Superfície ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	83
Figura 9e - Concentração de Nitrito em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	83
Figura 9f - Concentração de íon Amônio em amostras de água dos pontos de Superfície ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	84
Figura 9g - Concentração de Silicato em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	85
Figura 10a - Valores de dureza em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.	88
Figura 10b - Valores de sulfato em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.	89
Figura 10c - Valores de fluoreto em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.	89
Figura 10d - Valores de manganês em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	90
Figura 10e - Valores de Zinco em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.	90
Figura 10f - Valores de Urânio e Tório em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	91
Figura 10g - Valores de Ferro total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.....	91
Figura 11 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton ao longo dos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.....	97
Figura 12 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton, ao longo dos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) e meses de amostragem.	99
Figura 13a - Diagrama representativo dos eixos fatoriais 1 e 2 extraídos a partir da Análise de Componentes Principais aplicado sobre os resultados de Superfície.	101

Figura 13b - Diagrama de ordenação da CCA nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de outubro de 2008, janeiro, abril e julho de 2009.	103
Figura 14 - Variação dos valores de pH em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	108
Figura 15 - Variação dos valores condutividade elétrica da água em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	109
Figura 16 - Variação dos valores da concentração de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico (MSO) e material em suspensão inorgânico (MSI) em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	112
Figura 17 - Variação dos valores da concentração de clorofila <i>a</i> em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	113
Figura 18a - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água da coluna vertical do reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F), nos meses de amostragem avaliados.	115
Figura 18b - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água da coluna vertical do reservatório Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	115
Figura 19a - Concentração de Fósforo total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	117
Figura 19b - Concentração de Fosfato Orgânico total dissolvido e Fosfato Inorgânico total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	118
Figura 19c - Concentração de Nitrogênio total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F), e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F) nos meses de amostragem avaliados.	120

Figura 19d - Concentração de Nitrato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	120
Figura 19e - Concentração de Nitrito em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	121
Figura 19f - Concentração de íon Amônio em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	122
Figura 19g - Concentração de Silicato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	123
Figura 20a - Concentração dos valores de Dureza em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	126
Figura 20b - Concentração dos valores de Sulfato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	126
Figura 20c - Concentração dos valores de Fluoreto em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	127
Figura 20d - Concentração dos valores de Manganês em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	128
Figura 20e - Concentração dos valores de Zinco em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	128
Figura 20f - Concentração dos valores de Urânio e Tório em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	129

Figura 20g - Concentração dos valores de Ferro total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	130
Figura 21 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton ao longo dos pontos de coleta verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem.....	138
Figura 22 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton ao longo dos pontos de coleta Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem.....	140
Figura 23 - Diagrama representativo dos eixos fatoriais 1 e 2 extraídos a partir da Análise de Componentes Principais aplicado sobre os resultados verticais.	141
Figura 24 - Índice de estado trófico calculado pelas concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila <i>a</i> em amostras de água dos pontos de Superfícies (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	144
Figura 25 - Índice de Saprobiidade de Pantle e Buck calculado a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados neste estudo, nos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.....	145
Figura 26 - Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (<i>H'</i>), calculados a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados, nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.	147
Figura 27 - Índice de estado trófico calculado pelas concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila <i>a</i> em amostras de água dos pontos Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.	148
Figura 28 - Índice de Saprobiidade de Pantle e Buck calculado a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados neste estudo, nos pontos de coleta Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14f) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.....	149
Figura 29 - Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (<i>H'</i>) calculados a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados, nos pontos Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	151

Figura 30A - Sem a adição do detergente TWEEN90. Figura 30B - Utilizando o detergente TWEEN90.	152
Figura 31A - Sonicada. Figura 31B - Sem sonicar.	152
Figuras 32A e 32B - Figura 32A: Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 0,8 - 8,0 µm; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras. Figura 32B: Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 1,2 µm; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.	153
Figuras 32C e 32D - Figura 32C: Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 3,0 µm; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras. Figura 32D: Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 10 µm; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.	153
Figura 32E - Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 20 µm; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.	154
Figuras 33A e 33B - Teste para confirmação da existência de envoltório capsular nas células bacterianas do ponto CM. Microscopia de contraste de fase.	155
Figura 34 (A e B) - Amostra fixada com formaldeído e lavada com Etanol 96% P.A.	155
Figura 35 (A e B) - Figura 35A: DAPI (ponto CM): Amostra fixada com formaldeído, lavada com etanol 96% e permeabilizada com lisozima. Figura 35B: DAPI (ponto CM): Amostra fixada com formaldeído, lavada com etanol 96% e permeabilizada com lisozima.	156
Figura 35C - DAPI e Cy3 sonda EUBmix (ponto CM). Amostra hibridizada, após uso de etanol 96%, permeabilizada com lisozima.	156
Figura 35D - DAPI e Cy3 sonda EUBmix (ponto CM). Amostra hibridizada, após o uso de etanol 96%, permeabilizada com lisozima.	156
Figura 36 (a e b) - Células coradas em DAPI e hibridização com a sonda ARCH915 / corante Cy3.	157
Figura 36 (c e d) - Figura 36c: Células de <i>Escherichia coli</i> hibridizadas com as sondas EUB338, EUB338-II, EUB338-III e marcadas com o corante fluorescente Cy3. Figura 36d: Células de <i>Escherichia coli</i> hibridizadas, utilizando-se a sonda EUB338 marcada com Rodamina Red-X.	157
Figura 37 (a, b e c) - Testes de funcionalidade das sondas. (Pico de absorção da sequência de oligonucleotídeos do DNA em torno de 260 nm; pico de absorção do fluorocromo Cy3 em torno de 549 nm).	159

Figura 38 - Comparativo entre a porcentagem de resultados positivos (células hibridizadas) na 1º Etapa de Testes (roxo) e na 2º Etapa de Testes (azul), frente à porcentagem total de células visualizadas (DAPI).....	166
ANEXO A: Figura 1 - Funcionalidade das sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodamina Red-X.	243

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a - Localização geográfica (*GPS 12CX Garmim - Europe) dos pontos de coleta nos reservatórios das Antas e Bortolan e na UTM/INB, no ponto cava da mina, amostrados no presente estudo.....	47
Tabela 1b - Características morfométricas e hidrológicas dos pontos de coleta nos reservatórios das Antas e Bortolan e na UTM/INB, no ponto cava da mina, amostrados no presente estudo.....	47
Tabela 2 - Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na 2º etapa de testes e padronização da técnica FISH neste estudo.	59
Tabela 3 - Valores de pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e potencial de óxido-redução (Eh) em amostras da UTM/INB no ponto CM.	74
Tabela 4 - Valores de pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e potencial de óxido-redução (Eh) em amostras procedentes dos pontos de Superfície dos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S).....	74
Tabela 5 - Valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo) e dos metais totais: alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.	93
Tabela 6 - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos de Superfície (CM, P41, Cab, P14S e RB-S), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 20.....	95
Tabela 7a - Resultado da Análise de Correspondência Canônica e teste de significância dos eixos canônicos (Monte Carlo test).	103
Tabela 7b - Correlações das Variáveis abióticas com os eixos canônicos 1 e 2.....	105
Tabela 7c - Distribuição das estações e pontos de amostragem, ao longo dos eixos canônicos 1 e 2.	105
Tabela 8 - Valores de pH, temperatura, condutividade (Condut.), oxigênio dissolvido (OD), potencial de óxido-redução (Eh) e transparência da água (transp.) em amostras de água provenientes dos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan registrados no presente estudo.....	110

Tabela 9 - Valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo) e dos metais alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos verticais do RA (P14S, P14M e P14F) e do RB (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.	131
Tabela 10a - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos Verticais do reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 11.	134
Tabela 10b - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos Verticais do reservatório Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 12.....	135
Tabela 11 - Metodologia padronizada para a técnica FISH nos três corpos de água, avaliados neste estudo.	161
Tabela 12 - Número de testes realizados na 2ª Etapa para cada passo testado e incluído (dispersão celular, sonicação, concentração de formamida (FA) no tampão de hibridização, limpeza da amostra e permeabilização celular) na metodologia de hibridização fluorescente " <i>in situ</i> " para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Cy3.	165
Tabela 13a - Comparativo entre o número total de campos microscópicos avaliados em DAPI e de resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodmina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.	165
Tabela 13b - Teste t-Pareado para o comparativo entre os resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Rodmina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.....	166
Tabela 13c - Resultado do Teste de Wilcoxon para o comparativo entre os resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodmina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.	167
Tabela 14 - Índice de Estado Trófico descrito por Carlson (1977) para os valores de clorofila a e fósforo total do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi.	197

ANEXO A: Tabela 1 - Sondas de oligonucleotídeos.	240
ANEXO A: Tabela 2 - Número de testes realizados e resultados positivos com as sondas EUB338 e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Rodamina.....	241
ANEXO A: Tabela 3 - 1º ETAPA DE TESTES: Condições de hibridização e lavagem para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante Rodamina.....	242

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al - alumínio	nm - nanômetros
Alg - algívoro	OD - oxigênio dissolvido
Alg/Ki - algas/diatomáceas	O - omnívoro
As - arsênio	O₂ - oxigênio
Bac/Alg/Fun - bactérias/algas/fungos	PFA - paraformaldeído
Bac/Flag/Cil - bactérias/flagelados/ciliados	PO₄ - fosfato inorgânico
BRS - bactérias redutoras de sulfato	P total - fósforo total
BTPROT - biomassa total protozoários	Pb - chumbo
BIOFITO - biomassa fitoplanctônica	Prot/Bac - Protistas/Bactérias
°C - graus Celsius	R - predador
Ca - cálcio	RA - reservatório das Antas
Cd - cádmio	RB - reservatório Bortolan
Cl α - clorofila α	Rodamina - corante
CM - Cava da Mina	fluorescente/fluorocromo
Co - cobalto	Si - silicato
Cr - cromo	SO₄⁻² - sulfato
Cu - cobre	MST - material em suspensão total
Cy3 - Cyanine, corante	MSO - material em suspensão orgânico
fluorescente/fluorocromo	MSI - material em suspensão inorgânico
DAM - Drenagem ácida de mina	T - temperatura
DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, corante	T °C - temperatura em graus Celsius
fluorescente de DNA	Th - tório
DTBac - densidade total bactérias	U - urânio
DTPROT - densidade total protozoários	µg - microgramas
FA - formamida	µm - micrometro
Fa - formaldeído	Zn - zinco
F⁻ - fluoreto	UTM/INB - Unidade de Tratamento de
Fe - ferro	Minérios/Indústrias Nucleares do Brasil
Fe⁺² - ferro forma reduzida	
Fe⁺³ - ferro forma oxidada	
FISH - Fluorescence "in situ" Hybridization /	
Hibridização Fluorescente "in situ"	
g - grama	
H' - índice de diversidade de Shannon-	
Wiener	
Hg - mercúrio	
Ki/Alg/Bac - diatomáceas/algas/bactérias	
L - litro	
LMA - lago de mina ácido / lago de cava de	
mina ácido	
Mg - magnésio	
Mix - mixotrófico	
Mn - manganês	
Mo - molibdênio	

LISTA DE FÓRMULAS

FÓRMULA	NOME
$IET (P) + 2 \times (IET (PO_4) + IET (Cl)) / 7$	Índice de estado trófico médio
$T=3 \times H$	Tempo de sedimentação
$B=D \times b$	Biomassa úmida total
$F=100 \times Pa/P$	Frequência de ocorrência de espécies
$H = \sum P_i \log P_i / i$	Índice de diversidade de Shannon-Winer
$SIPB = \frac{\sum (N \times SI)}{\sum N}$	Índice de saprobidade
$N = \frac{g \times A \times D}{a \times V}$	Estimativa de densidade bacteriana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO - Justificativa	29
2 OBJETIVOS	33
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
3.1 Recursos hídricos e as atividades de mineração	34
3.2 Interface entre ambientes de água doce "naturais" e lagos ácidos de mina	36
3.3 Ecologia de lagos de mina ácidos ("Acid Pit Mine Lakes")	37
3.4 Ecologia microbiana e ambientes aquáticos extremos.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Delineamento experimental.....	44
4.1.1 Amostragem no perfil longitudinal.....	48
4.1.2 Amostragem no perfil vertical	48
4.1.3 Amostragem de água para Hibridização Fluorescente "in situ" (FISH)	49
4.2 Dados meteorológicos.....	50
4.3 Parâmetros físicos e químicos	50
4.2.2 Temperatura da água, oxigênio dissolvido, transparência da água, potencial hidrogênico, condutividade elétrica da água e potencial de óxido-redução	50
4.2.3 Material em suspensão	51
4.2.4 Clorofila <i>a</i>	51
4.2.5 Carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID)	52
4.2.6 Nutrientes	52
4.2.7 Dureza, sulfato, fluoreto, molibdênio, manganês, zinco, urânio, tório, ferro total, alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo	52
4.3 Índice de estado trófico.....	53
4.4 Parâmetros biológicos	54
4.4.1 Coleta e preparo de amostras para a quantificação e identificação de protozoários	54
4.4.2 Identificação dos protozoários planctônicos e estimativa da densidade, do biovolume e da biomassa.....	55
4.4.3 Índice de frequência de ocorrência.....	56

4.4.4 Índice de diversidade	56
4.4.5 Índice de saprobidade	56
4.5 Estimativa de biomassa fitoplanctônica	57
4.6 Bactérias planctônicas	57
4.6.1 Coleta e preparo de amostras	57
4.6.2 Estimativa da densidade bacteriana	58
4.6.3 FISH - Hibridização Fluorescente "in situ"	58
4.6.3.1 FISH - Testes Preliminares	59
4.6.3.1.1 Coleta e fixação das amostras	59
4.6.3.1.3 Hibridização	60
4.6.3.1.4 Lavagem	61
4.6.3.1.5 Etapa de coloração com Dapi e montagem da lâmina para observação em microscopia de epifluorescência	62
4.6.4 FISH - 2º Etapa de testes	63
4.6.4.1 Refinamento da técnica independente de cultivo FISH para a padronização e implantação em amostras de água da CM e reservatórios das Antas e Bortolan	63
4.6.4.2 Teste de funcionalidade das sondas de oligonucleotídeos	64
4.6.4.3 Fixação	64
4.6.4.4 Dispersão celular	65
4.6.4.5 Limpeza da amostra	65
4.6.4.6 Lavagem da amostra de água ácida	65
4.6.4.7 Permeabilização celular	65
4.6.4.8 Hibridização	66
4.6.5 Avaliação microscópica	66
4.7 Análises Estatísticas	67
4.7.1 Análise de variância	67
4.7.2 Análise multivariada	67
4.7.3 Teste t - Pareado e WILCOXON	68
5 RESULTADOS	69
5.1 Parâmetros meteorológicos	69
5.2 Amostragens no perfil longitudinal	71
5.2.1 Variáveis físicas e químicas	71

5.2.1.1 pH, temperatura da água, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, potencial de oxido-redução (Eh) e transparência da água	71
5.2.1.2 Material em suspensão total, orgânico e inorgânico	75
5.2.1.4 Carbono	77
5.2.1.5 Nutrientes	79
5.2.1.5.1 Fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico	79
5.2.1.5.2 Nitrogênio total, nitrato, nitrito e íon amônio	81
5.2.1.5.3 Silicato	84
5.2.1.6 Dureza, Sulfato, Fluoreto, Molibdênio, Manganês, Zinco, Urânio, Tório, Ferro total, Alumínio, Cádmio, Cobalto, Cromo, Cobre e Chumbo	85
5.2.2 Variáveis biológicas	94
5.2.2.1 Composição taxonômica da comunidade de protozoários planctônicos nos pontos do perfil longitudinal	94
5.2.2.2 Distribuição espacial e temporal do protozooplâncton, do bacterioplâncton e da biomassa fitoplanctônica nos pontos do perfil longitudinal	96
5.2.2.3 Análise multivariada	100
5.2.2.3.1 Relações das variáveis abióticas e bióticas sazonal e espacialmente, ao longo dos pontos do perfil longitudinal (CM, Cab, P41, P14S e RB-S)	100
5.3 Amostragens no perfil vertical	107
5.3.1 Variáveis físicas e químicas	107
5.3.1.1 pH, temperatura da água, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, potencial de oxido-redução (Eh) e transparência da água	107
5.3.1.2 Material em suspensão total, orgânico e inorgânico	111
5.3.1.3 Clorofila a	112
5.3.1.4 Carbono	113
5.3.1.5 Nutrientes	116
5.3.1.5.1 Fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico	116
5.3.1.5.2 Nitrogênio total, nitrato, nitrito e íon amônio	118
5.3.1.5.3 Silicato	122
5.3.1.6 Dureza, sulfato, fluoreto, molibdênio, manganês, zinco, urânio, tório, ferro total e Metais totais (alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo)	123
5.3.2 Variáveis biológicas no perfil vertical	132

5.3.2.1 Composição taxonômica da comunidade de protozoários planctônicos na coluna de água dos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan	132
5.3.2.2 Distribuição espacial e temporal do protozooplâncton, do bacterioplâncton e da biomassa fitoplanctônica, nos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan	136
5.3.2.3 Relações das variáveis abióticas e bióticas, sazonal e espacialmente, ao longo dos pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F).....	141
5.4 Índices	143
5.4.1 Perfil longitudinal	143
5.4.1.1 Índice de estado trófico	143
5.4.1.2 Índice de saprobidade.....	144
5.4.1.3 Índice de diversidade	146
5.4.2 Perfil vertical	147
5.4.2.1 Índice de estado trófico	147
5.4.2.2 Índice de saprobidade.....	149
5.4.2.3 Índice de diversidade	150
5.5 Resultados FISH	151
5.5.1 Resultados das etapas testadas e adicionadas a metodologia FISH.....	151
5.5.1.1 Dispersão celular - detergente TWEEN90.....	151
5.5.1.2 Dispersão celular - Banho de ultrassom sonificador.....	152
5.5.1.3 Limpeza da amostra	152
5.5.1.4 Permeabilização celular.....	155
5.5.1.5 Hibridização	157
5.5.1.6 Testes de funcionalidade das sondas de oligonucleotídeos	158
5.5.2 Resultado final: metodologia FISH implantada	160
5.5.2.1 Coleta e fixação das amostras	160
5.5.2.2 Filtração	161
5.5.2.3 Permeabilização	162
5.5.2.4 Hibridização Fluorescente "In Situ"	162
5.5.3 Hibridização Fluorescente "In Situ" (FISH) - adequamento e Implantação da técnica independente de cultivo para as águas do lago ácido de mina de urânio e para os reservatórios das Antas e Bortolan	164

6 DISCUSSÃO.....	167
6.1 Variáveis abióticas	167
6.2 Variáveis bióticas	182
6.2.1 <i>Perfil longitudinal</i>	182
6.2.2 <i>Perfil vertical</i>	190
6.3 Índices	193
6.3.1 <i>Índice de estado trófico</i>	193
6.3.2 <i>Índice de saprobidade</i>	200
6.3.3 <i>Índice de diversidade</i>	203
6.4 Hibridização Fluorescente " <i>In Situ</i> " - FISH	207
7 CONCLUSÕES	213
REFERÊNCIAS	215
ANEXOS.....	239
ANEXO A - 1º Etapa de testes FISH "Hibridização Fluorescente In Situ"	240
ANEXO B - Composição Taxonômica e Ocorrência dos Gêneros de Protozoários Planctônicos registrados nos reservatório das Antas, reservatório Bortolan e no ponto CM	244
ANEXO C - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORAMENTO.....	245
ANEXO E - Sugestões para estudos futuros.....	257

1 INTRODUÇÃO - Justificativa

No Brasil, existem áreas apresentando elevada radioatividade natural devido a depósitos de urânio e tório em areias monazíticas e intrusões alcalinas. O Planalto de Poços de Caldas caracteriza-se como uma das maiores intrusões alcalinas do mundo (35 Km^2 de diâmetro), localizado na região sudeste do Estado de Minas Gerais, Brasil (AMARAL et al., 1992) sendo, também, uma das áreas de maior radioatividade natural do mundo (FERNANDES; BODE, 1999).

Devido a estas características, as atenções voltaram-se para o Planalto de Poços de Caldas logo após se perceber que a rocha denominada caldasito, explorada há quase meio século pelo governo brasileiro como minério de zircônio, continha teores de urânio associado ao molibdênio (OLIVEIRA, 2011). Atualmente, o Brasil ocupa a sexta posição dentre as reservas mundiais de jazidas de urânio prospectadas em todo o mundo (INB, 2013).

O urânio, inicialmente, no Brasil foi extraído das jazidas do Complexo Alcalino de Poços de Caldas, onde se instalou, em 1980, o Complexo Mínero-Industrial (CIPC) na cidade de Caldas, Minas Gerais - Brasil, hoje denominada Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM/INB), que operou até 1994. Neste período, de forma descontínua, foi produzido um total de 1.124 toneladas de concentrado de urânio (diuranato de amônio – DUA, contendo aproximadamente 85% de óxido de urânio U_3O_8), que constituíram a matéria prima para o ciclo do combustível nuclear (OLIVEIRA, 2011).

Este complexo, ou seja, a UTM/INB, é constituído de uma mina "a céu aberto" (lago de cava de mina ácido - Osamu Utsumi - CM) e suas áreas de rejeitos de mineração (bota-foras), instalações para tratamento físico do minério, usina de tratamento químico para extração de urânio por processos hidrometalúrgicos, bacia de rejeitos da mina, instalações para fins administrativos e uma fábrica de ácido sulfúrico (FERRARI, 2010; GARCIA Jr., 1989).

Um dos mais graves problemas ambientais causados pela indústria de mineração é a drenagem ácida de mina (DAM) e a consequente acidificação dos recursos hídricos próximos à região. A DAM é caracterizada como uma água ácida, contendo metais liberados, a partir de minerais sulfetados pela oxidação dos sulfetos metálicos presentes, que é catalisada por micro-organismos acidofílicos oxidantes de ferro e enxofre (OLSON et al., 2003). A presença de várias espécies bacterianas, incluindo procariotos quimiolitotróficos, como *Acidithiobacillus* spp. e *Leptospirillum* spp., têm sido relatados em ambientes de mineração.

A condição fundamental para que ocorra a lixiviação bacteriana e geração da DAM, é a presença de sulfetos metálicos, tais como a pirita (FeS_2) associados ao minério bruto, como ocorre nas pilhas de estéreis gerados pela mina de urânio Osamu Utsumi, Caldas (Minas Gerais, Brasil) (CAMPOS et al., 2011).

A drenagem ácida de mina gerada nas pilhas de estéreis de minério, desta instalação nuclear, é bombeada até o ponto CM, onde, posteriormente, recebe tratamento químico com óxido e hidróxido de cálcio, visando à elevação do valor de pH (= 9,9) e sedimentação dos elementos químicos e radionuclídeos presentes. Após tratamento e decantação, o efluente é liberado por gravidade no meio ambiente num reservatório localizado próximo à bacia de decantação (Reservatório das Antas - RA, localizado na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas) (RODGHER et al., 2013).

Na região da cabeceira do reservatório das Antas (RA), inicia-se a Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, que constitui a maior e principal rede hidrográfica do Planalto de Poços de Caldas - Minas Gerais. O reservatório das Antas foi construído com a finalidade de abastecimento de água para a UTM/INB, bem como para receber os efluentes tratados dessa instalação nuclear, procedentes de drenagens ácidas de pilhas de rejeitos da mina de urânio.

A jusante do reservatório das Antas localiza-se o reservatório Bortolan (RB), próximo à cidade de Poços de Caldas (MG), fazendo parte da sub-bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, como o RA. Em relação ao RB, não há relato de estudos contemplando as características de funcionamento, ecologia e diversidade das comunidades protozooplanctônicas e bacterioplanctônicas, os estudos realizados até o presente momento os de Ferrari (2010) e Rodgher et al. (2013).

Assim, os três corpos de água supracitados (Cava da Mina, reservatório das Antas e reservatório Bortolan) constituem um sistema hídrico impar a ser estudado no Brasil e no mundo, uma vez que, engloba o efluente *in natura* (CM), tal efluente após o tratamento e liberação no meio ambiente (RA) e a jusante do ponto de lançamento do efluente, o reservatório seguinte, ou seja, o reservatório Bortolan (RB).

A realização de um estudo limnológico nestes corpos de água poderá contribuir de maneira decisiva para a fundamentação e a expansão do estudo ecológico nestes sistemas e em sistemas aquáticos com características semelhantes. Atualmente, o gerenciamento de sistemas aquáticos continentais não pode prescindir da base limnológica de conhecimento,

para promover o gerenciamento efetivo e de longo prazo dos sistemas aquáticos brasileiros (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008) visto que os estudos limnológicos baseiam-se em processos sazonais e estabelecem novas perspectivas para a compreensão das interações entre os ciclos climatológicos, hidrológicos, de produtividade primária planctônica e dos ciclos biogeoquímicos (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). Assim, o conjunto de organismos que vivem nos diferentes sistemas aquáticos continentais: lagos, rios, represas, tanques artificiais, pequenas poças naturais de água, áreas alagadas e estuários, se traduzem num complexo de grande importância botânica, zoológica, ecológica e econômica (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008) nos processos de gerenciamento de recursos hídricos.

Nestas comunidades, deve-se considerar: a biomassa (quantidade de matéria viva existente em um dado momento por unidade de área ou volume), a diversidade de espécies, a coexistência de várias espécies, a distribuição horizontal e vertical, flutuações e ciclos, visto que as inter-relações de dependência entre os diversos componentes das comunidades são fundamentais e seu estudo dinâmico permite caracterizar as principais funções dos componentes e a estrutura do sistema (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008).

Dentre tais comunidades aquáticas, os principais grupos de organismos que as compõem são os vírus (sendo seu papel nos ecossistemas aquáticos ainda pouco conhecido); as bactérias e os fungos (ambos possuem papel muito importante que é o da reciclagem de matéria orgânica e inorgânica, sendo intermediários em um grande número de transformações químicas na natureza) as algas, que podem constituir parte do fitoplâncton ou encontram-se anexas ao substrato, habitam uma variada gama de ecossistemas aquáticos continentais e marinhos e, finalmente, os protozoários, que são encontrados em todos os sistemas aquáticos continentais, possuem muitas espécies, são cosmopolitas devido à facilidade de dispersão das formas de resistência, alimentam-se de detritos, bactérias e algas, locomovendo-se por meio de flagelos ou cílios, contêm representantes de todos os grupos de protozoários de vida livre: ciliados, flagelados e sarcodinos (LAYBOURN-PARRY, 1992). Tundisi; Matsumura-Tundisi (2008) relatam que, em dados recentes sobre lagos brasileiros, foi confirmada a grande importância dos protozoários na reciclagem da matéria orgânica, a partir do processo envolvendo as bactérias heterotróficas seguidos da ingestão por partículas em suspensão da coluna de água e decomposição.

Além dos organismos vivos, que constituem a rede trófica microbiana de um sistema aquático, a cadeia alimentar microbiana depende de outros ciclos em ambientes aquáticos,

os ciclos biogeoquímicos, onde ocorre a distribuição e concentração dos elementos e substâncias dependentes da "fixação" e da concentração ativa de carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo e enxofre (macronutrientes) e dos micronutrientes, como manganês, ferro, cobre e zinco. Macronutrientes e micronutrientes encontram-se ou concentrados na matéria orgânica viva ou na matéria particulada e em decomposição ou ainda, dissolvida na água. A taxa de reciclagem dos nutrientes em ecossistemas aquáticos depende diretamente das inter-relações entre as misturas vertical e horizontal da coluna de água e da atividade e biomassa dos organismos aquáticos (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). Tais organismos atuam nos ciclos biogeoquímicos sendo importantes na excreção de nitrogênio, de fósforo e de compostos orgânicos. Após a morte decompõem-se e contribuem com o aporte de nitrogênio e fósforo no meio aquático e para o transporte ativo de nutrientes nos eixos vertical e horizontal do sistema e as plantas aquáticas fixam elementos biologicamente (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008).

Além dos ambientes aquáticos convencionais, ambientes extremos (ex: salinos, de elevadas temperaturas, de baixas temperaturas, apresentando extremos de pH, elevados valores de radiação, elevada pressão como às regiões de fendas oceânicas) são também importantes e deverão trazer novas perspectivas para o entendimento das redes tróficas microbianas nestes. Em tais ambientes, organismos denominados extremófilos, são capazes de prosperar sob condições extremas tornando-se assunto de interesse de estudos acadêmicos e biotecnológicos, devido ao interesse em suas características ecológicas e fisiológicas. O entendimento da ecologia microbiana em ambientes extremos, como é o caso do ponto CM, pode fornecer novos conhecimentos dentro dos limites da vida, possíveis origens evolutivas e avanços biotecnológicos (LÓPEZ-ARCHILLA; AMILS, 2001) como a biorremediação de ambientes impactados por minério de urânio.

Segundo Glockner, Fuchs e Amann, (1999), nos últimos anos, métodos moleculares baseados em análises comparativas de sequências do gene 16S do RNAr têm rendido novas perspectivas para o conhecimento da diversidade das comunidades do bacterioplâncton marinho e de água doce. Desde então, numerosas novas sequências de RNAr 16S foram descobertas, indicando que a grande maioria das espécies bacterioplanctônicas ainda não havia sido representada nas coleções de cepas marinhas e de água doce. Tais informações mostraram que o "bacterioplâncton" continha, juntamente com o grande Domínio Bacteria, membros do Domínio Archaea em sua composição taxonômica. A técnica de hibridização

quantitativa e/ou qualitativa obtida pela técnica independente de cultivo Hibridização Fluorescente "in situ" (FISH) com sondas de oligonucleotídeos marcadas com corantes fluorescentes na região do RNAr 16S representava, segundo Amann, Ludwig e Schleifer (1995) uma alternativa adequada para esta tarefa.

Sendo assim, baseando-se na literatura, utilizou-se a técnica FISH neste estudo, sendo realizados os primeiros testes utilizando-se de técnica de biologia molecular visando ao primeiro estudo de detecção, a nível filogenético, dos Domínios Bacteria e Archaeas no ponto CM e reservatórios das Antas e Bortolan.

Os resultados gerados neste estudo poderão contribuir para as necessidades de informação para ações de gerenciamento sustentável dos usos dos recursos hídricos, fornecendo dados para o enquadramento destes corpos de água de acordo com a Resolução 357/05 do Conama, bem como com informações visando ações de remediação de áreas degradadas da UTM/INB.

Sendo assim, torna-se imperativo para os órgãos licenciadores e fiscalizadores de instalações nucleares gerarem conhecimento acerca da Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, a fim de subsidiar a tomada de decisões relativas ao tratamento e gerenciamento de rejeitos e efluentes radioativos. Nesse contexto, o presente estudo foi realizado a fim de contribuir para o conhecimento dos ecossistemas aquáticos citados, uma vez que faltam informações acerca da caracterização qualitativa e quantitativa de importantes componentes da rede trófica microbiana (protozoários planctônicos e bacterioplâncton), bem como a caracterização de fatores abióticos nestes ambientes. A partir de estudo sazonal e espacial, o presente estudo foi realizado a fim de avaliar a possível influência dos efluentes líquidos da UTM/NB sobre a rede trófica microbiana juntamente com os aspectos limnológicos de reservatórios da Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, ou seja, reservatório das Antas e Bortolan.

2 OBJETIVOS

- Realizar a avaliação qualitativa e quantitativa da comunidade protozooplanctônica e quantitativa da comunidade bacterioplanctônica em amostras de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, bem como no lago ácido de cava de mina de urânio Mina Osamu Utsumi (CM);

- Caracterizar, sazonal e espacialmente, a comunidade planctônica (bacterioplâncton e protozooplâncton) em amostras de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, bem como no CM;
- Determinar as inter-relações das variáveis físicas e químicas com a distribuição sazonal/espacial da comunidade planctônica (protozooplâncton e bacterioplâncton) em amostras de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, bem como no CM e
- Adequar e implantar protocolo de técnica independente de cultivo, Hibridização Fluorescente "*in situ*" (FISH) em amostras de água do CM e nos reservatórios das Antas e Bortolan, para a detecção de micro-organismos pertencentes aos domínios Archaea e Bacteria.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Recursos hídricos e as atividades de mineração

No contexto de Limnologia, o estudo da água e do ciclo hidrológico assume importância na medida em que influencia, diretamente, a distribuição e a extensão dos corpos d'água continentais. Considerando o grau de impacto que sofrem, é fundamental e urgente o desenvolvimento de um esforço amostral para avançar no conhecimento das interações que ocorrem nestes ecossistemas e, assim, com embasamento científico, preservar, conservar e recuperá-los contra ações impactantes (BICCUDO, 2004).

Os vastos recursos hídricos do Brasil têm grande significado ecológico, econômico e social, porém a contínua interferência de atividades humanas nestes sistemas aquáticos produz impactos com consequências para a qualidade da água, a biota aquática e, conseqüentemente, o funcionamento de lagos, rios e represas. Dentre estas atividades impactantes, estão o desmatamento, o despejo de material residual, a construção de reservatórios e a mineração (REBOUÇAS; BRAGA; TUNDISI, 2006).

Esta se tornou importante para a economia brasileira, nas últimas décadas, representando cerca de, aproximadamente, US\$ 9,1 bilhões de investimentos ao ano (IBRAM, 2008). Por outro lado, um dos problemas ambientais decorrentes desta atividade é a drenagem ácida de mina, que pode comprometer a qualidade da água dos recursos hídricos da região (REBOUÇAS; BRAGA; TUNDISI, 2006). O Planalto de Poços de Caldas

(Minas Gerais) e a região carbonífera de Santa Catarina, ao sul do País (Estado de Santa Catarina) contribuem, significativamente, para este problema ambiental (SOUZA, 1995).

Para que ocorra a drenagem ácida de mina é fundamental a presença de sulfeto metálico associado ao minério. O mineral sulfetado sofre um processo de oxidação natural e, em contato com a água da chuva ou umidade, produz ácido sulfúrico que se dilui na água e solubiliza metais presentes na rocha. A drenagem ácida de mina é caracterizada por constituir-se em um efluente apresentando elevada acidez, bem como elevadas concentrações de metais solubilizados, como alumínio, cobre, ferro, manganês, zinco, urânio, entre outros (LYEW et al., 2001). Os metais são transportados através da drenagem dessa água e, quando alcançam os corpos de água ou lençóis freáticos, acabam comprometendo a qualidade dos mesmos. A composição do efluente dependerá da composição da rocha, bem como do processo produtivo de exploração do mineral (CAMPOS, 2006).

O Planalto de Poços de Caldas é uma região caracterizada por inúmeras anomalias de alta radioatividade natural associadas a rochas vulcânicas e depósitos de minerais de urânio. Os depósitos de urânio existentes no planalto de Poços de Caldas ocorrem associados ao sulfeto de ferro (FeS_2), propiciando as condições ideais para a ocorrência de drenagem ácida de mina (NORDSTROM; SMELLE; WOLF, 1990).

Nesta região, está localizada a Mina de Urânio Osamu Utsumi, que consiste na primeira de extração de minério de urânio do Brasil, localizada nas dependências da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM/INB). Na UTM/INB, encontra-se uma mina a céu aberto (Mina de Urânio Osamu Utsumi) e suas áreas de deposição de rejeitos de mineração, instalações de tratamento físico de minério, usina de tratamento químico, para extração de urânio e bacia de rejeitos, além das instalações de utilidades e administrativas. O funcionamento descontínuo desde 1977, em 1995 houve a paralisação definitiva (devido à exaustão do minério) das atividades de lavra e de tratamento químico de minério de urânio, nesta instalação nuclear (MARQUES, 2006).

As águas de surgência e de drenagens ácidas, provenientes das infiltrações e percolação pluvial do interior da UTM/INB, convergem para o CM Cava da Mina Osamu Utsumi, de onde são bombeadas para a estação de tratamento de efluentes (NASCIMENTO, 1998). Após receber hidróxido de cálcio para precipitação de metais e radionuclídeos, esse efluente é

lançado no reservatório das Antas. De acordo com Cipriani (2002), em 2001, o volume de água ácida tratado na UTM-INB e lançado no reservatório das Antas foi de 1.414.851 m³.

Atualmente, os trâmites legais para a remediação do local e descomissionamento da instalação estão em andamento, devendo o empreendedor cumprir as exigências estabelecidas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), através do Plano de Recuperação de Áreas Degradadas a ser apresentado pela UTM/INB, de acordo com termo de referência detalhado, redigido especificamente para este caso (IBAMA, ofício nº 099/2004 – DILIQ).

3.2 Interface entre ambientes de água doce "naturais" e lagos ácidos de mina

O entendimento de como os efeitos da radiação combinados em um contexto mais amplo em níveis ecológicos de organização biológica mais elevada (ex: dinâmica populacional, interações tróficas, os efeitos indiretos no nível da comunidade e as consequências para o funcionamento do ecossistema) é um desafio para os próximos 20 anos proposto pela STAR Radioecology e assim, determinar as consequências ecológicas sob condições de exposição a radiações realísticas. Dados ainda são insuficientes para levar em conta os efeitos de baixas taxas de dose, regime de taxa variável, cenários multi-contaminantes, variação das espécies em respostas à sensibilidade à radiação, características ou efeitos em nível de ecossistema (STAR Radioecology, 2012).

Kapusttka et al., (2004), revisaram o papel dos metais sobre os efeitos ecológicos nos organismos de diferentes nichos. Para os chamados "micróbios", foi relatado o aumento de tolerância a metais da comunidade bacteriana, que poderia ser devido ou a adquirir tolerância por adaptação, tolerância alterada geneticamente ou ainda a substituição da composição de espécies na qual os organismos já se tornariam tolerantes mais competitivos e, assim, mais numerosos.

O estudo de ambientes que se localizam na interface de regiões de extração de minério e/ou recebem rejeitos/efluentes de tais atividades extrativistas são de suma importância para o entendimento das alterações nos ecossistemas interconectados, como é o caso do reservatório das Antas e Bortolan, localizados na região onde houve a extração de minérios da primeira mina de urânio do Brasil.

O impacto da mineração sobre o meio ambiente varia muito, dependendo dos métodos utilizados para explorar, do tipo de depósito mineral, do tipo e extensão dos recursos minerais se houve o adequado controle da poluição, da gestão dos resíduos gerados e da recuperação que deveria ser realizada após o fim das atividades (LUÍS et al., 2011).

3.3 Ecologia de lagos de mina ácidos ("Acid Pit Mine Lakes")

Lagos de mina ácido (LMA) têm se formado em todo o mundo, resultando em inúmeros problemas de qualidade da água que limitam severamente a utilização deste recurso e podem constituir um risco ambiental não só no corpo de água em si, mas também para os ambientes a jusante e nos recursos hídricos (NIXDORF; UHLMANN; LESSMAN, 2010). Tais lagos de mina ácidos se originam de atividades de mineração a céu aberto, sendo elas minas de lignina (WEITHOFF et al., 2010), minas de carvão (BALVERT et al., 2009; MOSER; WEISSE, 2011), minas de ouro e cobre (EARY, 1998) e minas de urânio (BABOROWSKI; BOZAU, 2006; ELBAZ-POULICHET et al., 1999; GAMMONS et al., 2003); dentre outras matérias primas que necessitam de atividades de mineração para sua obtenção. São habitats muito específicos, os quais são frequentemente caracterizados pelas condições químicas extremas. O processo chave é a desagregação da pirita, entre outros componentes do solo, resultando na geração de elevadas quantidades de ácido (FRIESE et al., 1998). Além do pH baixo, elevadas concentrações de sulfato, alumínio, ferro e outros elementos químicos nos quais são, muitas ordens de magnitude, mais altos do que em um típico circuito de lagos naturais.

Em tais ambientes extremos, somente um limitado número de espécies é capaz de sobreviver e, consequentemente, a baixa diversidade de organismos do plâncton é verificada (KAMJUNKE, et al., 2004; WOLLMAN et al., 2000). A comunidade planctônica consiste, tipicamente, de bactérias heterotróficas, flagelados mixotróficos, um limitado número de algas (BEULKER et al., 2003; LESSMAN et al., 2000; NIXDORF et al., 1998) e muito poucos protistas heterotróficos e espécies de rotíferas (DENEKE, 2000; PACKROFF, 2000). Apesar da força dos fatores químicos extremos, outros fatores ambientais (ex: morfologia do lago e turbulência, etc.) e biológicos (ex: competição e predação) podem moldar a estrutura da comunidade planctônica em lagos de mina ácido.

Em ambientes (LMA), por exemplo, bactérias competem com os osmo-mixotrófos *Chlamydomonas acidophila* (TITTEL et al., 2005) por carbono orgânico dissolvido (COD)

(Kamjunke et al., 2008) e bactérias são consumidas por organismos fago-mixotróficos *Ochromonas* sp. (SCHMIDTKE et al., 2006). Segundo Weithoff (2004), em lagos de mina de baixa produtividade (ex: Lago 111, Alemanha) consumidores como os rotíferos possuem recursos limitados, devido à baixa disponibilidade de nutrientes e elevada competitividade. Estas interações bióticas, bem como as forças físicas, tais como ressuspensão de material do sedimento e transporte da biota do bentos para a região pelágica do lago, são processos importantes na estrutura da comunidade planctônica, tanto em lagos naturais e represas quanto em lagos de mina ácidos.

Existem medidas que vêm sendo testadas para a remediação destes lagos manejados a princípio, por três diferentes medidas para alcançarem condições de qualidade da água neutras necessárias para recreação ou pesca: diluição através de inundação externa com água alcalina, tratamento químico (principalmente neutralização por calcário) ou medidas biológicas para elevar a geração de alcalinidade no lago.

Estes tratamentos biológicos são, em geral, identificados como medidas ecotecnológicas, tais processos naturais implicariam em uma aplicação em grande escala (auto-purificação, regulação, regeneração e mudanças tróficas) para melhorar a qualidade do ecossistema em águas correntes e paradas de LMA. A atividade específica dos organismos, variando de bactérias a macrófitas aquáticas seria manejadas para a melhorar auto-purificação do LMA (UHLMANN, 1988, UHLMANN; HORN 2001).

Por outro lado, a alcalinidade interna poderia ser alcançada por processos que ocorrem naturalmente, mediados microbianamente, baseados na geração de alcalinidade dirigidos pelo carbono orgânico (ex: produção primária e processos de decomposição associados à redução do nitrato, do Fe (III) e do sulfato, sob condições anaeróbias). Estes processos teriam o potencial de melhorar a acidez da coluna d'água, após a desgaseificação dos produtos da reação ou a precipitação de sulfatos de ferro. Tal processo mostrou-se como o principal fator limitante para a geração da alcalinidade, devido à disponibilidade de carbono orgânico lábil nestes ambientes (BLODAU, 2006; FRÖMMICHEN et al., 2003, 2004; WENDT-PATTHOF et al., 2002).

A produção primária é tipicamente uma das principais fontes internas de carbono orgânico em lagos. Por um lado, elevados níveis de produtividade primária têm sido noticiados sob elevadas condições de acidez e de eutrofização, sugerindo que a acidez em si não seja, em alguns casos, o principal fator limitante na produção de matéria orgânica nos

LMA (BLOUIN, 1989, NIXDORF; KAPFER, 1998). Por outro lado, a produtividade primária é limitada em muitos lagos ácidos pela disponibilidade de carbono inorgânico e fósforo, podendo ser elevada pela eutrofização artificial, tal como com o uso de fertilizantes (FYSON et al., 2002; UHLMANN; NIXDORF, 2002).

3.4 Ecologia microbiana e ambientes aquáticos extremos

Ecossistemas microbianos pelágicos são caracterizados por um complexo conjunto de interações dinâmicas entre os organismos. Competição por nutrientes e luz, comensalismo entre bactérias autotróficas e heterotróficas, ciclagem de nutrientes, lise celular e predação são processos típicos implicados nas interações ecológicas entre vírus, bactérias, micro-algas e os predadores deles (flagelados, ciliados e microzooplâncton). Controles do tipo top-down (grazing), bottom-up (disponibilidade de nutrientes, quantidade de presa) e lise viral são, primeiramente, responsáveis pela estrutura da população microbiana e diversidade, operando mais simultaneamente do que separadamente (COMTE et al., 2006).

Desde a postulação do conceito de elo microbiano (AZAM et al., 1983), as interações da rede trófica dentro do plâncton de lagos e oceanos têm recebido maior atenção, nos anos seguintes. Como principais consumidores da produção bacteriana, a produtividade dos protozoários possui um papel importante dentro da rede trófica planctônica. Eles são um componente essencial da rede trófica microbiana, sendo os principais na degradação de matéria orgânica em ecossistemas aquáticos. Em adição, várias espécies de ciliados e flagelados são capazes de consumir algas e outros protozoários e podem atuar em funções similares na rede trófica como os metazoários (ARNDT et al., 2000; SHERR; SHERR, 1994).

Além dos ambientes aquáticos convencionais, outros extremos são também importantes e deverão trazer novas perspectivas para o entendimento das redes tróficas microbianas que habitam ambientes extremos. Organismos extremófilos, capazes de prosperar sob condições extremas, têm recebido grande atenção devido à importância na indústria e aplicações ambientais, nas quais incluem processos para a extração natural de metais que ocorrem em minas e rejeitos radioativos, dessulfurização microbiana de carvão e processos de biorremediação. Outro fator a ser considerado seria a concentração de prótons (H^+) são um importante fator fisiológico; era sabido que, em geral, micro-organismos não poderiam prosperar em valores de pH, altamente básicos ou altamente ácidos. Nestas condições, os

componentes das células microbianas ficariam expostos e poderiam ser hidrolisados ou as proteínas desnaturadas. Além disso, a dissociação e solubilidade de muitas moléculas que direta ou indiretamente afetam os micro-organismos também seriam fortemente influenciadas por valores de pH extremos. Por exemplo, íons metais, que são tóxicos em elevadas concentrações, são muito mais solúveis em pH ácidos, gerando assim estresses fisiológicos adicionais aos organismos (LÓPEZ-ARCHILLA; AMILS, 2001). Por outro lado, sabe-se que há micro-organismos que prosperam efetivamente em ambientes com extremos de pH como os acidofílicos e os halofílicos presentes em ambientes aquáticos como o Rio Tinto (Espanha) (GONZÁLEZ-TORIL et al., 2003) e os lagos ácidos de mina situados na região da Lusatia (Alemanha) (NIXDORF; UHLMANN; LESSMAN, 2010).

A composição da flora planctônica, nos ambientes aquáticos, varia de acordo com as características da água. Fatores como a concentração em sais inorgânicos e substâncias orgânicas, as fontes poluidoras, a intensidade luminosa, concentrações de íons no meio, o grau de trofia e a temperatura têm uma grande influência nessa composição (PINHEIRO, 1998).

Segundo Sherr e Sherr (1988) há muitas interações tróficas dentro da rede alimentar microbiana. Desta maneira, o elo microbiano não pode ser considerado separadamente do resto da cadeia alimentar microbiana. Ao invés disso, os heterótrofos podem ser vistos como responsáveis pela remineralização de parcelas de carbono fixado (células bacterianas e algais) e pela recuperação de carbono fixado (matéria orgânica particulada e dissolvida). Por outro lado, o carbono fixado pelas células bacterianas e algais pode ser transferido para os níveis tróficos superiores. Tais vias de remineralização também incluem retenção de bactérias pelas algas mixotróficas e ingestão de pequenos micro-organismos contendo cloroplastos pelos protozoários, sendo estes últimos tanto utilizados como fonte de alimento para o zooplâncton quanto competindo pelas mesmas fontes de alimento.

Dentre os componentes do plâncton, a avaliação da comunidade bacterioplanctônica é necessária tanto para ambientes aquáticos naturais quanto ambientes extremos como os lagos de mina ácidos. A avaliação precisa da densidade bacteriana é necessária quando se pretende: (i) determinar a qualidade microbiológica de uma água (ii) estimar a eficácia de uma descontaminação e (iii) avaliar o papel desempenhado pelas bactérias nos diferentes

ecossistemas. Para este efeito, utilizam-se, basicamente, dois tipos de métodos: indiretos e diretos (BARLAG, 1992¹ apud POIGNANT, 1992).

Os métodos indiretos são baseados na contagem do número de unidades formadoras de colônias, enquanto que os métodos diretos consistem na contagem direta do número total de bactérias, através de microscopia de epifluorescência (¹BARLAG, 1992 apud POIGNANT, 1992)

Além dos métodos convencionais, pode-se utilizar nas últimas décadas a biologia molecular como ferramenta para a identificação filogenética de grupos bacterianos sem que seja necessário seu cultivo e isolamento. Entre o conjunto de métodos moleculares aplicados em estudos ambientais, a técnica independente de cultivo Hibridização Fluorescente "in situ" é amplamente utilizada. Segundo Hahn et al. (1993), a caracterização e identificação de células baseadas em métodos de cultivo vêm sendo combinados com métodos moleculares. Os métodos baseados em biologia molecular surgiram para solucionar problemas no estudo de bactérias em amostras ambientais uma vez que, pelo uso de meios de cultura, poderia ocorrer a seleção de micro-organismos em detrimento de outros (AMANN et al., 1995). Além disso, a simples morfologia da maioria dos micro-organismos fornecia poucas informações para sua identificação, conduzindo a interpretações errôneas sobre suas características fisiológicas (HAHN et al., 1993).

O FISH consiste na hibridização de uma sequência alvo específica do RNAr 16S presente em células íntegras, com o uso de uma sonda marcada por fluorescência. Devido à preservação das células bacterianas, a técnica "FISH" permite que estas sejam visualizadas e quantificadas em seus ambientes naturais, sem necessidade de cultivo (AMANN, 1995).

Segundo Abe et al. (2004), o uso de sondas de DNA específicas ao RNA ribossômico (RNAr) de grupos taxonômicos intermediários do bacterioplâncton tem se provado um eficiente método capaz de distinguir comunidades distintas de bactérias em sistemas naturais. Dentro do Programa "Biodiversidade Zooplânctônica e o Estado de Degradação dos Ecossistemas Aquáticos Continentais do Estado de São Paulo", foi realizado um estudo comparativo das comunidades bacterianas em diferentes corpos de água da UGRHI Tietê/Jacaré pela técnica de hibridização fluorescente "in situ" (FISH), utilizando-se sondas

¹ BARLAG, W.; SCHUT, T. C.; KRAAN, Y. M.; LEIJ, L.; GROOTH, B. G.; GREVE, J. Electrofusion of conjugated cells in flow. **Biophysical Journal**, v. 65, p. 568-572, 1992.

de DNA específicas ao RNAr ribossômico dos seguintes subgrupos: Subclasse Alfa, Beta, Gama da Classe Proteobacteria, grupo Cytophaga/Flavobacterium, Ordem Planctomycetales e Domínio Archaea. A proporção entre os diferentes grupos analisados variou em função dos diferentes habitats observados, como volume de água e graus de trofia. Porém, em todos os corpos de água, as células pertencentes à Subclasse Alfa Proteobacteria foram as dominantes, seguidas da Subclasse Beta Proteobacteria e do grupo Cytophaga/Flavobacterium.

Um importante micro-organismo de drenagens ácidas de mina e meio ambientes biolixiviados é o *Acidithiobacillus ferrooxidans*, o qual oxida ferro gerando íon férrico, na oxidação. No estudo de Mahmoud et al. (2004) uma sonda de oligonucleotídeos de RNAr 16S foi desenhada e marcada no final 5' com o corante fluorescente indocarbocianina (Cy3) e utilizada para a realização da técnica FISH. As sondas foram utilizadas para identificar *A. ferrooxidans* em culturas puras e em drenagens ácidas.

Nicomrat et al. (2001), utilizaram a técnica FISH para estimar a abundância de grupos de bactérias que oxidam ferro e sulfato, utilizando a sonda TF539 sendo confirmada a presença deste thiobacillo acidófilo nas amostras. Os *A. ferrooxidans* contribuíram quase 40% do total da população microbiana. A abundância de *A. ferrooxidans* foi estimada de 38 para 42% numa faixa de pH de 3,0 para 3,6 e de 22% para 28% para pHs de 2,0 a 2,6. A análise de hibridização fluorescente "in situ" em comunidades microbianas, usando a sonda de oligonucleotídeos (EUB338) com domínio-específico para *Bacteria*, indicou que a maioria destas bactérias ocorre, também, em sedimentos ácidos de mina.

Além da sonda EUB338, específica para o grande Domínio Bactéria, a sonda ARCH915 específica para o grande Domínio Archaea também é utilizada em estudos ambientais. As arqueas são, primariamente, consideradas como extremistas, dominando habitats que definem limites físicos para sistemas biológicos, tais como calor geotermal, acidez extrema, fendas hidrotermais no assoalho marinho, tanques hipersalinos ou ambientes estritamente anóxicos, porém tais micro-organismos foram detectados em muitos ambientes moderados (SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005).

Muitos grupos de arqueas parecem estar confinados a localizações geográficas específicas ou a ecossistemas que tenham geoquímica similar, porém outros grupos parecem ser amplamente distribuídos. Por exemplo, duas linhagens de crenarqueias, nas quais são principalmente, definidas em sequências do plâncton marinho e solos, também foram

encontrados em amostras de água doce (OCHSENREITER et al., 2003; SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005; TAKAI et al., 2001). Além disso, há indícios de que arqueas metanogênicas formem agregados específicos com seu parceiro sintrófico, as bactérias redutoras de sulfato. Estas também habitam o lago de mina ácido CM em Caldas, M.G. (BENEDETTO et al., 2005).

Avanços recentes em estudos ambientais têm proporcionado as ferramentas técnicas necessárias para caracterizar esses micro-organismos extremófilos na ausência de cultivo em laboratório e no contexto de comunidades microbianas indígenas, ou seja, diretamente amostrado de seu próprio habitat. Por exemplo, as archaeas (Crenarchaeote) do plâncton marinho são encontradas associadas a uma esponja marinha Crenarchaeotas já foram registradas anexadas às raízes de plantas e Euryarchaeota em sedimentos, bem como em águas de pântanos sulfurosos enriquecidas em redes de polietileno; todas avaliadas e visualizadas utilizando-se a hibridização fluorescente "in situ", o que possibilitou visualizar a morfologia distinta de tais grupos e um elevado conteúdo de RNAr ribossomal, tal como esperado para as células vivas (SCHLEPER; JURGENS; JONUSCHEIT, 2005).

A diversidade bacteriana das Archeas também foi investigada em sedimentos contaminados por minério de urânio. Seqüências do gene RNAr ribossomal 16S de Archaeas foram representadas pelas Methanobacterias (Euryarchaeota); que foram predominantes nestes sedimentos (SUZUKI et al., 2005). Archaeas (*Methanobacterium subterraneum*) produtoras de metano também foram isoladas em águas presentes em rochas graníticas subterrâneas profundas pelo laboratório de Äspö localizado nas proximidades de Simpevarp, numa usina nuclear ao norte de Oskarshamm, Sudeste da Suécia (KOTELNIKOVA et al., 1998). Somente alguns estudos adicionais têm investigado a diversidade de archaeas em ambientes contaminados por elementos químicos (STEIN et al., 2002; TAKAI et al., 2001). Nos últimos anos, foi demonstrado que as crenarchaeotas hipertermofílicas *Pyrobaculum islandicum* são capazes de reduzir U (VI) à U (IV) à 100 °C (GEIBLER, 2007; KASHEFI; LOVLEY, 2000).

Inúmeros estudos foram realizados, a fim de elevar o número e a atividade dos micro-organismos indígenas destes ambientes, para seu uso num potencial processo de biorremediação pela adição de nutrientes em águas subterrâneas e solos contaminados por urânio (ANDERSON et al., 2003; BRODIE et al., 2006; HOLMES et al., 2002; NEVIN et al., 2003; NORTH et al., 2004; NYMAN et al., 2006; SUZUKI et al., 2003). Alterações na comunidade

microbiana foram observadas, quando o U (VI) foi reduzido, estimulado pela adição de acetato, em sedimentos de três locais contaminados por urânio, em planícies de inundação, na região do rio San Juan, em Shiprock, Novo México, EUA. O tratamento resultou num enriquecimento dramático dos micro-organismos da família Geobacteraceae, que são conhecidos como micro-organismos redutores de U (VI) e Fe (III) (GEIBLER, 2007; HOLMES et al., 2002).

Sendo assim, a técnica independente de cultivo FISH foi escolhida, neste estudo, por ser apreciada como alternativa versátil para a análise da composição de comunidades bacterianas de ambientes naturais e extremos, uma ferramenta de baixo custo e que ainda possibilita a quantificação e visualização das células bacterianas por métodos de microscopia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

No presente estudo, coletas trimestrais de amostras de água foram realizadas nos meses de outubro de 2008, janeiro, abril e julho de 2009, nos reservatórios das Antas e Bortolan (Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas) e no CM Cava da Mina Osamu Utsumi (Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil - UTM/INB).

As amostragens realizadas nos corpos de água, citados acima, foram divididas em amostragens feitas longitudinalmente: ponto de superfície da Cava da Mina (CM), dos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S) bem como ao longo de um perfil vertical em diferentes profundidades da coluna de água, nos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14-F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F).

Para todas as campanhas foram registrados dados meteorológicos da região e realizadas análises para as variáveis físicas e químicas: temperatura da água, oxigênio dissolvido, transparência da água, pH, condutividade elétrica da água, potencial de óxido-redução, concentração de material em suspensão, concentração de clorofila *a*, concentrações de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID), concentração de nutrientes, dureza, sulfato, fluoreto, molibdênio, manganês, zinco, urânio, tório, ferro total, alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e

chumbo, índice de estado trófico e variáveis biológicas: comunidade protozooplanctônica, estimativa de biomassa fitoplanctônica, comunidade bacterioplanctônica (estimativa de densidade e implantação da metodologia independente de cultivo Hibridização Fluorescente "*in situ*" - FISH), bem como a aplicação de índices de frequência de ocorrência, de diversidade e de saprobidade utilizando-se, como parâmetro, a comunidade protozooplanctônica.

As amostras de água, para a realização das análises supracitadas, foram coletadas com garrafa de Van Dorn, nos diferentes pontos de amostragem. Para os pontos CM, Cab, P41, P14S, RB-S, a amostragem foi realizada a 0,5 m de profundidade da superfície da água. Já nos pontos de coleta do "meio" da coluna d'água, ou seja, P14M e RB-M, a profundidade da coleta foi estimada de acordo com o valor do coeficiente de extinção de luz, obtido por disco de Secchi. Para os pontos de "fundo" da coluna d'água, ou seja, P14F e RB-F, a amostragem foi realizada 0,5 m acima do sedimento do reservatório. As profundidades máximas, determinadas em cada ponto de coleta, durante o presente estudo foram as seguintes: CM = 20,0 m, CAB: = 1,5 m, P41 = 1,0 m, P14 = 6,5 m e RB = 7,0 m e. Na Figura 1 e nas Tabelas 1a e 1b está apresentada a localização geográfica dos corpos de água e dos pontos de amostragem, bem como os dados morfométricos e hidrológicos.

Os valores das variáveis químicas das amostras de água provenientes dos reservatórios RA e RB foram comparados com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005) e da Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG n.º 1 (BRASIL, 2008). De acordo com o Plano Nacional de Recursos Hídricos (BRASIL, 2006), os corpos de água, localizados na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, são considerados como de Classe II, frente à Resolução 357 do Conama (2005) e da COPAM/CERH-MG n.º1 (2008). Valores de tório e urânio, em amostras de água do Reservatório das Antas (P41 e P14), foram comparados aos limites previstos pelo Ofício nº 50/SLC de junho de 1997 da Comissão de Energia Nuclear (BRASIL, 1997).

Figura 1 - Mapa da região do Planalto de Poços de Caldas – MG englobando os reservatórios das Antas e Bortolan e a Instalação Nuclear da UTM/INB (Caldas-MG).

Fonte: Imagem Heber Luiz Caponi Alberti e Élis de Oliveira Lima. CNEN/LAPOC (Não publicado)

Tabela 1a - Localização geográfica (*GPS 12CX Garmim - Europe) dos pontos de coleta nos reservatórios das Antas e Bortolan e na UTM/INB, no ponto cava da mina, amostrados no presente estudo.

Corpos de água	Pontos de amostragem	Legenda	Coordenadas*	
			S	W
	Cabeceira	CAB	21° 58' 23,5"	46° 30' 42,8"
Reservatório das Antas	Ponto que recebe efluente da UTM	P41	21° 58' 3,8"	46° 30' 47,3"
	Região Limnética Superfície	P14S		
	Região Limnética Meio	P14M	21° 57' 42,3"	46° 31' 44,8"
	Região Limnética Fundo	P14F		
Reservatório Bortolan	Região Limnética Superfície	RB-S		
	Região Limnética Meio	RB-M	21° 46' 57,4"	46° 38' 2,4"
	Região Limnética Fundo	RB-F		
Cava da Mina	Local do Efluente " <i>in natura</i> "	CM	21° 56' 46,0"	46° 30' 06,7"
Lagos CNEN	LAPOC/CNEN-Poços de Caldas	Lagos Cnen	21° 03' 37,007	46° 75' 77,698

Tabela 1b - Características morfométricas e hidrológicas dos pontos de coleta nos reservatórios das Antas e Bortolan e na UTM/INB, no ponto cava da mina, amostrados no presente estudo.

	Reservatório das Antas	Reservatório Bortolan	Cava da Mina
Data de represamento	*1982	**1956	*1982
Área de drenagem (Km ²)	*51 Km ²	**3.054 Km ²	-
Vazão (m ³ .s ⁻¹)	*9,515 m ³ .s ⁻¹	**3,6 m ³ .s ⁻¹	-
Tempo de residência (dias)	***5 dias	****22 dias	-
Volume (10 ⁶ . m ³)	*3,9 x 10 ⁶ m ³	**6,9 x 10 ⁶ m ³	****volume médio anual 5 x 10 ⁵ . m ³
Comprimento máximo (m)	*3.500 m	**8.634 m	-
Largura média (m)	* 250 m	-	****1.200 m
Largura máxima (m)	-	**676 m	-
Profundidade máxima (m)	8 m	**11,5 m	****176 m da cratera
Profundidade mínima (m)	0,5 m	**2,5 m	-

* Fonte: Indústrias Nucleares do Brasil - INB (1999).

** Fonte: Comunicação Pessoal (SOUZA, C. de. - Departamento Municipal de Eletricidade de Poços de Caldas).

*** Ronqui (2008); **** Ronqui (2013).

**** FAGUNDES et al. (2008).

4.1.1 Amostragem no perfil longitudinal

Os pontos de coleta amostrados no perfil longitudinal foram: CM, Cab, P41, P14S e RB-S. Para os pontos CM, Cab, P41, P14S, RB-S, as amostragens foram realizadas a 0,5 m de profundidade da superfície da água.

Na UTM/INB, foram coletadas amostras de água no lago ácido de mina Cava da Mina, no ponto denominado CM, que é um compartimento a céu aberto, para o armazenamento do efluente radioativo não tratado. No reservatório das Antas (RA): Cab (ponto localizado na cabeceira do reservatório e a montante do ponto de lançamento dos efluentes tratados pela UTM/INB), P41 (região que recebe os efluentes tratados procedentes da CM, UTM/INB) e P14S (ponto 14 superfície) localizado a jusante do ponto P41.

Nesta trajetória longitudinal, na qual os pontos de superfície estão localizados pode-se avaliar as concentrações dos elementos químicos e biota presentes no ponto CM, ou seja, antes do tratamento químico do efluente, bem como depois de tratado e liberado no ponto P41 do RA além disso, as concentrações dos elementos químicos e biota foram avaliadas em reservatório a jusante do RA, ou seja, no RB. O ponto Cab foi designado como o ponto controle neste estudo.

4.1.2 Amostragem no perfil vertical

Os pontos de coleta referentes ao perfil vertical foram: P14S, P14M, P14F, RB-S, RB-M e RB-F. Para os pontos P14S e RB-S, as amostragens foram realizadas a 0,5 m de profundidade da superfície da água. Já nos pontos de coleta do "meio" da coluna d'água, ou seja, P14M e RB-M, a profundidade da coleta foi estimada de acordo com o valor do coeficiente de extinção de luz, obtido por disco de Secchi no momento da coleta. Para os pontos de "fundo" da coluna d'água, ou seja, P14F e RB-F, a amostragem foi realizada 0,5 m acima do sedimento de cada reservatório avaliado.

No reservatório das Antas (RA) os pontos de amostragem P14S (ponto 14 superfície), P14M (ponto 14 meio da coluna de água) e P14F (ponto 14 fundo da coluna de água), estiveram todos localizados a jusante do ponto de lançamento de efluentes radioativos tratados da UTM/INB no RA (a jusante do ponto P41).

No RB, os pontos de coleta estiveram localizados em reservatório a jusante do reservatório das Antas, ou seja: ponto RB-S (reservatório Bortolan superfície), RB-M (preservatório Bortolan ponto localizado no meio da coluna de água) e RB-F (ponto localizado no fundo, amostrado a 0,5 m do sedimento).

Os pontos de amostragem verticais referem-se somente aos reservatórios das Antas e Bortolan, sendo regiões mais profundas e com características de lago, ou seja, lênticos, onde se pôde verificar a distribuição dos elementos químicos e das comunidades microbianas ao longo de um perfil vertical da coluna d'água.

4.1.3 Amostragem de água para Hibridização Fluorescente "in situ" (FISH)

As amostras de água para a implantação da metodologia do FISH para os corpos de água, avaliados neste estudo, foram coletadas na Cava da Mina Osamu Utsumi (CM) e nos reservatórios das Antas (pontos Cab, P41, P14S, P14M e P14F) e Bortolan (pontos RB-S, RB-M e RB-F). As coletas foram realizadas a 0,5 m de profundidade da superfície da água, desde outubro de 2008 até novembro de 2012.

Além das amostras coletadas nos ambientes acima citados, testes adicionais foram realizados com alíquotas de água procedentes dos lagos ornamentais, localizados nas dependências do LAPOC/CNEN, a fim de verificar como a metodologia empregada se comportaria em um ambiente com características físicas e químicas diferentes das verificadas nos reservatórios e no lago de mina ácido CM (ANEXO A). Tais lagos não possuía as características físicas e químicas extremas do ponto CM, bem como os que apresentaram maior grau de trofia e de densidade celular de bactérias quando comparados aos reservatórios das Antas e Bortolan.

Foram realizados testes para a técnica FISH, em culturas puras de *Escherichia coli* (ATCC25992 e ATCC11299), pertencentes a coleções do Laboratório de Radioecologia (LAPOC-CNEN), do cultivo e isolamento de bactérias heterotróficas procedentes de amostras do ponto CM, cultivadas em meio CPS (REGALI-SELEGHIM, 1992) e de bactérias isoladas (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) da CM.

Todas as amostras coletadas no campo foram acondicionadas em frascos âmbar de 1 L capacidade, previamente esterilizados. Após a coleta das amostras no campo, foram levadas

ao Laboratório de Radioecologia, sob refrigeração, para os passos seguintes de: fixação e armazenamento das amostras à -25 °C, até a realização da análise por hibridização fluorescente "*in situ*".

4.2 Dados meteorológicos

Os dados referentes ao índice pluviométrico, umidade relativa, temperatura do ar e velocidade do vento, para o período de julho de 2008 a julho de 2009, foram fornecidos pela Estação Meteorológica (Campell Scientific, Modelo CR10X, 815 W-1800N, São Paulo, S.P., Brasil) instalada nas dependências do Laboratório de Poços de Caldas da Comissão Nacional de Energia Nuclear (LAPOC/CNEN). A estação meteorológica coleta informações, diariamente, a cada intervalo de 30 minutos, iniciando as medições às 0 h e 30 min e encerrando às 0 h. Localiza-se, aproximadamente, a 14 km de distância da UTM/INB e do reservatório das Antas e a 20 km do reservatório Bortolan.

4.3 Parâmetros físicos e químicos

4.2.2 Temperatura da água, oxigênio dissolvido, transparência da água, potencial hidrogênico, condutividade elétrica da água e potencial de óxido-redução

No campo, as determinações de temperatura e oxigênio dissolvido da água foram medidas com sensor de temperatura (WTW – 320) e com eletrodo seletivo para oxigênio utilizando oxímetro (Marca WTM, modelo Oxi 315i, São Paulo, S.P., Brasil), respectivamente.

A transparência da água foi determinada pela leitura do valor da profundidade (m), através do desaparecimento e reaparecimento visual do disco de Secchi, abaixado, verticalmente, na coluna de água. A média da profundidade em que o disco desaparece e reaparece foi utilizada como a medida de transparência de água.

No laboratório, as determinações dos valores de potencial hidrogênico (pH) foram realizadas com o auxílio de um eletrodo seletivo de pH (Marca Analion, São Paulo, S.P., Brasil). Medidas dos valores de condutividade elétrica da água foram realizadas com condutivímetro (Marca Digimed, São Paulo, S.P., Brasil). Os valores de potencial de óxido-

redução foram determinados utilizando-se potenciômetro com eletrodo de Platina Digimed, modelo DM 21 (Digimed, São Paulo, S.P., Brasil).

4.2.3 Material em suspensão

Para as determinações da concentração de material em suspensão, foi utilizado o método gravimétrico descrito em Teixeira; Tundisi; Kutner (1965). Após a coleta, um volume conhecido de amostra foi filtrado, com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo, utilizando-se microfiltros de fibra de vidro em triplicata. Estes foram previamente calcinados em mufla a 450 °C, por 1/2 hora e pesados (P1).

Em seguida, os filtros foram secos em estufa por 24 horas a 60 °C, até atingirem peso constante, sendo transferidos para um dessecador (uma hora) e depois pesados em balança analítica da marca Gehaka modelo AG 200 (Gehaka, São Paulo, S.P., Brasil), determinando-se assim, o peso (P2). Para obtenção da concentração de material em suspensão, foi feita a diferença entre os pesos P2 e P1. Posteriormente, os filtros foram novamente calcinados em mufla a 450 °C por 1/2 hora, transferidos para o dessecador (1 hora) e pesados novamente, o que correspondeu ao peso das cinzas (P3). A diferença entre os pesos P2 e P3 representa a quantidade de matéria orgânica. A matéria inorgânica foi calculada pela diferença de material em suspensão total e matéria orgânica.

4.2.4 Clorofila *a*

As concentrações de clorofila *a* foram determinadas de acordo com metodologia descrita em Marker et al. (1980), utilizando-se etanol 90 % a quente como solvente para a extração. Posteriormente, as concentrações de clorofila *a* foram calculadas através das equações descritas por Lorenzen (1967).

As determinações de clorofila *a* foram realizadas utilizando-se microfiltros de fibra de vidro, procedendo-se filtrações em bomba de vácuo em réplicas para cada ponto de coleta, em cada mês de amostragem.

4.2.5 Carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID)

As análises de carbono total, carbono orgânico e inorgânico total, carbono dissolvido total e carbono orgânico e inorgânico dissolvidos foram realizadas com o auxílio do equipamento Shimadzu TOC-5000 A (Shimadzu, Alemanha), junto ao Departamento de Botânica (Universidade Federal de São Carlos). Seguiu-se a metodologia de coleta e leitura descrita em APHA (1995).

As determinações de carbono orgânico total foram feitas em um Analisador de Carbono TOC 5000A – Shimadzu, com catalisador de sensibilidade normal. Este equipamento mede a quantidade de CT e CI da amostra. O COT é dado pela subtração de CT e CI. Para a determinação de carbono total, a amostra injetada é carregada para um tubo de combustão a 680 °C, contendo platina suportada em alumina sofrendo oxidação catalítica a CO².

4.2.6 Nutrientes

Para as determinações das concentrações de nutrientes, amostras foram coletadas utilizando-se uma garrafa vertical, de cinco litros, do tipo Van Dorn para coleta na superfície, meio e fundo da coluna d'água com base nas seguintes metodologias: para nitrito e silicato a técnica descrita por Golterman, Clymo e Ohnstad (1978); para nitrato e nitrogênio total a metodologia descrita por Mackereth, Heron e Tailing (1978); para amônia o método descrito por Koroleff (1976); para fósforo total a técnica descrita por Valderrama (1981) e para fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico a metodologia descrita em Strickland; Parsons (1960).

4.2.7 Dureza, sulfato, fluoreto, molibdênio, manganês, zinco, urânio, tório, ferro total, alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo

A determinação dos valores de dureza (cálcio e magnésio) foi realizada por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente Varian - modelo Liberty RL Sequencial ICP-OES (Varian, EUA).

As análises de sulfato foram realizadas por Espectrofotometria UV-Visível, segundo a metodologia descrita em ASTM (1980).

A concentração de fluoreto foi determinada pelo método potenciométrico, com base na metodologia descrita em Nascimento et al. (1988).

Em relação a urânio, tório e metais totais, foram realizadas análises somente nos meses de janeiro, abril e julho de 2009 para a CM e janeiro e julho de 2009 para os reservatórios. Para o elemento químico urânio, alíquotas das amostras na concentração de 2,5 a 12,5 mg.L⁻¹ que se referem ao intervalo da curva padrão foram tratadas por extração, utilizando-se solvente tributilfosfato como reagente, submetidas a uma reação com solução do reagente colorimétrico de Arsenazo III e medida no comprimento de onda de 650 nm em espectrofotômetro UV-Visível. A determinação das concentrações do elemento tório (Espectrofotometria UV-Visível), alíquotas da amostra na concentração de 1,6 a 8,0 mg.L⁻¹ que se refere ao intervalo da curva padrão, foram tratadas por extração, utilizando-se solvente topotriocilfosfina, submetidas a uma reação com solução do reagente colorimétrico de Arsenazo III em seguida, foram medidas no comprimento de onda de 665 nm em espectrofotômetro UV-Visível (FUKUMA et al., 2001).

Para a determinação dos metais totais (Pb, Cd, Co, Cr, Cu, Mn e Zn) Ferro e Molibdênio, amostras foram armazenadas em garrafas de poliestireno e fixadas com ácido nítrico ultrapuro a uma concentração final de 0,2 M. A digestão das amostras foi realizada de acordo com metodologia descrita em APHA (1992), e a determinação das concentrações foram efetuadas em espectrofotômetro de absorção atômica.

4.3 Índice de estado trófico

O índice de estado trófico foi calculado como proposto por Toledo et al. (1983), que modificaram o índice de Carlson (1977), elaborando um modelo mais simplificado e adaptado às condições climáticas das regiões tropicais e subtropicais. As relações propostas por Toledo et al. (1983) baseiam-se, fundamentalmente, em valores ponderados das concentrações de fósforo total (P), de fosfato inorgânico (PO₄) e clorofila *a* (Cl *a*).

$$a) \text{ IET (P)} = 10 \times \{6 - [\ln(80,32 / P) / \ln 2]\}$$

$$b) \text{ IET (PO}_4\text{)} = 10 \times \{6 - [\ln(21,64 / \text{PO}_4) / \ln 2]\}$$

$$c) \text{ IET (Cl } \alpha\text{)} = 10 \times \{6 - [(2,04 - 0,695 \ln \text{Cl}) / \ln 2]\}$$

onde: P = concentração de fósforo total ($\mu\text{g L}^{-1}$); PO_4 = concentração de fosfato inorgânico ($\mu\text{g L}^{-1}$); Cl = concentração de clorofila α ($\mu\text{g L}^{-1}$); IET (médio) = média ponderada entre as três variáveis utilizadas.

$$e) \text{ IET Média Ponderada} = \text{IET (P)} + 2 \times (\text{IET (PO}_4\text{)} + \text{IET (Cl)}) / 7 \quad (2)$$

A partir dos valores obtidos para o IET médio, os critérios de classificação trófica são:

Oligotrófico, se $\text{IET} \leq 44$

Mesotrófico, se $44 < \text{IET} < 54$

Eutrófico, se $\text{IET} \geq 54$

4.4 Parâmetros biológicos

4.4.1 Coleta e preparo de amostras para a quantificação e identificação de protozoários

Para as análises de densidade e biomassa dos protozoários planctônicos foram coletadas amostras de água em frascos de vidro (250 mL) com trélicas em cada ponto de amostragem (Cab, P41, P14S, P14M, P14F, RBS, RBM, RBF e CM). As amostras foram fixadas no campo com 4,3 mL de solução saturada de cloreto de mercúrio e coradas com 4 gotas de azul de bromofenol (0,04 %) (PACE; ORCUTT, 1981). No laboratório, cada amostra foi deixada em repouso para a sedimentação dos protozoários, de acordo com o recomendado por Margalef (1969). Após o período de sedimentação, o sobrenadante foi descartado dos frascos, através de sifonamento com tubo de látex e a água, imediatamente acima do precipitado, foi retirada com uma pipeta automática, evitando-se a ressuspensão e agitação da amostra na interface ar-água. O volume restante foi homogeneizado, para a contagem dos protozoários em câmaras de Sedgwick-Rafter. De cada amostra coletada, foram preparadas e analisadas 3 câmaras (contendo 1 mL cada) de Sedgwick-Rafter, totalizando a análise do conteúdo de 9 câmaras de Sedgwick-Rafter para cada ponto de amostragem.

O tempo de sedimentação foi calculado através da fórmula abaixo (MARGALEF, 1969).

$$T = 3 \times H \quad (3)$$

onde: T= tempo (horas); H= altura do frasco (cm).

4.4.2 Identificação dos protozoários planctônicos e estimativa da densidade, do biovolume e da biomassa

Os protozoários foram quantificados e identificados. Para auxiliar na taxonomia, estes foram observados "a fresco", em aumento de 125X, provenientes de amostras de água filtradas em redes de plâncton de 10 µm de póro. Alíquotas (1 mL) foram analisadas sob microscópio ótico (Ortoplan - LEITZ, Alemanha) anotando-se o tipo de movimento, a presença de vacúolo alimentar, a presença de vacúolos contrácteis e outras estruturas celulares. As principais fontes de literatura utilizadas para a identificação dos protozoários planctônicos foram: Edmondson (1959); Foissner e Berger (1996); Lee et al. (1985), Minchin (2003); Mikrjukov e Patterson (2001); Page (1976); Pennak (1953); Regali-Selegim et al. (2011). Os protozoários planctônicos também foram classificados de acordo com sua preferência nutricional, ou seja, tipo nutricional de acordo com Foissner e Berger (1996).

A partir de amostras de água procedentes de cada ponto de coleta, bem como de cada mês de coleta avaliado ao longo deste estudo, foram realizadas medidas lineares de aproximadamente 20 indivíduos para cada grupo morfológico. A estimativa do volume de cada célula foi feita utilizando-se fórmulas matemáticas que representassem as formas geométricas mais próximas à morfologia dos organismos, segundo Regali-Selegim (1992) e Sun e Liu (2003). Para a estimativa de biomassa protozooplanctônica, inicialmente os valores de volume de cada protozoário foram multiplicados pelo fator de conversão para carbono, estimado por Putt e Stoecker (1989) para ciliados e heliozoários e Gilbert et al. (1998) para sarcodinas, gerando o valor de biomassa celular. Em seguida, a biomassa celular de cada protozoário foi multiplicada pelo valor de sua densidade. Utilizando-se a fórmula fornecida por Sorokin e Kadota (1972), chegou-se à biomassa úmida total ($\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1}$), para cada amostra:

$$\mathbf{B=D \times b} \quad (4)$$

Onde: B= biomassa total ($\mu\text{g C} \cdot \text{L}^{-1}$), D= densidade (ind. L^{-1}) e b = biovolume.

4.4.3 Índice de frequência de ocorrência

A partir da frequência de ocorrência das espécies da comunidade protozooplânctônica, foram realizados os cálculos do Índice de Constância de Dájoz (LOBO; LEIGHTON, 1986), levando-se em consideração o número de amostras onde a espécie ocorreu, em relação ao número total das amostras coletadas (em porcentagem), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$F=100*Pa/P \quad (5)$$

Onde: Pa = número de amostras contendo a espécie; P = número total de amostragens realizadas e F= frequência de ocorrência.

Em seguida, as espécies foram classificadas em constantes, acessórias ou acidentais, de acordo com os seguintes critérios:

1. constantes - ocorrência em mais de 50 % das amostragens;
2. acessórias - ocorrência em mais de 25 % e menos de 50 % das amostragens;
3. acidentais ou raras - ocorrência em menos de 25 % das amostragens.

4.4.4 Índice de diversidade

Para a comparação da diversidade de espécies entre os reservatórios e os diferentes meses amostrados, foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') (ODUM, 1988), com base na seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Shannon-Wiener (H')} \quad H = \sum P_i \log P_i / i \quad (6)$$

Onde, P_i (probabilidade de importância de cada espécie) $P_i = n_i / N$

4.4.5 Índice de saprobidade

O índice de saprobidade (SIPB) utilizado foi o de Pantle; Buck (1955), descrito por Foissner; Berger (1996).

$$\text{SIPB} = \frac{\sum (\text{N} \times \text{SI})}{\sum \text{N}} \quad (7)$$

onde: N = valor de biomassa para cada táxon, SI = índice de saprobidade das espécies (a cada espécie é atribuído um valor específico, segundo LEE e SOLDADO apud FOISSNER, 1992) e SIPB = índice de saprobidade de Pantle e Buck (1955).

A partir do valor do SIPB, tem-se a seguinte classificação:

SIPB: 1,0 – 1,5 Limpos = oligosapróbico = qualidade da água Classe I; água apresentando coloração azul.

1,5 – 2,5 Moderadamente poluído = beta-mesosapróbico = qualidade da água Classe II; água apresentando coloração verde.

2,5 – 3,5 Muito Poluído = alfa-mesosapróbico = qualidade da água Classe III; água apresentando coloração amarela.

3,5 - $\geq$ 4,0 Pesadamente Poluído = polisapróbico = qualidade da água Classe IV; água apresentando coloração vermelha.

4.5 Estimativa de biomassa fitoplanctônica

Para a estimativa dos valores de biomassa fitoplanctônica os valores de clorofila *a* foram transformados em biomassa de carbono, utilizando-se o fator de conversão de 67, de acordo com Eaton et al. (1995).

4.6 Bactérias planctônicas

4.6.1 Coleta e preparo de amostras

Para a análise do bacterioplâncton, foram coletadas amostras (100 mL) em frascos esterilizados, fixados no campo com 5 mL de formaldeído (concentração de 38%), a uma concentração final da amostra de 1,8 % e mantidos em refrigerador ($\pm 8^\circ\text{C}$) (SHERR; SHERR, 1993), até o momento da análise, que levou de 2 a 3 meses. Alíquotas de 10 a 50 mL de cada amostra fixada com formaldeído foram coradas com solução aquosa do corante DAPI 4',6-Diamidino-2-fenilindol (concentração final $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) segundo Porter e Feig (1980). Após

15 minutos de contactação em tubo de ensaio, a amostra foi filtrada em membrana preta de policarbonato 0,22 μm de poro (Millipore) (HOBBIÉ et al., 1977). A membrana foi, em seguida, colocada sobre lâmina fina com a adição de óleo de imersão de baixa fluorescência (marca Zeiss, Alemanha), sem a adição de lamínula e analisada sob microscópio de epi-fluorescência em Microscópio Zeiss-Axioplan 2, filtro UV 450 - 490, FT 510, LP 520, lâmpada de mercúrio HBO 100 W e objetiva neofluar 100 X /1,30 (Zeiss, Alemanha).

4.6.2 Estimativa da densidade bacteriana

Foram contados 50 campos microscópicos, de modo que a área de cada um é de 625 mm^2 . A estimativa de densidade foi dada segundo a fórmula de acordo com Jones (1979) para o cálculo do número de bactérias/mL de amostra:

$$N = \frac{g \times A \times D}{a \times V} \quad (8)$$

Onde: N = nº de bactérias x mL^{-1} ; g = média do nº de bactérias/50campos; A = área de filtração; d = fator de diluição; a = área do campo e; V = volume filtrado. Os valores de densidade das bactérias dados em ind.mL serão convertidos em litros (ind.L^{-1}).

4.6.3 FISH - Hibridização Fluorescente "in situ"

O protocolo típico para o FISH inclui quatro etapas principais: a fixação e permeabilização da amostra, a hibridização, a etapa de lavagem para remoção de nucleotídeos não hibridizados e, por fim, a detecção das células hibridizadas por microscopia de epifluorescência. Sendo assim, os testes preliminares, correspondentes à primeira etapa (ANEXO A), foram realizados baseando-se, principalmente, nas seguintes literaturas: Amann, Krumholz e Stahl (1990); Amann (1995); Glockner et al. (1996) modificado por Araújo, (2001); Cottrell e Kirchman, (2003) e Nishio, (2010).

Na primeira etapa de testes, foram utilizadas as sondas de oligonucleotídeos EUB338 e ARCH915 (ANEXO A). Para a segunda etapa, as sondas da primeira etapa foram substituídas. Foi utilizado um mix de sondas EUB338, EUB338-II e EUB338-III, bem como ARCH915, além

do controle negativo NON338 (Fabricante: Eurofins MWG Operon, Belo Horizonte, MG) de acordo com Daims et al. (2001). As novas sondas foram marcadas com o corante fluorescente Cy3 (Indocarbocyanine, Filter Set 20 HE - Zeiss, comprimento de onda: excitação 549 nm e emissão 562 nm) de acordo com Glockner et al. (1999), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na 2ª etapa de testes e padronização da técnica FISH neste estudo.

Sonda	Marcador fluorescente	Grupo microbiano alvo e posição no RNAr	Seqüência (5' – 3')	Posição do sítio de marcação	Referências
EUB338	Cy3	Domínio <i>Bactéria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S(355-338)	Amann et al. (1990a)
EUB338-II	Cy3	Domínio <i>Bactéria</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S(355-338)	Bathe e Hausne (2006)
EUB338-III	Cy3	Domínio <i>Bactéria</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S(355-338)	Bathe e Hausne (2006)
ARCH915	Cy3	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S(915-935)	Amann et al. (1990b), Glöckner et al. (1999)
NON338	Cy3	-	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S(338-355)	Glöckner et al. (1999)

4.6.3.1 FISH - Testes Preliminares

4.6.3.1.1 Coleta e fixação das amostras

As etapas de fixação, preparo da amostra para hibridização e a hibridização estão demonstrados na Figura 2a.

As amostras de água foram coletadas no campo e armazenadas em frascos de vidro âmbar de capacidade de 1 L, previamente autoclavados. Foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA). Após à fixação, o volume de 10 a 30 mL de amostra foi filtrado através de membrana de policarbonato de 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro, rinsou-se água MilliQ esterilizada duas vezes sobre a amostra filtrada na membrana de 0,22 µm. As membranas foram, então, armazenadas em placas de petri acrescentando-se na placa 3 mL

de solução de PBS 1x e etanol (50 %). Estocou-se as membranas a -20 °C até o momento da hibridização.

4.6.3.1.2 Preparo da lâmina com a amostra para a hibridização

- Retirou-se a membrana de polycarbonato com a amostra fixada da refrigeração;
- Cortou-se a membrana ao meio com uma tesoura em 4 partes iguais;
- Colocaram-se dois pedaços da membrana, contendo a amostra sobre lamina de vidro previamente envolta por parafilme fosco;
- Acrescentou-se 16 µl em cada pedaço de membrana, contendo a amostra, de solução de hibridização, na concentração de formamida respectiva para cada sonda utilizada (EUB338 e ARCH915, variando de 0 a 30 % de concentração de FA) e adicionou-se a cada pedaço de membrana 3 µl da sonda 338EUB, em outro pedaço de membrana 3 µl da sonda ARCH915.

4.6.3.1.3 Hibridização

- Prepararam-se tubos Falcon (correspondente à quantidade de lâminas com amostra) de 50 mL para serem utilizados como Câmara de Hibridização:
- Colocou-se um pedaço de lenço de papel, no fundo do tubo, na posição horizontal, e saturou-se com 1 mL de Solução de Tampão de Hibridização específica para a sonda a ser utilizada (concentração de formamida correspondente para cada tipo de sonda utilizada);
- Aqueceu-se o tubo falcon com o papel embebido na solução de hibridização em banho-maria a 48 °C, com concentração de formamida correspondente;
- Colocou-se a lâmina já montada com a membrana contendo a amostra, a solução de hibridização e a sonda dentro do tubo falcon pré-aquecido (Câmara de Hibridização),
- Fechou-se a câmara e incubou-se em estufa por 1 h e 30 min a 46 °C.

Figura 2a - Esquema dos processos de fixação, preparo da amostra para hibridização e a hibridização em estufa.

Fonte: Ronqui, 2012.

4.6.3.1.4 Lavagem

As etapas de lavagem da amostra hibridizada, a coloração com Dapi e a montagem da lâmina para visualização em microscopia de epifluorescência estão demonstradas na Figura 2b.

Após a incubação em câmara de hibridização, adicionou-se 1 ml de Solução Tampão de lavagem (com a concentração de NaCl correspondente para a cada sonda, Tabela 3 - ANEXO A) em uma placa de petri de acrílico pequena (o nº de placas é correspondente ao número de pedaços de membrana contendo a amostra), pré-aquecido por 20 min a 48 °C em banho-maria,

- Colocaram-se os pedaços de membrana dentro das placas com a solução de lavagem pré-aquecida,
- Incubou-se novamente a 48 °C em estufa por 15 min,

- Retirou-se as membranas contendo a amostra do processo de lavagem, rinçou-se água MilliQ estéril, rapidamente, para retirada do excesso de solução.

4.6.3.1.5 Etapa de coloração com Dapi e montagem da lâmina para observação em microscopia de epifluorescência

- Deixou-se secar os pedaços de membrana, contendo a amostra por alguns minutos no escuro. Logo após, acrescentou-se 100 µl de corante DAPI (concentração de 2 µg.mL⁻¹) sobre a membrana que se encontrava novamente sobre lâmina de vidro coberta com parafilme.

- Tempo de coloração com o corante fluorescente Dapi foi de 5 minutos ao abrigo da luz;

- Após coloração com o DAPI, passou-se cada pedaço de membrana 3X em solução de Etanol 80 % (1 min);

- Deixou-se secar ao ar livre e ao abrigo da luz;

- Montou-se os pedaços de membrana sobre lâminas finas de vidro, adicionando-se 1 gota ou 10 µl de óleo de imersão, acomodou-se a membrana sobre a lâmina de vidro contendo o óleo,

- Adicionou-se uma gota bem pequena de óleo de imersão sobre o pedaço de membrana, contendo a amostra e cobriu-a com lamínula.

Figura 2b - Esquema dos processos de lavagem da amostra hibridizada, coloração com Dapi e montagem da lâmina para visualização em microscopia de epifluorescência.
Fonte: Ronqui, 2012.

A metodologia, detalhada acima para o FISH, foi modificada em algumas de suas etapas (fixação e hibridização da amostra), bem como introduzidas etapas adicionais (teste de funcionalidade das sondas, sonicação da amostra e permeabilização das células) visando ao refinamento da técnica para obtenção de resultados satisfatórios frente aos corpos de água avaliados no presente estudo.

Na segunda etapa de testes, foram realizadas análises utilizando-se as sondas EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III, ARCH915 e o controle negativo NON338, marcadas com o corante fluorescente Cy3.

4.6.4 FISH - 2ª Etapa de testes

4.6.4.1 Refinamento da técnica independente de cultivo FISH para a padronização e implantação em amostras de água da CM e reservatórios das Antas e Bortolan

Baseados nos artigos científicos utilizados previamente como embasamento literário para a realização dos testes preliminares foram contactados alguns autores (Bernhard Fuchs, Rudolf Amann, Elena González-Toril, Albin Alfreider, Frank-Oliver Glockner. Comunicação pessoal², 2011) dos trabalhos científicos, a fim de obter informações e sugestões adicionais para dar continuidade aos ensaios. Os seguintes testes foram realizados:

4.6.4.2 Teste de funcionalidade das sondas de oligonucleotídeos

Foi testada a funcionalidade das sondas EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III, ARCH915 e o controle negativo NON338 marcadas com o corante fluorescente Cy3 (presença de DNA e do marcador fluorescente) com espectrofotometria de luz visível (Varian Cary 50CONC UV-Visível Spectrophotometer). Foram preparadas soluções contendo 2 µL de sonda (concentração de 500 ng) diluídas em 1,5 mL de água MilliQ estéril, colocadas em cubeta vertical e efetuadas as leituras nos comprimento de onda de 100 nm à 700 nm para a verificação do pico de absorção que, representaria a presença da sequência de oligonucleotídeos de DNA (260 nm) e para a verificação de pico de absorção que representaria a presença do marcador fluorescente Cy3 (549 nm).

4.6.4.3 Fixação

A fixação das amostras foram realizadas com o uso de paraformaldeído para as amostras de água dos reservatórios (RA e RB) e com formaldeído para as amostras de água do CM CM. A utilização do fixador formaldeído para amostras de água ácidas foi realizada de acordo com as recomendações de Elena González-Toril et al. (2003, 2011 – comunicação pessoal³).

² Comunicação pessoal (Fuchs, B.; Amann, R.; González-Toril, E.; Alfreider, A.; e Glockner, O. F., Alemanha e Espanha, 2011).

³ Comunicação pessoal (González-Toril, E., Espanha, 2011)

4.6.4.4 Dispersão celular

Para as amostras de água procedentes dos reservatórios (RA e RB) foi adicionada a etapa de dispersão e desaglomeração das células da amostra, frente a substâncias orgânicas e detritos.

Após a adição de paraformaldeído, foi adicionado 1 mL (para cada 100 mL de amostra de cada ponto de coleta) do detergente TWEEN90. A solução foi acondicionada em tubos de ensaio de 10 mL onde permaneceu por 2 horas (FAZI et al., 2007). Após incubação, a amostra foi sonicada por 40 min, em banho de ultrassom (HOSHINO et al., 2008; ZARDA et al., 1997).

4.6.4.5 Limpeza da amostra

Para as amostras de água, procedentes dos reservatórios (RA e RB), foi adicionada a etapa de limpeza para a retirada de partículas indesejáveis. Procedeu-se pré-filtragens das amostras em filtros de polycarbonato com poros de 10 μm e 20 μm antes de proceder à filtração da amostra em membrana de polycarbonato preta de 0,22 μm de poro e de 47 mm de diâmetro (ALFREIDER et al., 1996).

4.6.4.6 Lavagem da amostra de água ácida

Para as amostras de água procedentes do CM Cava da Mina Osamu Utsumi, foi adicionada a etapa de lavagem da amostra com o meio líquido MackIntosh (GONZÁLEZ-TORIL et al., 2003; MACKINTOSH, 1978). A lavagem se procedeu utilizando o kit de filtração Millipore e membranas de polycarbonato millipore de 0,22 μm de poro.

4.6.4.7 Permeabilização celular

Nesta etapa, as amostras encontravam-se totalmente fixadas e acondicionadas sobre membrana de polycarbonato preta de 0,22 μm de poro.

Para ambas as amostras de água procedentes tanto dos reservatórios quanto da CM, foi introduzida a etapa de permeabilização celular a fim de elevar a permeabilidade das células

bacterianas. A utilização da enzima Lisozima foi procedida de acordo com Sekar et al., 2003; Franks et al., 1998; Hoshino et al., 2008, além do uso de etanol 96%, após a incubação com lisozima.

4.6.4.8 Hibridização

Nesta etapa, após a fixação da amostra (RA, RB e CM), dispersão celular, limpeza da amostra (RA e RB) a permeabilização celular (RA, RB e CM) a amostra passou pela etapa de hibridização, quando foi substituído o fluorocromo Rodamina pelo fluorocromo CY3 indicado especialmente para ambientes que apresentam características de oligotrofia (GLOCKNER et al., 1999).

As concentrações de formamida (FA) no tampão de hibridização também foram ajustadas para os corpos de água avaliados neste estudo.

4.6.5 Avaliação microscópica

As amostras foram analisadas sob microscópio de epi-fluorescência (Microscópio Zeiss-Axioplan 2, filtros DAPI, Filter Set 01 Zeiss) e Cy3 (Filter Set 20 HE Zeiss), lâmpada de mercúrio HBO 100W e objetiva neofluar 100 X /1,30). As imagens foram capturadas em câmera Carl Zeiss AxioCam HRc, utilizando-se programa Axiovision 4.5. Os campos do microscópio, que foram selecionados para a estimativa das células coradas em DAPI, foram os mesmos utilizados para a análise das células hibridizadas com sondas para "Bacteria e Archaea", ou seja, para a estimativa das células coradas com Cy3. As imagens, produzidas em amostras coradas com DAPI e Cy3, foram comparadas para avaliar se houve a hibridização fluorescente "*in situ*".

4.7 Análises Estatísticas

4.7.1 Análise de variância

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para detectar diferenças entre valores determinados nas análises biológicas, físicas e químicas, em amostras de água procedentes dos diferentes corpos de água (CM, RA e RB) tanto para o perfil longitudinal (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) quanto para o perfil vertical (P14S, P14M, P14F, RB-S, RB-M e RB-F), neste estudo. Foram consideradas significativas diferenças apresentando $p < 0,05$ e utilizado o Teste de Tukey.

No primeiro modelo, foram avaliadas as diferenças significativas ($\leq 0,05$) entre os corpos de água avaliados, os reservatórios RA e RB e o ponto CM, os locais ou pontos de coleta e as profundidades. As repetições foram 4, ou seja, os meses de amostragem (out/08, jan/09, abr/09 e jul/09).

No segundo modelo foram avaliadas as diferenças significativas ($\leq 0,05$) entre os corpos de água avaliados, ou seja, os reservatórios RA e RB e o ponto CM os locais ou pontos de coleta e as profundidades, frente aos valores de biomassa fitoplanctônica, densidade total de bactérias, densidade e biomassa total de protozoários e densidade e biomassa das espécies protozooplânctônicas, que apresentaram maiores valores de densidade e biomassa, neste estudo. As repetições foram 4 nos meses de amostragem (out/08, jan/09, abr/09 e jul/09).

4.7.2 Análise multivariada

A Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Correspondência Canônica (CCA) foram aplicadas, a fim de comparar a distribuição dos parâmetros ambientais abióticos, tais como as variáveis físicas e químicas bem como as bióticas, nos pontos de amostragem, tanto para o perfil longitudinal (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) quanto para o perfil vertical (P14S, P14M, P14F, RB-S, RB-M e RB-F) ao longo do estudo de sazonalidade realizado.

A PCA foi aplicada sobre as variáveis abióticas e bióticas para os corpos de água avaliados ao longo dos pontos e meses de coleta (LEGENDRE; LEGENDRE, 1983). O programa

computacional utilizado foi o Pacote de estatística multivariada MVSP Windows 95/98/NT 3.1.

A CCA foi utilizada na correlação entre a composição das espécies protozooplânctônicas com as variáveis abióticas, tanto para as amostragens horizontais (superfícies) quanto para as verticais (ao longo da coluna d'água), sendo a significância (valor de $p < 0,05$ ou 5%) dos eixos canônicos, verificados por meio do teste de Monte Carlo (TER BRAAK, 1986). O programa computacional utilizado foi CANOCO 4.5.

A análise multivariada (PCA) foi aplicada sobre matrizes de dados, representadas por variáveis contínuas, que visa a extrair as principais fontes de variações entre variáveis e amostras, nas quais se pressupõe linearidade entre elas, uma vez que o algoritmo utilizado para a extração dos autovalores (% de explicações) e autovetores (coordenada das amostras e variáveis sobre os eixos - autovalores) é o coeficiente de correlação de Pearson, serve para ver como se relacionam entre si e com as amostras. A análise multivariada (CCA) foi a técnica multivariada aplicada sobre a matriz de variáveis representadas por frequência (tabela de contigência) sobre a qual são extraídos os autovalores e autovetores a partir do algoritmo do qui-quadrado e estes são correlacionados às variáveis abióticas, por meio de regressão múltipla, o que possibilita analisar, simultaneamente, dados bióticos e abióticos, respeitando as respectivas distribuições.

4.7.3 Teste t - Pareado e WILCOXON

Para os resultados obtidos durante a primeira (sondas marcadas com Rodamina Red-X) e a segunda (sondas marcadas com Cy3) etapas de testes para a padronização e implantação da técnica independente de cultivo - Hibridização Fluorescente "in situ" – FISH, foi aplicado primeiramente o Teste t – Pareado, disponível no Software Windows/Excel 2007 com grau de significância de 5% e posteriormente, foi realizado o teste de Wilcoxon.

Este teste foi utilizado para comparar dois tratamentos, quando os dados são obtidos através do esquema de pareamento, sendo a significância (valor de $p < 0,05$ ou 5%). O objetivo deste teste foi comparar as performances de cada sujeito (ou pares de sujeitos, ou seja, os resultados positivos verificados para as análises utilizando sondas coradas com Rodamina e os resultados positivos verificados com sondas coradas com Cy3) no sentido de

verificar se havia diferenças significativas entre os seus resultados nas duas situações (JERROLD, 2010).

Os testes foram aplicados, utilizando-se os resultados obtidos para a Cava da Mina, o reservatório das Antas, o reservatório Bortolan, cepas de *Escherichia coli* e Bactérias Heterotróficas provenientes do ponto CM.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros meteorológicos

Os parâmetros meteorológicos referentes ao índice pluviométrico, umidade relativa do ar, temperatura do ar e velocidade do vento, registrados no período de julho de 2008 a julho de 2009, estão apresentados nas Figuras 3a e 3b.

Os valores obtidos para os parâmetros meteorológicos, obtidos no período de outubro de 2008 a março de 2009, referentes à precipitação pluviométrica (215,91 mm a 289,3 mm), umidade relativa (24% a 99%) e temperatura do ar (9 °C a 29 °C) corroboram com duas estações anuais em regiões tropicais uma estação chuvosa com maiores temperaturas do ar de outubro de 2008 a março de 2009 e uma estação fria e menores temperaturas, de abril a julho de 2009.

De um modo geral, os dados de velocidade do vento apresentaram-se relativamente constantes ao longo de todo o período de estudo avaliado. Foram observados registros de maiores valores de velocidade do vento, nos meses de julho de 2008 ($1,80 \text{ m.s}^{-1}$) e fevereiro de 2009 ($1,90 \text{ m.s}^{-1}$). Já os meses de dezembro de 2008 ($0,34 \text{ m.s}^{-1}$), março e junho de 2009 ($0,37 \text{ m.s}^{-1}$) foram caracterizados pelos menores valores de velocidade do vento.

Figura 3a - Valores mínimos e máximos para temperatura do ar e umidade relativa e somatória dos valores para índice pluviométrico, na região dos reservatórios das Antas e Bortolan e na cava da mina - UTM/INB no período de 2008-2009.

Figura 3b - Velocidade do vento, na região dos reservatórios das Antas e Bortolan e da cava da mina - UTM/INB no período de 2008-2009.

5.2 Amostragens no perfil longitudinal

5.2.1 Variáveis físicas e químicas

5.2.1.1 pH, temperatura da água, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, potencial de óxido-redução (Eh) e transparência da água

Os valores de pH, temperatura da água, condutividade elétrica da água, oxigênio dissolvido, potencial de óxido-redução e transparência da água, determinados nas amostras dos pontos de superfície procedentes da UTM/INB no ponto CM e dos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), estão apresentados nas Figuras 4 e 5 e nas Tabelas 3 e 4.

O menor valor de pH, no ponto CM, foi verificado no mês de abr/09 (3,60) e o maior valor, no mês de out/08 (4,10). Para o reservatório das Antas, para os pontos de superfície (Cab, P41 e P14S), no ponto Cab, os valores de pH variaram de 6,0 (abr/09) a 6,7 (out/08) no ponto P41 os valores de pH variaram de 6,0 (abr/09) a 7,2 (out/08) e para o ponto P14S os valores variaram de 6,1 (abr/09) a 6,9 (out/08). No reservatório Bortolan, para o ponto de superfície RB-S, os valores de pH variaram de 6,5 (jan e abr/09) a 7,5 (out/08).

Analisando todo o período de estudo, os valores de pH no ponto CM evidenciaram condições ácidas. Por outro lado, nos reservatórios das Antas e Bortolan, os valores de pH mantiveram-se próximos da neutralidade, com exceção do mês de abr/09 no RA, onde os valores de pH foram ligeiramente ácidos, (6,0 e 6,1). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de pH registrados em amostras de água procedentes dos diferentes pontos de superfície avaliados. O ponto CM apresentou valores de pH significativamente menores ($p < 0,05$), quando comparado aos pontos Cab, P41, P14S e RB-S.

Os valores de temperatura da água, em amostras de água do ponto CM e dos reservatórios das Antas e Bortolan, apresentaram variações sazonais, quando comparadas as estações quente e úmida, seca e fria. Os maiores valores de temperatura da água foram observados no mês de jan/09, correspondente à estação quente e úmida. Por outro lado, os menores valores de temperatura da água foram detectados no mês de jul/09, como mostram as Tabelas 3 e 4, sendo caracterizada como a estação seca e fria. Considerando-se

os três corpos de água, analisados neste estudo, a temperatura mínima da água foi de 16,1 °C no RA-P41 no mês de jul/09 e a máxima foi de 25,8 °C no RB-S no mês de jan/09.

Os valores de condutividade elétrica da água obtidos em amostras de água da UTM/INB, no ponto CM, foram elevados, durante todo o período de estudo. O menor valor de condutividade elétrica da água no ponto CM foi verificado no mês de jul/09 ($1976,0 \mu\text{S cm}^{-1}$) e o maior valor no mês de abr/09 ($2760,0 \mu\text{S cm}^{-1}$). Para o reservatório das Antas, para os pontos de superfície (Cab, P41, e P14S), no ponto Cab, os valores de condutividade elétrica da água variaram de $37,8 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $497,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) no ponto P41 os valores de condutividade elétrica da água variaram de $79,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (jan/09) a $765,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) e para o ponto P14S, os valores variaram de $138,4 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $563,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08). No reservatório Bortolan, para o ponto de superfície RB-S os valores de condutividade elétrica da água variaram de $64,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $98,9 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08).

Em relação ao reservatório das Antas, foi registrada elevada amplitude de variação dos valores de condutividade elétrica da água, os quais variaram de $37,8 \mu\text{S.cm}^{-1}$ a $765,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$, de modo que, a cada coleta, comparativamente, os menores valores foram sempre registrados em amostras referentes ao ponto à montante do lançamento de efluentes, ou seja, ponto Cab. No reservatório Bortolan, os valores de condutividade elétrica foram os menores quando comparados ao RA e a CM. Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de condutividade elétrica da água, registrada em amostras de água procedentes dos diferentes pontos de superfície avaliados. O ponto CM apresentou valores de condutividade elétrica da água significativamente maiores ($p < 0,05$), quando comparado aos pontos Cab, P41, P14S e RB-S. O RA apresentou valores de condutividade elétrica da água significativamente maiores ($p < 0,05$) nos pontos P41 e P14S, quando comparados ao RB no ponto RB-S.

Durante todo o período de estudo, os valores de concentração de oxigênio dissolvido da água nos reservatórios estudados nos pontos de superfície estiveram entre $6,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (RA-P14S, abr/09) e $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, jan/09). Os menores valores de oxigênio dissolvido, em geral, ocorreram no CM ponto CM, seguido dos pontos no RA e RB. De acordo com a resolução CONAMA 375, para água de Classe II (CONAMA 357, 2005) que estipula o limite de $> 5 \text{ mg.L}^{-1}$ de OD, verificou-se que o RA e RB apresentaram valores de oxigênio dissolvido da água dentro dos limites previstos pela legislação 357/2005 do Conama. O ponto CM trata-se

de efluente in natura, antes do tratamento para lançamento no meio ambiente, não há limite especificado para a água da CM.

Para os valores de potencial de óxido redução (Eh), obtidos em amostras de água neste estudo, os menores valores foram detectados no RA, seguido do RB, quando comparados ao ponto CM. Na UTM/INB no ponto CM, o menor valor de Eh ocorreu no mês de jul/09 (413,0 mV) e o maior ocorreu no mês de abr/09 (556,7 mV).

Figura 4 - Variação dos valores de pH em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 5 - Variação dos valores de condutividade elétrica da água em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) nos meses de amostragem avaliados.

Tabela 3 - Valores de pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e potencial de óxido-redução (Eh) em amostras da UTM/INB no ponto CM.

Meses	Ponto	pH	Temp (°C)	Condut ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Eh (mV)	Transp. (m)
Out/08	CM	4,10	23,0	2600,0	7,1	435,1	X
Jan/09		3,70	24,9	2230,0	6,8	516,4	X
Abril/09		3,60	22,6	2760,0	7,0	556,7	X
Julho/09		3,96	17,1	1976,0	6,7	413,0	X

x = não detectado/avaliado

Tabela 4 - Valores de pH, temperatura, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e potencial de óxido-redução (Eh) em amostras procedentes dos pontos de Superfície dos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S).

Meses	Pontos	pH	Temp (°C)	Condut ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Eh (mV)	Transp. (m)
Out/08	CAB	6,7	22,0	497,0	7,10	284,6	1,5
	P41	7,2	22,0	765,0	6,80	183,4	1,0
	P14S	6,9	20,0	563,0	6,80	289,6	3,7
	RB-S	7,5	21,0	98,9	7,50	316,2	1,3
Jan/09	CAB	6,6	24,9	42,3	7,20	287,1	1,2
	P41	6,7	25,3	79,5	7,00	266,1	0,5
	P14S	6,5	23,5	145,8	6,90	292,0	1,5
	RB-S	6,5	25,8	74,9	8,00	269,7	1,20
Abr/09	CAB	6,0	21,3	37,8	6,70	275,7	1,4
	P41	6,0	21,5	84,0	6,70	286,9	0,5
	P14S	6,1	22,1	138,4	6,30	272,3	1,3
	RB-S	6,5	22,5	64,5	6,70	246,2	1,10
Jul/09	CAB	6,4	17,7	129,4	7,10	156,0	1,0
	P41	6,5	16,1	654,0	7,10	79,0	0,5
	P14S	6,7	16,8	280,0	7,50	133,1	5,3
	RB-S	7,1	17,9	72,8,0	7,00	180,0	1,40
CONAMA 357/05 (Classe II)		6,0-9,0	-	-	>5 mg L ⁻¹	-	-
COPAM/CERH-MG n ^o 1 (2008)		6,0-9,0	-	-	>5 mg L ⁻¹	-	-

- não possui limite

x = não detectado/avaliado

5.2.1.2 Material em suspensão total, orgânico e inorgânico

Os valores de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico e inorgânico em amostras de água procedentes dos pontos de amostragem de superfície, durante os meses avaliados estão apresentados na Figura 6.

O menor valor de material em suspensão total da água no ponto CM foi verificado no mês de jan/09 ($5,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior valor no mês de out/08 ($10,65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de material em suspensão total variaram de $1,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jul/09) a $11,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jan/09).

O menor valor de material em suspensão orgânico da água no ponto CM foi verificado no mês de abr/09 ($1,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior no mês de out/08 ($3,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de material em suspensão orgânico variaram de $0,70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, out/08 e P41, abr/09) a $4,70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P41, jan/09).

O menor valor de material em suspensão inorgânico da água no ponto CM foi verificado no mês de jan/09 ($2,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior no mês de out/08 ($6,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de material em suspensão inorgânico variaram de $0,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jul/09) a $8,12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jan/09).

Verificou-se que, na UTM/INB no ponto CM, a fração inorgânica do material em suspensão representou uma parcela maior da parte total dos sólidos, quando comparada à fração orgânica. Para os pontos de superfície, foi verificada maior contribuição da fração inorgânica, somente no mês de out/08 nos demais meses, a fração orgânica compreendeu a maior parte dos sólidos em suspensão totais, na maioria dos pontos, períodos de amostragem e meses avaliados.

Figura 6 - Variação dos valores da concentração de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico (MSO) e material em suspensão inorgânico (MSI) em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) nos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.3 Clorofila *a*

Os valores das concentrações de clorofila *a* em amostras de água procedentes dos pontos de amostragem de superfície durante todos os meses de amostragem estão representados na Figura 7.

O menor valor de clorofila *a* no ponto CM foi verificado no mês de out/08 ($0,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior valor no mês de abr/09 ($10,75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de clorofila *a* variaram de $0,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jan/09) a $24,66 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). De um modo geral, para os pontos de superfície, as maiores concentrações de clorofila *a* foram registradas no RB e na UTM/INB no ponto CM.

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de clorofila *a* registrados em amostras de água procedentes dos diferentes pontos de superfície avaliados. O ponto CM apresentou valores de clorofila *a* significativamente maiores ($p < 0,05$) quando

comparado aos pontos Cab, P41, P14S. O RA apresentou valores de clorofila *a* significativamente menores ($p < 0,05$) nos pontos Cab e P14S, quando comparados ao RB no ponto RB-S.

Figura 7 - Variação dos valores da concentração de clorofila *a* em amostras de água dos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.4 Carbono

As concentrações de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) para os pontos de superfície foram estimadas somente para os pontos de amostragem localizados nos reservatórios das Antas e Bortolan. Tais valores estão representados na Figura 8, para os meses de amostragem de janeiro, abril e julho de 2009.

Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de carbono orgânico total variaram de 0,54 mg . L⁻¹ (P14S, jul/09) a 39,62 mg . L⁻¹ (P14S, jan/09).

Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de carbono orgânico dissolvido variaram de 1,14 mg . L⁻¹ (P14S, jul/09) a 5,03 mg . L⁻¹ (RB-S, jul/09). Para os

pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de carbono inorgânico dissolvido variaram de $0,68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09) a $1,81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09).

De modo geral nos meses de jan/09 e abr/09, os valores registrados de carbono orgânico total em amostras de água do reservatório das Antas para os pontos de superfície apresentaram maiores valores, quando comparados aos valores registrados no ponto RB-S do reservatório Bortolan.

Para as frações dissolvidas (COD e CID) para os pontos de superfície, foi verificado que o COD representou a maior parcela das formas dissolvidas, sendo que o maior valor foi registrado no ponto RB-S do reservatório Bortolan ($5,03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Sendo assim, verifica-se um padrão inverso, onde o RA possui maiores concentrações de COT e o RB-S possui maiores concentrações das formas dissolvidas de carbono, ou seja, COD e CID.

Figura 8 - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT) e suas frações dissolvidas de carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água dos pontos de Superfície do reservatório das Antas e Bortolan (Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.5 Nutrientes

Nas Figuras 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f e 9g, estão apresentados os dados referentes às concentrações fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico, nitrogênio total, nitrato, nitrito, amônio e silicato, em amostras de água dos pontos de superfície, provenientes da UTM/INB no ponto CM e dos reservatórios das Antas e Bortolan.

5.2.1.5.1 Fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico

O menor valor de fósforo total no ponto CM foi verificado no mês de out/08 ($5,60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior no mês de abr/09 ($17,95 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de fósforo total variaram de $1,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, out/08) a $39,20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fósforo total registrados em amostras de água procedentes do ponto CM em relação ao ponto RB-S, bem como diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fósforo total registrados em amostras de água procedentes dos pontos Cab, P41 e P14S do RA em relação ao RB-S.

O menor valor de fosfato total dissolvido no ponto CM foi verificado no mês de jul/09 ($0,25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior no mês de out/08 ($4,67 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de fosfato total dissolvido variaram de $0,20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P41, jul/09) a $8,40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fosfato total dissolvido registrado em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação ao ponto RB-S, bem como diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fosfato total dissolvido registrado em amostras de água procedentes do ponto P14S do RA, em relação ao RB-S.

O menor valor de fosfato inorgânico no ponto CM foi verificado no mês de out/08 ($1,80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior no mês de jul/09 ($11,95 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de fosfato inorgânico variaram de $0,10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, abr/09) a $2,65 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, abr/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fosfato inorgânico registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (ponto RB-S), bem como diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fosfato inorgânico registrado em amostras de água procedentes dos pontos Cab, P41 e P14S do RA em relação ao RB-S.

Figura 9a - Concentração de Fósforo total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 9b - Concentração de Fosfato total dissolvido e Fosfato Inorgânico em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.5.2 Nitrogênio total, nitrato, nitrito e íon amônio

O menor valor de nitrogênio total no ponto CM foi verificado nos meses de out/08 e jul/09 ($700,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior em abr/09 ($840,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de nitrogênio total variaram de $560,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, out/08) a $1190,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jan/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de nitrogênio total registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, sendo estes menores, quando comparados aos valores de nitrogênio total registrados nos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (ponto RB-S), nos diferentes pontos de superfície avaliados.

O menor valor de nitrato no ponto CM foi verificado no mês de jan/09 ($15,25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior em abr/09 ($33,80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de nitrato variaram de $6,53 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab e P41, out/08) a $176,45 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o valor médio de nitrato registrado em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos valores verificados no reservatório das Antas (Cab, P41 e P14S).

Para os valores de nitrato registrados no RA (Cab, P41 e P14S), foi verificada também diferença significativa ($p < 0,05$), em relação aos maiores valores registrados no reservatório Bortolan (ponto RB-S).

O menor valor de nitrito no ponto CM foi verificado no mês de out/08 ($0,52 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior em abr/09 ($15,83 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de nitrito variaram de $0,12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, out/08) a $2,71 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de nitrito registrados em amostras de água procedentes do ponto CM em relação aos valores verificados no reservatório das Antas no ponto P14S.

O menor valor de íon amônio no ponto CM foi verificado no mês de jul/09 ($6,35 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior em jan/09 ($54,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de íon amônio variaram de $8,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P41, out/08) a $102,25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, out/08).

A contribuição do nitrogênio total, quando comparado às formas fosfatadas (fósforo total, fosfato dissolvido total e fosfato inorgânico) e à sílica, mostrou-se significativamente elevada durante todo o período de estudo.

A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) e a Deliberação COPAM/CERH-MG nº 1 (BRASIL, 2008) estabelecem limite de $10.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ para nitrato e de $1.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ para nitrito em corpos de água Classe II. Verifica-se que os valores de nitrato e de nitrito, obtidos no presente estudo, estiveram dentro dos limites estabelecidos.

Figura 9c - Concentração de Nitrogênio total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 9d - Concentração de Nitrato em amostras de água dos pontos de Superfície ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 9e - Concentração de Nitrito em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 9f - Concentração de íon Amônio em amostras de água dos pontos de Superfície ao longo dos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.5.3 Silicato

O menor valor de silicato no ponto CM foi verificado no mês de out/08 ($0,20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e o maior em abr/09 ($1,30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de silicato variaram de $1,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P41, jul/09) a $4,35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, abr/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de silicato registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), bem como diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de silicato registrados em amostras de água procedentes do RA em relação ao RB.

Figura 9g - Concentração de Silicato em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

5.2.1.6 Dureza, Sulfato, Fluoreto, Molibdênio, Manganês, Zinco, Urânio, Tório, Ferro total, Alumínio, Cádmio, Cobalto, Cromo, Cobre e Chumbo

Os valores de dureza, sulfato, fluoreto, manganês, zinco, urânio, tório e ferro total dos pontos de superfície estão representados nas Figuras 10a, 10b, 10c, 10d, 10e, 10f e 10g.

Os elementos químicos: molibdênio, alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo dos pontos de superfície estão apresentados na Tabela 5, uma vez que tais elementos foram analisados visando a varredura preliminar para a caracterização da qualidade da água nos corpos de água avaliados no presente estudo, bem como para comparar com a Resolução 357 do Conama (2005) para a qualidade das águas.

Em relação aos valores de dureza da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 129,10 mg.L⁻¹ (jul/09) a 1333,90 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) os valores de dureza variaram de 6,40 mg.L⁻¹ (Cab, abr/09) a 311,90 mg.L⁻¹ (P41, out/08). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os elevados valores de dureza

da água, registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo.

Em relação aos valores de sulfato da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 366,60 mg.L⁻¹ (jul/09) a 1832,00 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) os valores de sulfato variaram de 2,31 mg.L⁻¹ (Cab, jan/09) a 386,70 mg.L⁻¹ (P41, out/08, estando acima dos limites permitidos para água de Classe II, segundo a resolução CONAMA 357/05). O ponto CM apresentou os mais elevados valores de sulfato na água. Nos reservatórios das Antas e Bortolan, os valores apresentaram-se consideravelmente menores. Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os elevados valores de sulfato registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo.

Em relação aos valores de fluoreto da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 33,40 mg.L⁻¹ (jul/09) a 75,10 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) os valores de fluoreto variaram de < 0,5 mg.L⁻¹ (Cab, P41 e P14S, jan/09 e RB-S, out/08, jan/09 e jul/09) a 3,52 mg.L⁻¹ (P41, out/08). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os elevados valores de fluoreto registrados em amostras de água procedentes do ponto CM em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S) ao longo do período de estudo. Para o reservatório das Antas, foram verificados valores de fluoreto acima dos limites previstos para a legislação CONAMA 357/05, para os pontos Cab (1,55 mg.L⁻¹), P41 (3,52 mg.L⁻¹) e P14S (1,80 mg.L⁻¹) para o mês de out/08 e para o ponto P41 (1,64 mg.L⁻¹), no mês de jul/09.

Em relação aos valores de manganês da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 47,05 mg.L⁻¹ (jul/09) a 95,80 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) os valores de manganês variaram de 0,115 mg.L⁻¹ (Cab, abr/09) a 1,24 mg.L⁻¹ (P41, out/08). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os elevados valores de manganês registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo.

Frente à resolução Conama 357/05 (0,1 mg.L⁻¹) e a deliberação normativa Copam 1998 (0,1 mg.L⁻¹), todos os valores de manganês encontraram-se acima dos limites máximos permitidos por tais normas, para os pontos de superfície dos reservatórios das Antas e Bortolan.

Em relação aos valores de zinco na água da UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 7,95 mg.L⁻¹ (jul/09) a 15,50 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de zinco variaram de <0,01 mg.L⁻¹ (Cab, P41, P14S e RB-S, out/08, jan/09 e jul/09) a 0,0635 mg.L⁻¹ (P14S, abr/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os elevados valores de zinco registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo. Para os reservatórios das Antas e Bortolan, os valores do metal zinco estiveram abaixo dos limites previstos para água de Classe II, frente à resolução Conama 357/2005 (0,18 mg.L⁻¹) e segundo a deliberação normativa Copam 1998 (0,18 mg.L⁻¹).

Em relação aos valores de urânio da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 0,12 mg.L⁻¹ (jul/09) a 4,25 (out/08). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) os valores de urânio mantiveram-se <0,01 mg.L⁻¹, com exceção do ponto P41 em jul/09 que foi de 0,017 mg.L⁻¹; ainda assim estando de acordo com o limite de urânio permitido pela legislação vigente para água de Classe II ($U = 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os maiores valores de urânio registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo. Para os reservatórios das Antas e Bortolan, os valores de urânio estiveram abaixo dos limites previstos para água de Classe II, frente a resolução Conama 357/2005 (0,02 mg.L⁻¹) e segundo a deliberação normativa Copam 1998 (0,02 mg.L⁻¹).

Em relação aos valores de tório da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de <0,01 mg.L⁻¹ (out/08 e jul/09) a 0,3 (abr/09). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de tório mantiveram-se <0,01 mg.L⁻¹ com exceção do ponto Cab, out/08 (0,05 mg.L⁻¹). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os maiores valores de tório registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo.

Em relação aos valores de ferro total da água na UTM/INB no ponto CM, os valores variaram de 1,76 mg.L⁻¹ (jul/09) a 10,8 (abr/09). Para os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de ferro total variaram de <0,03 mg.L⁻¹ (P14S, jul/09) a 1,22 mg.L⁻¹ (P41, jan/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os maiores valores de ferro total registrados em amostras de água procedentes do ponto CM, em relação aos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S), ao longo do período de estudo.

De acordo com a Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005), os limites estabelecidos para a concentração de Ferro Total para os corpos de água de Classe II é de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Sendo assim, foram detectados valores de ferro total acima dos limites permitidos para o ponto Cab nos meses de out/08 ($0,44 \text{ mg.L}^{-1}$), jan/09 ($0,52 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,55 \text{ mg.L}^{-1}$); para o ponto P41 nos meses de jan/09 ($1,22 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,47 \text{ mg.L}^{-1}$); para o ponto P14S, para os meses de jan/09 ($1,09 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,52 \text{ mg.L}^{-1}$) e para o ponto RB-S, para os meses de jan/09 ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,51 \text{ mg.L}^{-1}$).

Figura 10a - Valores de dureza em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10b - Valores de sulfato em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10c - Valores de fluoreto em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10d - Valores de manganês em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10e - Valores de Zinco em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10f - Valores de Urânio e Tório em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 10g - Valores de Ferro total em amostras de água dos pontos de Superfície, ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Os valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo), bem como dos metais totais: alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados, estão representados na Tabela 5.

Em relação aos valores de molibdênio na água no ponto CM, os valores foram todos $<0,05 \text{ mg.L}^{-1}$. Para os pontos de superfície dos reservatórios (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores de molibdênio mantiveram-se $<0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, com exceção dos pontos Cab, out/08 ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$); P14S, abr/09 ($0,106 \text{ mg.L}^{-1}$), RB-S, out/08 ($0,125 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,123 \text{ mg.L}^{-1}$).

Os valores referentes à caracterização química dos metais evidenciaram valores acima dos limites estabelecidos pelas legislações vigentes para água de Classe II (CONAMA 357/2005 e COPAM/2008), para o metal alumínio.

Tabela 5 - Valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo) e dos metais totais: alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

Meses	Pontos	(mg . L ⁻¹)						
		Mo	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Pb
Out/08	CM	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	CM	<0,05	35,42	0,0385	0,07	<0,02	0,006	0,006
Abr/09	CM	<0,05	106,5	X	X	X	X	X
Jul/09	CM	<0,05	32,13	X	0,0455	<0,025	0,0085	0,0017
Out/08	CAB	0,08	x	x	x	x	x	x
Jan/09	CAB	<0,05	1,83	0,0015	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,0005
Abr/09	CAB	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jul/09	CAB	<0,05	0,915	0,001	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,0013
Out/08	P41	0,08	x	x	x	x	x	x
Jan/09	P41	<0,05	1,9	0,0003	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,001
Abr/09	P41	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jul/09	P41	<0,05	0,952	0,0003	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,001
Out/08	P14S	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	P14S	<0,05	2,22	0,0007	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,0015
Abr/09	P14S	0,106	x	x	x	x	x	x
Jul/09	P14S	<0,05	1,1125	0,0007	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,001
Out/08	RB-S	0,125	x	x	x	x	x	x
Jan/09	RB-S	<0,05	1,8	<0,0001	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,001
Abr/09	RB-S	0,123	x	x	x	x	x	x
Jul/09	RB-S	<0,05	0,7525	<0,0005	< 0,025	0,03	< 0,002	0,001
**CONAMA 357/05		-	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,01
**COPAM/CERH-MG nº1 (2008)		-	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,01

- não possui limite

x = não detectado/avaliado

< = abaixo do limite de detecção do método

** aplicável somente para os reservatórios.

5.2.2 Variáveis biológicas

5.2.2.1 Composição taxonômica da comunidade de protozoários planctônicos nos pontos do perfil longitudinal

A composição taxonômica dos gêneros de protozoários planctônicos, identificados no presente estudo, as informações sobre seus tipos nutricionais, local de ocorrência em cada corpo de água avaliado neste estudo ao longo dos pontos de Superfície bem como a classificação das espécies em: raras, acessórias ou constantes de acordo com o índice de Constância de Dájoz, estão apresentadas na Tabela 6.

Informações adicionais sobre a composição taxonômica da comunidade protozooplanctônica registrada encontram-se no ANEXO B.

A partir das análises qualitativas da comunidade protozooplanctônica, foram identificados 26 gêneros de protozoários procedentes das amostras de água dos três corpos aquáticos avaliados, durante todo o período de estudo. Somente um organismo não foi possível identificar em nível de gênero, sendo chamado de Sp.9. Deste total, 13 gêneros foram identificados no reservatório das Antas (Cab, P41 e P14S), 14 no reservatório Bortolan (RB-S) e 13 no ponto CM.

O Filo Ciliophora foi representado por 17 gêneros, os Amoebozoa por 5, os Ochrophyta e Heliozoa foram representados por um gênero cada um (ANEXO E). Os ciliados se destacaram com o maior número de organismos, em todo o período de estudo avaliado.

Em relação aos tipos nutricionais, ou seja, fontes de alimento preferenciais dos protozoários identificados, a preferencial foi, primeiramente, para o tipo "omnívoros", seguido dos bac/flag.

Em relação à frequência de ocorrência (dada pelo índice de constância de Dájoz - ICD) dos táxons pertencentes a comunidade protozooplanctônica nos pontos de superfície, verificou-se que, de um total de 26 táxons registrados nos pontos de coleta, somente 4 táxons foram classificados como constantes (C), ocorrendo em mais de 50% das amostras (*Campanella umbelaria*, *Enchelys* sp., *Strombidium* sp. e *Urotricha* sp.).

Tabela 6 - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos de Superfície (CM, P41, Cab, P14S e RB-S), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 20.

Gêneros	Nutricional	CM				CAB				P41				P14S				RB-S				*%	ICD
		OUT	JAN	ABR	JUL	OUT	JAN	ABR	JUL	OUT	JAN	ABR	JUL	OUT	JAN	ABR	JUL	OUT	JAN	ABR	JUL		
<i>Actinosphaerum</i> sp.	PROT/BAC	x	x	x																		15	R
<i>Arcella</i> sp.	BAC																			x		5	R
* <i>Ameba</i> sp. (Sp. 25)	O	x	x	x	x																	20	R
<i>Askenásia</i> sp.	ALG/KI									x				x	x			x				20	R
<i>Campanella umbelaria</i>	BAC/ALG	x	x			x	x			x	x	x		x	x	x		x	x	x		65	C
<i>Codonella cratera</i>	O	x			x															x	x	20	R
<i>Enchelys</i> sp.	O	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x		85	C
<i>Holophrya</i> sp.	O																x			x	x	15	R
* <i>Holophrya</i> ou <i>Prorodon</i>	#	x		x																		10	R
<i>Lagynus</i> sp.	O	x	x																			10	R
<i>Mesodinium</i> sp.	O					x				x		x		x	x	x	x					35	A
<i>Monodinium balbiani</i>	R										x	x							x		x	20	R
<i>Mycterothrix erlangeri</i>	#	x	x	x	x																	20	R
<i>Paradileptus elephantynus</i>	O										x	x			x	x		x				25	R
<i>Paramecium</i> sp.	BAC/ALG/FUN										x											5	R
<i>Sphaerastrum</i> sp.	PROT/BAC	x	x	x	x																	20	R
<i>Stokesia vernalis</i>	MIX/O																			x	x	10	R
<i>Strobilidium</i> sp.	ALG																			x	x	10	R
<i>Strombidium</i> sp.	KI/ALG/BAC					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	80	C
*Sp. 9	#																					0	X
* <i>Tecameba</i> (castanha)	BAC/FLAG/CIL	x	x	x	x																	20	R
* <i>Tecameba</i> (<i>diffugia</i> / <i>netzelia</i>)	BAC/FLAG/CIL	x	x	x	x																	20	R
* <i>Tecameba</i> (Sp. 33)	BAC/FLAG/CIL	x	x	x	x																	20	R
<i>Tintinnidium</i> sp.	O												x				x			x	x	20	R
<i>Urotricha</i> sp.	BAC/FLAG	x	x	x	x		x	x			x	x			x	x		x	x	x	x	70	C
<i>Vorticella</i> sp.	BAC/ALG					x				x		x		x		x		x	x	x	x	45	A

sem informação; * protozoários sem a confirmação da identificação; X ausente; *% frequência de ocorrência; ICD = Classificação de acordo com o Índice de Constância de Dajóz.

5.2.2.2 Distribuição espacial e temporal do protozooplâncton, do bacterioplâncton e da biomassa fitoplanctônica nos pontos do perfil longitudinal

Os valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton, para os pontos de amostragem de Superfície e meses de coleta avaliados, estão representados na Figura 11.

De acordo com os resultados obtidos para os protozoários planctônicos, observados em amostras de água procedentes da UTM/INB do ponto CM avaliado neste estudo, o menor valor de densidade protozooplanctônica no ponto CM foi $1 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$ (jul/09) e o maior no ponto CM foi de $3 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$ (jan/09). Para os valores de densidade do protozooplâncton nos pontos de superfície do RA e do RB (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores variaram de $0,03 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$ (Cab, jul/09) à $25 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$ (RB-S, abr/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de densidade do protozooplâncton registrados em amostras de água procedentes do reservatório das Antas (Cab: $0,47 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$, P41: $0,75 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$ e P14S: $1 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$), em relação aos valores médios de densidade do protozooplâncton registrados no reservatório Bortolan (ponto RB-S: $11 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$).

De acordo com os resultados obtidos para o bacterioplâncton, observados em amostras de água procedentes da UTM/INB no ponto CM, avaliado neste estudo, o menor valor de densidade do bacterioplâncton foi $0,06 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ (abr/09) e o maior de bactérias no CM foi de $0,37 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ (jan/09). Para os valores de densidade do bacterioplâncton nos pontos de superfície do RA e do RB (Cab, P41, P14S e RB-S) variaram de $0,05 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ (P14S, abr/09) a $1 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de densidade do bacterioplâncton registrados em amostras de água procedentes do ponto CM ($0,18 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$), em relação aos valores médios de densidade do bacterioplâncton registrados no reservatório Bortolan (RB-S: $0,82 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$), bem como diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de densidade do bacterioplâncton registrados em amostras de água procedentes do reservatório das Antas (Cab: $0,25 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$, P41: $0,23 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ e P14S: $0,35 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$), em relação aos valores médios de densidade do bacterioplâncton registrados no reservatório Bortolan.

Quando analisada, concomitantemente, a distribuição espacial e temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton nos três corpos de água, avaliados neste estudo, foi observado que, em geral, para os protozoários planctônicos houve

diminuição nos valores de densidade, ao longo dos meses de amostragem avaliados (out/08 à jul/09), nos pontos Cab e P41. Para o bacterioplâncton, foi registrada uma pequena amplitude de variação nos valores de densidade bacteriana ao longo dos pontos de coleta de superfície (Cab, P41 e P14S), para os meses de abr/09 e jul/09.

Para a UTM/INB, no ponto CM, os valores de densidade do protozooplâncton acompanham os maiores valores de densidade de células bacterianas (Figura 9).

Para o bacterioplâncton no RB, no ponto de superfície (RB-S), a densidade bacteriana manteve-se estável seguido de elevado valor em jul/09 (estação seca e fria).

Figura 11 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton ao longo dos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

Os valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton, para todos os pontos de amostragem e meses de coleta avaliados, estão representados na Figura 12.

De acordo com os resultados obtidos para os protozoários planctônicos, observados em amostras de água procedentes da UTM/INB no ponto CM, o menor valor de biomassa protozooplantônica foi de $158,8897 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (out/08) e o maior de biomassa de

protozoários no ponto CM foi de $284,6325 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (abr/09). Para os valores de biomassa do protozooplâncton nos pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores variaram de $0,0049 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jul/09) a $43,1688 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, abr/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de biomassa do protozooplâncton registrados em amostras de água procedentes do reservatório das Antas (pontos Cab: $0,210 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ e P14S: $3,075 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$), em relação aos valores médios de biomassa do protozooplâncton registrados no reservatório Bortolan (ponto RB-S: $16,323 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$).

De acordo com os resultados obtidos para a estimativa de biomassa fitoplanctônica registrados em amostras de água procedentes da UTM/INB no ponto CM, o menor valor de biomassa fitoplanctônica foi menor que o limite de detecção em out/08 e o maior valor de biomassa fitoplanctônica no CM foi de $7,2025 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (abr/09). Para os valores de biomassa fitoplanctônica nos pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), os valores variaram de $0,2010 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (Cab, jan/09) a $16,5222 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de biomassa fitoplanctônica registrados em amostras de água procedentes do ponto CM ($5,035 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$), em relação aos valores médios de biomassa fitoplanctônica registrados no reservatório das Antas (Cab: $0,316 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$, P41: $1,788 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ e P14S: $1,549 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$) bem como diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores médios de biomassa fitoplanctônica registradas em amostras de água procedentes do reservatório das Antas (pontos: Cab e P14S), em relação aos valores médios de biomassa fitoplanctônica registrados no reservatório Bortolan (RB-S: $7,788 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$).

Em geral, os maiores valores de biomassa fitoplanctônica ocorreram no reservatório Bortolan, seguidos da UTM/INB e do reservatório das Antas.

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton nos três corpos de água, avaliados neste estudo, foi observado que, para os protozoários planctônicos, foi registrada uma diminuição dos valores de biomassa, ao longo dos meses de amostragem avaliados (out/08 à jul/09) para os pontos de amostragem Cab e P41, como mostra a Figura 10.

Temporalmente, a biomassa protozooplanctônica apresentou seus maiores valores nos meses de out/08 e abr/09 para o reservatório das Antas (P14S) para o reservatório Bortolan os maiores valores ocorreram nos meses de abr/09 e jul/09 (RB-S) e para o ponto CM, no

mês de abr/09. O mesmo comportamento foi observado para os valores de biomassa fitoplanctônica, no reservatório das Antas no ponto P14S, onde ocorreu, no mês de abr/09, o maior valor de biomassa fitoplanctônica. Para o reservatório Bortolan, no mês de jul/09 e para o ponto CM, em abr/09. Provavelmente, a maior disponibilidade de alimento (biomassa algal) foi um ou o fator predominante para os maiores valores de biomassa protozooplânctônica, nestes meses.

Para os pontos Cab e P41 (reservatório das Antas) ocorreu o inverso, os maiores valores de biomassa protozooplânctônicas ocorreram quando foram registrados menores valores de biomassa fitoplanctônica. Fato que pode ser atribuído a uma relação de pressão de predação dos protozoários sobre a biomassa algal e maior competição pela mesma fonte de alimento.

Figura 12 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton, ao longo dos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) e meses de amostragem.

5.2.2.3 Análise multivariada

5.2.2.3.1 Relações das variáveis abióticas e bióticas sazonal e espacialmente, ao longo dos pontos do perfil longitudinal (CM, Cab, P41, P14S e RB-S)

A Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada, utilizando-se os valores das variáveis físicas e químicas: material em suspensão total (MST), clorofila *a*, fósforo total (P total), oxigênio dissolvido (OD), pH, nitrogênio total (N Total), condutividade elétrica da água, fluoreto, sulfato, manganês, zinco e urânio, bem como os valores de densidade total de protozoários (DTProto), biomassa total de protozoários (BTProto), estimativa de biomassa fitoplanctônica (BIOFITO) e densidade total bacteriana (DTBac) permitiu a extração e interpretação de dois eixos fatoriais que, juntos, explicaram 70,2% da variação dos resultados. O eixo 1 explicou 46,7%, enquanto o eixo 2 explicou 23,5%.

O eixo 1 representou a relação negativa entre a variável pH (com as variáveis BTProto, zinco, urânio manganês, sulfato, fluoreto e condutividade), com extrema coordenada positiva e as variáveis BTProto, zinco, urânio manganês, sulfato, fluoreto e condutividade com coordenadas negativas. O eixo 2 foi formado pelas coordenadas positivas do P total, MST, OD, clorofila *a* e as densidades totais de bactérias (DTBac) e protozoários (DTProto) e pela coordenada negativa do N Total (Figura 13a).

Figura 13a - Diagrama representativo dos eixos fatoriais 1 e 2 extraídos a partir da Análise de Componentes Principais aplicado sobre os resultados de Superfície.

De acordo com a disposição dos pontos de amostragem de Superfície CM, Cab, P41, P14S e RB-S, na Figura 13 a, que representaram os ambientes aquáticos: CM (CM-UTM/INB) e os reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S) foi verificada a distinção entre estes três corpos de água, uma vez que as amostras sazonais do RB, CM e RA apresentaram-se muito bem separadas em quadrantes distintos, ou seja, respectivamente no quadrante 1, no quadrante 2 e no quadrante 4.

Tal resultado comprovou a existência de um ambiente com características da água extremas, frente às variáveis químicas, como é o caso do ponto CM, estando fortemente relacionado às variáveis zinco, urânio, manganês, sulfato, fluoreto e condutividade elétrica da água e aos menores valores de pH, bem como aos elevados valores de biomassa total do protozooplâncton. O reservatório Bortolan demonstrou ser o corpo de água com melhor qualidade química, estando fortemente relacionado aos nutrientes, à clorofila *a*, aos elevados valores de densidade do protozooplâncton e bacterioplâncton e biomassa fitoplanctônica, bem como aos maiores valores de pH. O RB apresentou correlação totalmente negativa com relação às variáveis químicas avaliadas.

Por outro lado, o reservatório das Antas caracterizou-se como um ambiente intermediário entre o CM e o RB, estando positivamente relacionado, principalmente, ao nitrogênio total, mas também ao fósforo total, pH, DT₅₀ e DTP; o RA esteve negativamente relacionado às variáveis clorofila *a*, BIOFITO e MST.

Sazonalmente, para o ponto CM, os meses de out/08 e jul/09 apresentaram-se distintos. Em out/08, iniciaram-se as primeiras chuvas de verão e por outro lado, o mês de jul/09 foi caracterizado como um período seco e de baixas temperaturas. Para o RB, o mesmo padrão foi verificado para o mês de jul/09. No RA, houve uma maior homogeneidade entre os meses de amostragem avaliados.

Espacialmente, verificou-se que tanto o ponto CM quanto o ponto P41, no mês de jul/09, mostraram-se semelhantes, estando localizados mais próximos ao Eixo 1. Provavelmente, o efeito do lançamento dos efluentes tratados procedentes do ponto CM no ponto P41 foi um dos fatores que propiciou tal semelhança no mês de jul/09.

A biomassa total de protozoários (BTProto) apresentou correlação positiva com o ponto CM tal fato pôde ser explicado pelos elevados valores de biomassa protozooplânctônica registrados neste CM. As formas de vida presentes no CM, provavelmente, são tolerantes às características químicas extremas da água. Fatores como menor competição pela mesma fonte de alimento associados à menor pressão de predação por organismos do nível trófico superior também podem explicar o sucesso na biomassa dos protozoários no ponto CM.

A Análise de Correspondência Canônica (CCA) realizada, a partir dos valores de biomassa protozooplânctônica e densidade protozooplânctônica, evidenciaram semelhança entre os resultados. Sendo assim, somente os resultados referentes aos valores de densidade do protozooplâncton foram tratados na CCA.

A Análise de Correspondência Canônica (CCA) realizada extraiu dois eixos canônicos que explicaram um total de 55,7% da variação nos valores de densidade da comunidade protozooplânctônica e, desta percentagem, 69,7% puderam ser explicadas pelas variáveis abióticas consideradas. As correlações entre a densidade da comunidade protozooplânctônica e as variáveis abióticas (pH, silicato, nitrato, fosfato total dissolvido, MSO, Cl *a*, MST, fosfato inorgânico, nitrito, MSI, fluoreto, urânio, zinco, manganês, dureza, condutividade, sulfato, tório, amônio, N total e oxigênio dissolvido) foram superiores a 0,9. Tanto o eixo canônico 1 (F ratio= 4,244; *p*= 0,002) quanto todos os demais foram significativos (F ratio= 2,231; *p*= 0,002) (Tabela 7a).

Ao longo dos eixos 1 e 2, três associações puderam ser identificadas: uma em relação ao eixo 1, que explicou 37,7% da variação das espécies, dos quais 47,3% foram atribuídos às variáveis abióticas (Tabelas 7a e 7b); esta foi formada pelos gêneros de protozoários: *Tecameba* (castanha), *Ameba* sp. (Sp. 25), *Tecameba* (*diffflugia/netzelia*), *Mycterothrix erlangeri*, *Sphaerastrum* sp., *Tecameba* (Sp. 33) (associação 1), com extremas coordenadas positivas (Figura 11b). As outras duas, de espécies, ficaram evidenciadas ao longo do eixo 2, as quais juntamente com as do eixo 1 representaram os 55,7% da variação das espécies (Tabela 7a).

A 2ª associação (associação 2a), com extremas coordenadas positivas no eixo 2, reuniu os gêneros de protozoários: *Tintinnidium* sp., *Holophrya* sp., *Stokesia vernalis* e *Strobilidium* sp e a 3ª (associação 2b), representadas pelos gêneros de protozoários: *Askenásia* sp. e *Paradileptus elephantinus*, com extremas coordenadas negativas (Figura 11b e Tabela 7c).

As variáveis abióticas: condutividade elétrica da água, manganês e zinco apresentaram correlação positiva ($r = 0,963$; $0,953$ e $0,947$, respectivamente) com o eixo 1, enquanto o pH apresentou correlação negativa ($r = - 0,965$) (Tabela 7b) com o eixo 1, o que indicou que a associação 1 (Tabela 7c) ocorreu com maior abundância nas estações de amostragem com baixos valores de pH mais e com elevados valores de condutividade elétrica da água, de manganês e de zinco. Já a associação 2a esteve mais correlacionada a elevadas concentrações de P_{total} , clorofila a , bem como para o nitrato, o silicato e o fosfato total dissolvido, enquanto a 2b apresentou maior correlação positiva com o nitrogênio total (Tabela 7c).

Tabela 7b - Correlações das Variáveis abióticas com os eixos canônicos 1 e 2.

Variáveis Abióticas	Eixo 1	Eixo 2
pH	-0,965	0,043
Oxigênio Dissolvido	-0,113	-0,026
Condutividade elétrica da água	0,963	-0,083
Clorofila <i>a</i>	0,115	0,626
MST	0,239	0,240
P total	-0,151	0,685
N total	-0,231	-0,325
Sulfato	0,887	-0,094
Fluoreto	0,798	-0,026
Manganês	0,953	-0,024
Zinco	0,947	-0,015
Urânio	0,851	-0,043

Tabela 7c - Distribuição das estações e pontos de amostragem, ao longo dos eixos canônicos 1 e 2.

Eixo 1	Eixo 2	
Associação 1	Associação 2a	Associação 2b
CMjan09	RB-Sabr09	P14Sout08
CMout08	RB-Sjul09	P41out08
CMjul09	P14Sjul09	CABout08
CMabr09		P14Sjan09
		RB-Sout08
		P14Sabr09
		CABjul09
		CABabr09
		P41abr09
		CABjan09
		RB-Sjan09

De acordo com a disposição dos pontos de amostragem de Superfície CM, Cab, P41, P14S e RB-S, mostrados na Figura 11 b, que representaram os ambientes aquáticos: LMA (CM-UTM/INB), os reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S); foi verificada a distinção entre estes três corpos de água, associando variáveis bióticas e abióticas, uma vez que, as amostras sazonais do RB, CM e RA apresentaram-se muito bem separadas em quadrantes distintos. Foi verificada a distinção entre o LMA (CM) e os reservatórios (RA e RB), uma vez que o ponto CM localizou-se mais relacionado ao Eixo 1, na extremidade direita

do gráfico, os reservatórios das Antas e Bortolan mais relacionados ao Eixo 2, nos quadrantes 3 e 4, à esquerda.

Tal resultado indicou características da água distintas nos diferentes reservatórios, como é o caso do ponto CM, frente às variáveis químicas, às formas inorgânicas dos nutrientes (fosfato inorgânico, nitrito, MSI e amônio), bem como aos valores de densidade dos gêneros de protozoários identificados neste corpo de água (ANEXO B).

Os reservatórios das Antas e Bortolan demonstraram maior similaridade, estando ambos os relacionados às formas orgânicas (clorofila *a* e MSO) e aos nutrientes (P total, fosfato total dissolvido, nitrato, silicato, MST e N total), aos elevados valores de densidade dos gêneros de protozoários identificados, bem como aos maiores valores de pH registrados. O RA e o RB apresentaram correlação negativa em relação às variáveis químicas avaliadas.

Sazonalmente, para o RA, a partir do ponto de lançamento de efluentes (ponto 41) e para o RB, foi verificado que as amostras de jul/09 apresentaram-se distintas das demais, coletadas nos outros meses de amostragem (out/08, jan/09 e abr/09). Vale ressaltar que no mês de jul/09, somente uma espécie constante foi registrada na RA e RB, ou seja, o *Strombidium* sp.

Espacialmente, para o ponto Cab localizado no RA, foi verificado que tal estação de amostragem foi diferente dos demais pontos, mesmo estando relacionada ao Eixo 2, o ponto Cab se localizou todo no quadrante 4 inferior negativo, padrão não verificado para os demais pontos, que se distribuíram entre os quadrantes 3 e 4. Provavelmente, o input de entrada do rio afluente e a distância do ponto CM sejam fatores que contribuem para a sua diferença dos demais pontos.

Os gêneros de protozoários planctônicos identificados no ponto CM diferiram totalmente dos identificados nos reservatórios tais espécies provavelmente possuem maior tolerância às características químicas deste lago ácido de mina de urânio.

5.3 Amostragens no perfil vertical

5.3.1 Variáveis físicas e químicas

5.3.1.1 pH, temperatura da água, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, potencial de óxido-redução (Eh) e transparência da água

Os valores de pH, temperatura da água, condutividade elétrica da água, oxigênio dissolvido, potencial de óxido-redução e transparência da água, determinados nas amostras procedentes dos pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F) estão apresentados nas Figuras 14 e 15 e na Tabela 8.

Para os pontos P14S, P14M e P14F, correspondentes à variação vertical da coluna de água no ponto P14 do RA, os valores de pH variaram 6,1 (abr/09) a 6,9 (out/08), no ponto P14S de 6,0 (abr/09) a 7,0 (out/08), no ponto P14M e de 5,6 (abr/09) a 7,0 (out/08), no ponto P14F. Para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, que correspondem à variação vertical da coluna de água no RB, os valores de pH variaram de 6,5 (jan e abr/09) a 7,5 (out/08) para o ponto RB-S, 6,4 (jan e abr/09) a 7,1 (out/08 e jul/09), para o ponto RB-M e de 6,5 (jan e abr/09) a 7,1 (out/08).

Avaliando o perfil vertical da coluna de água dos reservatórios, em todo o período de estudo, os valores de pH mantiveram-se menores, ou seja, mais ácidos, no mês de abr/09 e mais elevados, no mês de out/08.

Os maiores valores de temperatura da água foram observados no mês de jan/09, correspondente à estação quente e úmida. Por outro lado, os menores valores de temperatura da água foram detectados no mês de jul/09, como mostra a Tabela 8, sendo caracterizada como uma estação seca e fria. Entre os reservatórios analisados neste estudo, a temperatura da água mínima foi de 16,8 °C no RA-P14-S, no mês de jul/09 e a máxima foi de 25,8 °C no RB-S, no mês de jan/09.

Para os valores de condutividade elétrica da água, nos pontos P14S, P14M e P14F,, correspondentes à variação vertical da coluna de água no ponto P14 do RA, variaram de 138,4 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a 563,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) no ponto P14S, 184,8 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (jan/09) a 629,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) no ponto P14M e de 168,3 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (jan/09) a 604,0 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) no ponto P14F. Para os pontos RB-S, RB-M e RB-F que correspondem à variação vertical na

coluna de água do RB, os valores de condutividade elétrica da água variaram de $64,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $98,9 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08), $70,0 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $98,9 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08) para o ponto RB-M e de $66,3 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (abr/09) a $99,5 \mu\text{S.cm}^{-1}$ (out/08).

No reservatório Bortolan, os valores de condutividade elétrica foram menores quando comparados ao RA.

Durante todo o período de estudo, os valores de concentração de oxigênio dissolvido da água no perfil vertical dos reservatórios estiveram entre $5,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (RA-P14F, jan/09) e $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, jan/09). De acordo com a legislação vigente para água de Classe II (CONAMA 357, 2005), que estipula o limite de $>5 \text{ mg.L}^{-1}$ de OD, verificou-se que todo o perfil vertical do RA e do RB apresentaram-se dentro dos limites previstos pela legislação vigente.

Para os valores de potencial de óxido redução (Eh), obtidos em amostras de água do perfil vertical dos reservatórios, os valores variaram de $133,1 \text{ mV}$ (P14S, jul/09) a $314,5 \text{ mV}$ (P14M, jan/09) e de $175,0 \text{ mV}$ (RB-M, jul/09) a $334,9 \text{ mV}$ (RB-F, out/08).

Em relação aos valores de transparência da água no perfil vertical dos reservatórios, estes variaram de $0,5 \text{ m}$ a $5,3 \text{ m}$ no RA e de $1,10 \text{ m}$ a $1,40 \text{ m}$ no RB.

Figura 14 - Variação dos valores de pH em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 15 - Variação dos valores condutividade elétrica da água em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Tabela 8 - Valores de pH, temperatura, condutividade (Condut.), oxigênio dissolvido (OD), potencial de óxido-redução (Eh) e transparência da água (transp.) em amostras de água provenientes dos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan registrados no presente estudo.

Meses	Pontos	pH	Temp (°C)	Condut ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Eh (mV)	Transp. (m)
Out/08	P14S	6,9	20,0	563,0	6,80	289,6	3,70
	P14M	7,0	x	629,0	6,40	281,9	x
	P14F	7,0	x	604,0	6,20	282,6	x
	RBS	7,5	21,0	98,9	7,50	316,2	1,30
	RBM	7,1	x	98,9	7,00	328,2	x
	RBF	7,1	-	99,5	7,80	334,9	x
Jan/09	P14S	6,5	23,5	145,8	6,90	292,0	1,50
	P14M	6,6	24,0	184,8	6,60	314,5	x
	P14F	6,6	24,4	168,3	5,40	309,5	x
	RBS	6,5	25,8	74,9	8,00	269,7	1,20
	RBM	6,4	25,4	74,1	7,20	268,6	-
	RBF	6,5	24,5	72,9	6,40	272,8	x
Abr/09	P14S	6,1	22,1	138,4	6,30	272,3	1,30
	P14M	6,0	22,0	201,0	6,20	273,4	x
	P14F	5,6	22,1	192,8	6,20	272,5	x
	RBS	6,5	22,5	64,5	6,70	246,2	1,10
	RBM	6,4	22,0	70,0	6,50	251,4	x
	RBF	6,5	21,4	66,3	6,40	250,6	x
Jul/09	P14S	6,7	16,8	280,0	7,50	133,1	5,3
	P14M	x	x	x	x	x	x
	P14F	6,7	17,0	285,0	7,30	168,0	x
	RBS	7,1	17,9	72,8	7,00	180,0	1,40
	RBM	7,1	18,0	74,0	6,90	175,0	x
	RBF	6,9	18,2	73,6	7,00	178,0	x
CONAMA 357/2005 (Classe II)		6,0-9,0	-	-	>5 mg L^{-1}	-	-
COPAM/CERH-MG n ^o 1 (2008)		6,0-9,0	-	-	>5 mg L^{-1}	-	-

- não possui limite

x = não detectado/avaliado

5.3.1.2 Material em suspensão total, orgânico e inorgânico

Os valores de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico e inorgânico, em amostras de água procedentes dos pontos de amostragem verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan, durante os meses de amostragem avaliados, estão representados na Figura 16.

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de material em suspensão total variaram de $1,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jul/09) a $7,80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jan/09). Para os verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de material em suspensão total variaram de $3,70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, out/08) a $8,60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, abr/09).

A variação vertical na coluna de água dos valores de material em suspensão orgânico do RA variaram de $0,70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, out/08) a $3,90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jan/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F) os valores de material em suspensão orgânico variaram de $1,50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, out/08) a $4,50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, abr/09).

Para os pontos verticais no RA, os valores de material em suspensão inorgânico variaram abaixo do limite de detecção, ou seja, $0,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, out/08) a $4,50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, abr/09). Para os pontos verticais do RB, os valores de material em suspensão inorgânico variaram de $1,60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, out/08) a $5,11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jan/09).

A fração inorgânica do MST mostrou-se mais representativas no RA e a fração orgânica mostrou maior representatividade no RB. Provavelmente, a presenças de formas inorgânicas procedentes da liberação do efluente líquido tratado da Cava da Mina tenha influenciado a maior concentração de material em suspensão inorgânico por outro lado, no reservatório Bortolan a proximidade deste da cidade de Poços de Caldas e o recebimento de esgotos domésticos e industriais e combustíveis das embarcações contribuam para a maior parcela de material em suspensão orgânico.

* Maior transparência, sem 3xSecchi

** Não detectado

Figura 16 - Variação dos valores da concentração de material em suspensão total e suas frações de material em suspensão orgânico (MSO) e material em suspensão inorgânico (MSI) em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.3 Clorofila a

Os valores das concentrações de clorofila a em amostras de água procedentes dos pontos de amostragem verticais no RA e no RB, durante todos os meses de amostragem, estão representados na Figura 17.

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F) correspondentes à variação vertical na coluna de água do ponto P14, os valores de clorofila a variaram de $0,78 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09) a $5,32 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), que correspondem à variação vertical na coluna de água do RB, os valores de clorofila a variaram de $1,31 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, abr/09) a $24,66 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de clorofila a registrados em amostras de água procedentes dos diferentes pontos verticais avaliados. Os pontos P14M e P14F, localizados no reservatório das Antas, apresentaram valores de clorofila a

significativamente menores ($p < 0,05$), quando comparados ao ponto RB-S do reservatório Bortolan.

Os valores de concentração de clorofila a para os pontos referentes à coluna de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, os pontos de superfície (P14S e RB-S) sempre apresentaram valores mais elevados, quando comparados aos demais pontos da coluna de água o RB quando comparado ao RA, apresentou os maiores valores de clorofila a , mesmo na região mais profunda da represa.

Figura 17 - Variação dos valores da concentração de clorofila a em amostras de água dos pontos Verticais (P14S, P14M e P14F e RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.4 Carbono

As concentrações de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) para os pontos verticais referentes à coluna de água do ponto P14 (P14S, P14M e P14F) e do RB (RB-S, RB-M e RB-F), para os meses de amostragem de janeiro, abril e julho de 2009, estão representados nas Figuras 18a e 18b.

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), correspondentes à variação vertical na coluna de água do ponto P14, os valores de carbono orgânico total variaram de 0,54 mg . L⁻¹ (P14S, jul/09) a 46,3 mg . L⁻¹ (P14M, jan/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F) que correspondem à variação vertical na coluna de água do RB, os valores de carbono orgânico total variaram de 2,65 mg . L⁻¹ (RB-F, jul/09) a 39,3 mg . L⁻¹ (RB-F, jan/09).

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F) correspondentes à variação vertical na coluna de água do ponto P14, os valores de carbono orgânico dissolvido variaram de 1,14 mg . L⁻¹ (P14S, jul/09) a 2,38 mg . L⁻¹ (P14S, jan/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), que correspondem à variação vertical na coluna de água do RB, os valores de carbono orgânico dissolvido variaram de 1,81 mg . L⁻¹ (RB-S, abr/09) a 5,03 mg . L⁻¹ (RB-S, jul/09).

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F) correspondentes à variação vertical na coluna de água do ponto P14, os valores de carbono inorgânico dissolvido variaram de 0,68 mg . L⁻¹ (P14S, abr/09) a 1,76 mg . L⁻¹ (P14F, jan/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), que correspondem à variação vertical na coluna de água do RB, os valores de carbono inorgânico dissolvido variaram de 0,37 mg . L⁻¹ (RB-F, abr/09) a 1,99 mg . L⁻¹ (RB-F, jul/09).

Quando avaliada a coluna de água de ambos os reservatórios (RA-P14 e RB-RB), o RA apresentou os maiores valores de concentração de carbono orgânico total, para os meses de jan/09 e abr/09, quando comparado ao RB, ocorrendo acentuada diminuição dos valores de COT para o mês de jul/09. Para as frações dissolvidas de carbono (COD e CID), quando avaliada a coluna de água de ambos os reservatórios (RA-P14 e RB-RB), a coluna de água do reservatório Bortolan, em geral, apresentou as maiores concentrações de formas dissolvidas de carbono, quando comparada ao reservatório das Antas.

Comparando-se os resultados obtidos no RB para clorofila *a* (Figura 13) e carbono (Figura 14b), verificou-se que elevados valores de clorofila *a* estiveram acompanhados por elevados valores de carbono orgânico dissolvido, provavelmente devido ao metabolismo de produção primária da comunidade fitoplanctônica.

Figura 18a - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água da coluna vertical do reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 18b - Variação dos valores da concentração de carbono orgânico total (COT), carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono inorgânico dissolvido (CID) em amostras de água da coluna vertical do reservatório Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.5 Nutrientes

Nas Figuras 19a, 19b, 19c, 19d, 19e, 19f e 19g, estão apresentados os dados referentes às concentrações fósforo total, fosfato total dissolvido, fosfato inorgânico, nitrogênio total, nitrato, nitrito, amônio e silicato, em amostras de água provenientes dos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan.

5.3.1.5.1 Fósforo total, fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de fósforo total variaram de $3,10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14M, out/08) a $14,60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de fósforo total variaram de $15,95 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, out/08) a $39,20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fósforo total registrados em amostras de água procedentes dos diferentes pontos verticais avaliados. O ponto P14F, localizado no reservatório das Antas, apresentou valores de fósforo total significativamente menor ($p < 0,05$), quando comparado aos pontos verticais RB-S, RB-M e RB-F do reservatório Bortolan. Também foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fósforo total registrados no ponto P14M (valor médio = $9,63 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), em relação aos maiores valores de fósforo total registrados no ponto RB-S (valor médio = $26,99 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) e diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de fósforo total do ponto P14S (valor médio = $8,95 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), em relação aos maiores valores verificados no ponto RB-F (valor médio = $23,76 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de fosfato total dissolvido variaram de $0,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, out/08) a $3,00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09 e P14S, jul/09). Para os pontos verticais do RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de fosfato total dissolvido variaram de $2,60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, out/08) a $13,10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jul/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores de fosfato total dissolvido registrado em amostras de água procedentes dos diferentes pontos verticais avaliados. Os pontos P14S e P14M, localizados no reservatório das Antas, apresentaram valores de fosfato total dissolvido (valores médio = $1,6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1,12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente) significativamente

menores ($p < 0,05$), quando comparado ao ponto RB-F (valor médio = $7,61 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) localizado no RB.

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de fosfato inorgânico variaram de $0,20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14M, abr/09) a $0,75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de fosfato inorgânico variaram de $0,50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, RB-M e RB-F, out/08) a $4,45 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jan/09).

Figura 19a - Concentração de Fósforo total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 19b - Concentração de Fosfato Orgânico total dissolvido e Fosfato Inorgânico total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.5.2 Nitrogênio total, nitrato, nitrito e íon amônio

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de nitrogênio total variaram de 770,00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S e P14M, out/08 e P14F, jan/09) a 1190,00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jan/09 e P14F, abr/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de nitrogênio total variaram de 420,00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, out/08) a 910,00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S e RB-M, jan/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os maiores valores de nitrogênio total registrados em amostras de água procedentes do ponto P14F (valor médio = 997,5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), localizado no RA em relação aos menores valores de nitrogênio total registrados no ponto RB-F (valor médio = 645,5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), localizado no RB.

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de nitrato variaram de 24,65 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, out/08) a 200,70 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jul/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de nitrato variaram de 110,85 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, out/08) a 465,90 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jul/09).

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de nitrito variaram de $0,18 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, out/08) a $1,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, P14M e P14F, abr/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de nitrito variaram de $0,74 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, abr/09) a $3,15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jul/09).

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de íon amônio variaram de $0,55 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jul/09) a $48,40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de íon amônio variaram de $16,15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, abr/09) a $250,60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, out/08).

A contribuição do nitrogênio total, quando comparado às demais formas nitrogenadas (nitrato, nitrito e amônio), formas fosfatadas (fósforo total, fosfato dissolvido total e fosfato inorgânico) e a sílica, mostrou-se significativamente elevada no perfil vertical destes reservatórios.

A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) e a Deliberação COPAM/CERH-MG nº 1 (BRASIL, 2008) estabelecem limite de $10.000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para nitrato e de $1.000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para nitrito em corpos de água Classe II. Verificou-se que o valor de nitrato e de nitrito, obtido no presente estudo para o perfil vertical da coluna de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, estiveram dentro dos limites estabelecidos.

Figura 19c - Concentração de Nitrogênio total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F), e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F) nos meses de amostragem avaliados.

Figura 19d - Concentração de Nitrato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 19e - Concentração de Nitrito em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Figura 19f - Concentração de íon Amônio em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.5.3 Silicato

Para os pontos verticais no RA (P14S, P14M e P14F), os valores de silicato variaram de 1,30 mg . L⁻¹ (P14F, abr/09) a 2,20 mg . L⁻¹ (P14F, jan/09). Para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), os valores de silicato variaram de 1,80 mg . L⁻¹ (RB-F, out/08) a 4,35 mg . L⁻¹ (RB-S, abr/09). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) para os menores valores de silicato registrados em amostras de água procedentes do ponto P14F (valor médio = 1,62 mg.L⁻¹), localizado no RA, em relação aos maiores valores de silicato registrados no ponto RB-S (valor médio = 3,07 mg.L⁻¹), localizado no RB.

Figura 19g - Concentração de Silicato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.3.1.6 Dureza, sulfato, fluoreto, molibdênio, manganês, zinco, urânio, tório, ferro total e Metais totais (alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo)

A variação vertical dos valores de dureza, sulfato, fluoreto, manganês, zinco, urânio, tório e ferro total está representadas nas Figuras 20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f e 20g.

A variação vertical do elemento químico molibdênio e dos metais totais: alumínio, cádmio, cobalto, cromo, cobre e chumbo está apresentada na Tabela 9, uma vez que tais elementos foram analisados visando somente uma varredura para a caracterização da qualidade da água nos corpos de água, avaliados no presente estudo, bem como para contemplar a Resolução Conama 357/2005 que estipula os limites destes contaminantes para o enquadramento de águas continentais.

A variação vertical dos valores de dureza para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de 6,41 mg.L⁻¹ (P14S, jan/09) a 251,500 mg.L⁻¹ (P14F, out/08). A variação vertical dos valores de

dureza para o ponto RB-S, RB-M e RB-F, foi de $16,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, abr/09; RB-M, abr/09 e RB-F, jan/09) a $24,9 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-M, out/08).

A variação vertical dos valores de sulfato para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $29,400 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, abr/09) a $287,800 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14F, out/08). A variação vertical dos valores de sulfato para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, jul/09) a $27,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-M, out/08).

Já a variação vertical dos valores de fluoreto para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $<0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, P14M e P14F, jan/09) a $2,720 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14M, out/08). A vertical dos valores de fluoreto para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, não foi verificada variação, sendo todos os valores registrados $< 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Comparando-se os reservatórios, especialmente, foi observado que os maiores valores de dureza, sulfato e fluoreto se concentraram no RA e os menores no reservatório Bortolan, especialmente no mês de out/08.

Frente à resolução Conama 357/05 (BRASIL, 2005) e a deliberação normativa Copam (BRASIL, 2008), que preveem limites para sulfato de 250 mg.L^{-1} e para fluoreto de $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ para corpos de água Classe II, tanto o RA quanto para o RB, foram verificados valores de fluoreto acima dos limites previstos. Por outro lado, para o sulfato somente o RA apresentou valores acima do limite permitido.

A variação vertical dos valores de manganês para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $0,51 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, jul/09) a $1,705 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14M, abr/09). A variação vertical dos valores de manganês para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $0,028 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-F, out/08) a $0,46 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-F, jul/09). Frente à resolução Conama e a deliberação normativa Copam que preveem limites para manganês de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, todos os valores de manganês registrados encontraram-se acima dos limites máximos permitidos por tais normas para os reservatórios das Antas e Bortolan, com exceção do ponto RB-F em out/08.

Já a variação vertical dos valores de zinco para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, P14M e P14F, out/08) a $0,1205 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14F, abr/09). Para os valores de zinco para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, RB-M e RB-F, out/08, jan/09 e jul/09) a $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-F, abr/09). Para os reservatórios das Antas e Bortolan, os valores do metal zinco estiveram abaixo dos limites previstos para água de Classe II, frente à resolução Conama 357/2005 ($0,18 \text{ mg.L}^{-1}$) e segundo a deliberação normativa Copam 1998 ($0,18 \text{ mg.L}^{-1}$).

Por outro lado, a variação vertical dos valores de urânio para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), mantiveram-se $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ com exceção dos pontos P14M, abr/09 ($0,012 \text{ mg.L}^{-1}$); P14F, out/08 ($0,07 \text{ mg.L}^{-1}$) e P14F, abr/09 ($0,014 \text{ mg.L}^{-1}$). De acordo com o Ofício Cnen (BRASIL, 1997), os limites permitidos de urânio para lançamento pela mineradora UTM/INB no ponto P41 e a jusante deste, ou seja, ponto P14 é de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$, somente para o mês de out/08 foi verificado valor acima do limite previsto. Para a variação vertical dos valores de urânio para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, mantiveram-se $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ com exceção dos pontos RB-M, out/08 ($0,052 \text{ mg.L}^{-1}$) e RB-F, out/08 ($0,062 \text{ mg.L}^{-1}$). A resolução Conama e a deliberação normativa Copam preveem limites para urânio de $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$.

Em relação a variação vertical dos valores de tório para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), mantiveram-se $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ com exceção do ponto P14F, out/08 ($0,07 \text{ mg.L}^{-1}$). Para a variação vertical dos valores de tório para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, mantiveram-se $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ em todos os meses de coleta avaliados.

A variação vertical dos valores de ferro total para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $<0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, jul/09) a $1,09 \text{ mg.L}^{-1}$ (P14S, jan/09). Para a variação vertical dos valores de ferro total para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-S, out/08) a $0,73 \text{ mg.L}^{-1}$ (RB-F, abr/09). Frente à resolução Conama e a deliberação normativa Copam, que preveem limites para ferro total de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, ambos os reservatórios apresentaram valores de ferro total acima dos limites máximos permitidos por tais normas.

Figura 20a - Concentração dos valores de Dureza em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20b - Concentração dos valores de Sulfato em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20c - Concentração dos valores de Fluoreto em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20d - Concentração dos valores de Manganês em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20e - Concentração dos valores de Zinco em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20f - Concentração dos valores de Urânio e Tório em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Figura 20g - Concentração dos valores de Ferro total em amostras de água dos pontos verticais da coluna de água dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

Os valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo), bem como dos metais totais: alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos Verticais do RA (P14S, P14M e P14F) e do RB (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados, estão representados na Tabela 9.

Em relação à variação vertical dos valores de molibdênio para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), estes mantiveram-se $<0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, com exceção dos pontos P14S, abr/09 ($0,106 \text{ mg.L}^{-1}$) e P14F, abr/09 ($0,117 \text{ mg.L}^{-1}$). Para a variação vertical dos valores de molibdênio para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, mantiveram-se $<0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, com exceção dos pontos RB-S, out/08 ($0,125 \text{ mg.L}^{-1}$) e abr/09 ($0,123 \text{ mg.L}^{-1}$); RB-M, abr/09 ($0,088 \text{ mg.L}^{-1}$) e RB-F, out/08 ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$).

Os valores referentes à caracterização química dos metais totais foram realizados para os meses de jan/09 (estação quente e chuvosa) e jul/09 (estação fria e seca), sendo evidenciados valores acima dos limites estabelecidos pelas legislações vigentes para água de Classe II (CONAMA 357/2005 e COPAM 2008) somente para o metal alumínio (limite = $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) no RA e no RB.

Tabela 9 - Valores das concentrações do elemento químico molibdênio (Mo) e dos metais alumínio (Al), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu) e chumbo (Pb) nos pontos verticais do RA (P14S, P14M e P14F) e do RB (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

Meses	Pontos	(mg . L ⁻¹)						
		Mo	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Pb
Out/08	P14S	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	P14S	<0,05	2,22	0,0007	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,0015
Abr/09	P14S	0,106	x	x	x	x	x	x
Jul/09	P14S	<0,05	1,12	0,0007	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,001
Out/08	P14M	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	P14M	<0,05	2,01	0,001	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,001
Abr/09	P14M	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jul/09	P14M	x	1,07	0,001	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,001
Out/08	P14F	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	P14F	<0,05	2,33	0,0013	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,001
Abr/09	P14F	0,117	x	x	x	x	x	x
Jul/09	P14F	<0,05	1,17	0,0013	< 0,025	< 0,025	< 0,002	0,001
Out/08	RB-S	0,125	x	x	x	x	x	x
Jan/09	RB-S	<0,05	1,80	<0,0001	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,001
Abr/09	RB-S	0,123	x	x	x	x	x	x
Jul/09	RB-S	<0,05	0,75	<0,0005	< 0,025	0,03	< 0,002	0,001
Out/08	RB-M	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jan/09	RB-M	<0,05	1,66	<0,0001	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,00075
Abr/09	RB-M	0,088	x	x	x	x	x	x
Jul/09	RB-M	<0,05	0,85	<0,0005	< 0,025	0,045	< 0,002	0,0008
Out/08	RB-F	0,08	x	x	x	x	x	x
Jan/09	RB-F	<0,05	2,65	<0,0001	< 0,025	< 0,02	< 0,02	0,00125
Abr/09	RB-F	<0,05	x	x	x	x	x	x
Jul/09	RB-F	<0,05	1,33	<0,0005	< 0,025	0,048	< 0,002	0,0013
CONAMA 357/2005 Classe II		-	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,01
COPAM/CERH-MG n°1 (2008)		-	0,1	0,001	0,05	0,05	0,009	0,01

- não possui limite

x = não detectado/avaliado

< = abaixo do limite de detecção do método

5.3.2 Variáveis biológicas no perfil vertical

5.3.2.1 Composição taxonômica da comunidade de protozoários planctônicos na coluna de água dos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan

A composição taxonômica dos gêneros de protozoários planctônicos, identificados no presente estudo, para os reservatórios das Antas e Bortolan, no perfil vertical dos pontos P14 e RB, bem como as informações sobre seus tipos nutricionais, distribuição ao longo do perfil vertical da coluna de água em cada corpo de água avaliado e a classificação das espécies de protozoários em: raras, acessórias ou constantes, de acordo com o índice de Constância de Dájoz, estão apresentados nas Tabelas 10a e 10b.

As informações adicionais sobre a classificação taxonômica da comunidade protozooplanctônica registradas neste estudo encontram-se no ANEXO B.

A partir das análises qualitativas da comunidade protozooplanctônica, foram identificados o total de 25 gêneros de protozoários. Deste total, somente 12 gêneros ocorreram no perfil vertical do reservatório das Antas e 15 gêneros no perfil vertical do reservatório Bortolan, como mostram as Tabelas 10a e 10B.

Dentre os gêneros identificados, o Filo Ciliophora (ANEXO B) foi o mais representativo em ambos os reservatórios. No reservatório das Antas, todos os protozoários pertenciam ao Filo Ciliophora, por outro lado, para o reservatório Bortolan, foi detectada a presença de um representante do Filo Amoebozoa (*Arcella* sp.), Tabela 14b.

Em relação aos tipos nutricionais, ou seja, fontes de alimento preferenciais dos protozoários identificados no perfil vertical do reservatório das Antas o tipo nutricional predominante foi o omnívoro, compreendendo os gêneros de protozoários *Codonella*, *Cratera*, *Enchelys* sp., *Holophrya* sp., *Lagynus* sp., *Mesodinium* sp., *Paradileptus elephantynus* e *Tintinnidium* sp.; seguido dos bac/alg, sendo representados pelos gêneros de protozoários *Campanella umbellaria* e *Vorticella* sp.

Para o reservatório Bortolan, no perfil vertical, o tipo nutricional predominante também foi o omnívoro, representado pelos gêneros de protozoários *Codonella*, *Cratera*, *Enchelys* sp., *Holophrya* sp., *Paradileptus elephantynus* e *Tintinnidium* sp.; seguido dos bac/alg, representados pelos gêneros de protozoários *Campanella umbellaria* e *Vorticella* sp.

Provavelmente, a versatilidade e ampla diversidade de fontes de alimentos utilizada pelos omnívoros sejam um dos fatores do sucesso de sua ocorrência e permanência no meio

ambiente, adaptando-se, facilmente, às fontes de alimento disponíveis em que cada momento.

Verificou-se que a frequência de ocorrência (dada pelo índice de constância de Dájoz - ICD) dos táxons pertencentes à comunidade protozooplanctônica, nos pontos verticais do reservatório das Antas, apresentaram 6 gêneros constantes, ocorrendo em mais de 50% das amostras (*Campanella umbellaria*, *Enchelys* sp., *Mesodinium* sp., *Strombidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.), 1 gênero acessório, ocorrendo entre 25% e 50% (*Askenásia* sp.) e, 5 gêneros raros (*Codonella cratera*, *Holophrya* sp., *Lagynus* sp., *Paradileptus elephatinus* e *Tintinnidium* sp.) ocorrendo em menos de 25% do total.

Para o reservatório Bortolan, a frequência de ocorrência (dada pelo índice de constância de Dájoz - ICD) dos táxons pertencentes à comunidade protozooplanctônica, nos pontos verticais, apresentou 9 gêneros constantes, ocorrendo em mais de 50% das amostras (*Campanella umbellaria*, *Codonella cratera*, *Enchelys* sp., *Stokésia vernalis*, *Strobilidium* sp., *Strombidium* sp., *Tintinnidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.); 2 gêneros acessórios, ocorrendo entre 25% e 50% (*Holophrya* sp. e *Monodinium balbiani*) e 4 gêneros raros (*Arcella* sp., *Askenásia* sp., *Paradileptus elephantinus* e Sp. 9), ocorrendo em menos de 25% do total.

Comparando-se a distribuição dos protozoários planctônicos, ao longo do perfil vertical da coluna de água do reservatório das Antas e Bortolan verificou-se que o reservatório Bortolan apresentou uma distribuição espacial mais homogênea ao longo dos perfis de superfície, meio e fundo, quando comparada à distribuição espacial dos protozoários do reservatório das Antas, como mostram as Tabelas 10a e 10b.

No RB, para os meses de abr/09 e jul/09, foram registrados os maiores números de espécies protozooplanctônicas, independente da profundidade de amostragem realizada na água.

Tabela 10a - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos Verticais do reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 11.

Gêneros	Nutricional	P14S				P14M			P14F				*(%)	ICD
		OUT/08	JAN/09	ABR/09	JUL/09	OUT/08	JAN/09	ABR/09	OUT/08	JAN/09	ABR/09	JUL/09		
<i>Actinosphaerum</i> sp.	PROT/BAC												0	x
* <i>Arcella</i> sp.	BAC												0	x
<i>Ameba</i> sp. (Sp. 25)	O												0	x
<i>Askenásia</i> sp.	ALG/KI	x	x				x			X			36	A
<i>Campanella umbelaria</i>	BAC/ALG	x	x	x		x	x	x	x		x		73	C
<i>Codonella cratera</i>	O											x	9	R
<i>Enchelys</i> sp.	O	x	x	x		x	x	x	x	X	x		82	C
<i>Holophrya</i> sp.	O				x								9	R
<i>Holophrya</i> ou <i>prorodon</i>	#												0	x
<i>Lagynus</i> sp.	O											x	9	R
<i>Mesodinium</i> sp.	O	x	x	x	x		x	x		X	x		73	C
<i>Monodinium balbiani</i>	R												0	x
<i>Mycterothrix erlangeri</i>	#												0	x
<i>Paradileptus elephantynus</i>	O		x	x									18	R
<i>Paramecium</i> sp.	BAC/ALG/FUN												0	x
<i>Sphaerastrum</i> sp.	PROT/BAC												0	x
<i>Stokesia vernalis</i>	MIX/O												0	x
<i>Strobilidium</i> sp.	ALG												0	x
<i>Strombidium</i> sp.	KI/ALG/BAC	x	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	100	C
*Sp. 9	#												0	x
* <i>Tecameba</i> (castanha)	BAC/FLAG/CIL												0	x
* <i>Tecameba</i> (<i>diffugia</i> / <i>netzelia</i>)	BAC/FLAG/CIL												0	x
* <i>Tecameba</i> (Sp. 33)	BAC/FLAG/CIL												0	x
<i>Tintinnidium</i> sp.	O				x							x	18	R
<i>Urotricha</i> sp.	BAC/FLAG		x	x			x	x		X	x		55	C
<i>Vorticella</i> sp.	BAC/ALG	x		x		x		x	x		x		55	C

sem informação; * protozoários sem a confirmação da identificação; X ausente; *% frequência de ocorrência; ICD = Classificação de acordo com o Índice de Constancia de Dajóz.

Tabela 10b - Composição Taxonômica, Tipo Nutricional, Frequência de Ocorrência e Classificação (ICD) em raras (R), acessórias (A) e constantes (C) da Comunidade de Protozoários Planctônicos registrados nos pontos Verticais do reservatório Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de out/08, jan, abr e jul de 2009. N = 12.

Gêneros	Nutricional	RB-S				RB-M				RB-F				* (%)	ICD
		OUT/08	JAN/09	ABR/09	JUL/09	OUT/08	JAN/09	ABR/09	JUL/09	OUT/08	JAN/09	ABR/09	JUL/09		
<i>Actinosphaerum</i> sp.	PROT/BAC													0	X
* <i>Arcella</i> sp.	BAC			x										8	R
<i>Ameba</i> sp. (Sp. 25)	O													0	X
<i>Askenásia</i> sp.	ALG/KI	x				x				x				25	R
<i>Campanella umbelaria</i>	BAC/ALG	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	92	C
<i>Codonella cratera</i>	O			x	x			x	x			x	x	50	C
<i>Enchelys</i> sp	O	x	x	x			x	x		x	x	x	x	75	C
<i>Holophrya</i> sp.	O			x	x			x	x			x		42	A
<i>Holophrya</i> ou <i>prorodon</i>	#													0	X
<i>Lagynus</i> sp.	O													0	X
<i>Mesodinium</i> sp.	O													0	X
<i>Monodinium balbiani</i>	R		x		x				x				x	33	A
<i>Mycterothrix erlangeri</i>	#													0	X
<i>Paradileptus elephantynus</i>	O	x				x				x				25	R
<i>Paramecium</i> sp.	BAC/ALG/FUN													0	X
<i>Sphaerastrum</i> sp.	PROT/BAC													0	X
<i>Stokesia vernalis</i>	MIX/O			x	x			x	x			x	x	50	C
<i>Strobilidium</i> sp	ALG			x	x			x	x			x	x	50	C
<i>Strombidium</i> sp.	KI/ALG/BAC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	100	C
*Sp. 9	#								x					8	R
* <i>Tecameba</i> (castanha)	BAC/FLAG/CIL													0	X
* <i>Tecameba</i> (<i>diffflugia/netzelia</i>)	BAC/FLAG/CIL													0	X
* <i>Tecameba</i> (Sp. 33)	BAC/FLAG/CIL													0	X
<i>Tintinnidium</i> sp.	O			x	x			x	x			x	x	50	C
<i>Urotricha</i> sp.	BAC/FLAG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	100	C
<i>Vorticella</i> sp.	BAC/ALG	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	92	C

sem informação; * protozoários sem a confirmação da identificação; X ausente; *% frequência de ocorrência; ICD = Classificação de acordo com o Índice de Constancia de Dajóz.

5.3.2.2 Distribuição espacial e temporal do protozooplâncton, do bacterioplâncton e da biomassa fitoplanctônica, nos pontos verticais dos reservatórios das Antas e Bortolan

Os valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton para o perfil vertical dos pontos de amostragem dos reservatórios das Antas e Bortolan, nos meses de coleta avaliados, estão representados na Figura 21.

De acordo com os resultados obtidos para os valores de densidade dos protozoários planctônicos observados em amostras de água procedentes do perfil vertical do RA ou seja, no ponto P14, o menor valor foi de $0,44 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09) e o maior valor foi de $3 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, jan/09). Para o RB, o menor valor foi de $0,90 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jan/09) e o maior foi de $25 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, abr/09).

O valor médio de densidade de protozoários encontrado em amostras de água procedentes do ponto RB-S ($11 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$) foi significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparado aos valores médios de densidade protozooplanctônica registrados nos pontos verticais do RA (P14S: $1 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$, P14M: $1 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ e P14F: $1 \times 10^4 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$).

De acordo com os resultados obtidos para o bacterioplâncton observados em amostras de água procedentes do perfil vertical, os valores de densidade para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F), variaram de $0,05 \times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09) a $0,95 \times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (P14M, jan/09). Para o perfil vertical dos valores de densidade de bactérias para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, houve variação de $0,61 \times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, abr/09) a $1 \times 10^9 \text{ ind} \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, out/08).

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de densidade do protozooplâncton no RA, verificou-se que, em geral, os maiores valores de densidade ocorreram na superfície (P14S) e, ao longo dos meses de amostragem avaliados, o mês de out/08 apresentou os maiores valores ao longo dos pontos de amostragem (P14S, P14M e P14F), seguido do mês de jan/09.

Verificou-se que, em geral, a distribuição espacial e temporal dos valores de densidade do bacterioplâncton no RA os maiores valores de densidade ocorreram na superfície (P14S), nos meses de out/08 e jan/09, porém sendo verificada pequena amplitude de variação em relação ao ponto P14M e P14F. O mês de jan/09 apresentou os maiores valores de densidade bacteriana, ao longo dos pontos de amostragem P14S, P14M e P14, seguido do mês de out/08.

Quando analisada a distribuição temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton, concomitantemente, para o RA, verificou-se que, em geral, com o aumento do número de protozoários (densidade), houve diminuição no número de células bacteriana. Relações de presa/predador poderiam explicar tal padrão, ou fatores, como qualidade química da água neste local.

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de densidade do protozooplâncton no RB, verificou-se que, em geral, os maiores valores de densidade ocorreram comparativamente na superfície (RB-S). Ao longo dos meses de amostragem avaliados, o mês de abr/09 apresentou o maior valor de densidade protozooplanctônica (RB-S, RB-M e RB-F), seguido dos valores registrados no mês de jul/09 (RB-S e RB-M).

O mês de out/08 apresentou os maiores valores de densidade do bacterioplâncton, ao longo dos pontos de amostragem (RB-M e RB-F), seguido do mês de jul/09 (RB-S).

Em geral, no perfil vertical do reservatório Bortolan, foram verificados maiores valores de densidade tanto para o protozooplâncton quanto para o bacterioplâncton, ao longo de todo o período de estudo avaliado.

No reservatório das Antas, foi verificado que a presença de maiores números de protozoários ocasionou uma diminuição na densidade bacteriana, evidenciando uma relação do tipo top-down dos protozoários sobre as bactérias, bem como maior competitividade entre outros predadores do bacterioplâncton.

Figura 21 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de densidade do protozooplâncton e do bacterioplâncton ao longo dos pontos de coleta verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem.

Os valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton para o perfil vertical dos pontos de amostragem dos reservatórios das Antas e Bortolan, nos meses de coleta avaliados, estão representados na Figura 22.

De acordo com os resultados obtidos, a variação para os valores de biomassa do protozooplâncton nos pontos de verticais para o P14 (P14S, P14M e P14F), foi de $0,1055 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, jan/09) a $6,4733 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09). A variação vertical dos valores de biomassa de protozoários para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $0,4100 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, jan/09) a $16.852,6177 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-M, jul/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o valor médio de biomassa protozooplanctônica registrada no ponto RB-S ($16,323 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$), localizado no RB, em relação ao menor valor de biomassa protozooplanctônica registrado no ponto P14F (valor médio = $0,752 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$), localizado no RA.

A variação vertical dos valores de biomassa fitoplanctônica para o ponto P14 (P14S, P14M e P14F) foi de $0,1675 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (P14F, out/08) a $3,5644 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (P14S, abr/09). Já os valores de biomassa do fitoplâncton para os pontos RB-S, RB-M e RB-F, foi de $0,8777 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-F, abr/09) a $16,5222 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$ (RB-S, jul/09).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o valor médio de biomassa fitoplanctônica registrado no ponto RB-S (valor médio = $7,788 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$) em relação ao menor valor de biomassa fitoplanctônica registrado no ponto P14M (valor médio = $0,703 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$) e P14F (valor médio = $0,492 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$) localizado no RA.

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton no RA, verificou-se que, em geral, os maiores valores de biomassa ocorreram na superfície (P14S) e ao longo dos meses de amostragem avaliados, o mês de out/08 apresentou os maiores valores de biomassa do protozooplâncton, ao longo dos pontos de amostragem (P14S, P14M e P14F), seguido do mês de abr/09.

Para a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa fitoplanctônica no RA, verificou-se que, em geral, os maiores valores de biomassa fitoplanctônica ocorreram na superfície (P14S). O mês de abr/09 apresentou os maiores valores de biomassa fitoplanctônica, ao longo dos pontos de amostragem (P14S, P14M e P14F).

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e de biomassa fitoplanctônica, concomitantemente, para o RA, verificou-se que maiores valores de biomassa fitoplanctônica favoreceram maiores valores de biomassa protozooplanctônica, ou seja, a maior disponibilidade de fontes de alimento de origem algal provavelmente influenciou o crescimento dos protozoários.

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton no RB, verificou-se que, em geral, os maiores valores de biomassa protozooplanctônica ocorreram na superfície (RB-S), exceto no ponto RB-M (jul/09) e, ao longo dos meses de amostragem avaliados, os meses de abr/09 e jul/09 apresentaram os dois maiores valores de biomassa protozooplanctônica, ao longo dos pontos de amostragem (RB-S, RB-M e RB-F).

Para a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa fitoplanctônica no RB, verificou-se que, em geral, os maiores valores de biomassa ocorreram na superfície, no ponto RB-S. O mês de jul/09 apresentou o maior valor de biomassa fitoplanctônica, ao longo dos pontos de amostragem (RB-S), seguido do mês de out/08 (RB-S).

Quando analisada a distribuição espacial e temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e de biomassa fitoplanctônica, concomitantemente, para o RB, verificou-se que, para os meses de out/08 e jan/09, os maiores valores de biomassa protozooplanctônica ocorreram juntamente com os maiores valores de biomassa algal. Relação onde a maior disponibilidade de alimento favoreceria o aumento do número de indivíduos do protozooplâncton.

Por outro lado, tal padrão foi modificado para o mês de jul/09 no RB, quando o maior valor de biomassa protozooplanctônica registrado não foi acompanhado do maior valor de biomassa fitoplanctônica.

Em geral, no perfil vertical do reservatório Bortolan, foram verificados maiores valores de biomassa tanto para o protozooplâncton quanto para o fitoplâncton, ao longo de todo o período de estudo avaliado, comparado aos resultados obtidos no RA.

Figura 22 - Distribuição Espacial e Temporal dos valores de biomassa do protozooplâncton e do fitoplâncton ao longo dos pontos de coleta Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem.

5.3.2.3 Relações das variáveis abióticas e bióticas, sazonal e espacialmente, ao longo dos pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F)

A Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada, utilizando-se os valores das variáveis físicas e químicas: MST, clorofila α , P total, OD, pH, N Total, condutividade elétrica da água, sulfato, manganês, zinco e urânio, bem como os valores de densidade total de protozoários (DTProto), biomassa total de protozoários (BTProto), estimativa de biomassa fitoplanctônica (BIOFITO) e densidade total bacteriana (DTBac) permitiu a extração e interpretação de dois eixos fatoriais que explicaram 62,3% da variação dos resultados. O eixo 1 explicou 41,7% enquanto o eixo 2 explicou 20,6%.

O eixo 1 representou a relação negativa entre as variáveis OD, DTBac, BTProto, BIOFITO e clorofila α , com extrema coordenada positiva formada por sulfato e condutividade elétrica da água e com coordenadas negativas formadas por manganês e N Total. O eixo 2 foi formado pelas coordenadas positivas das variáveis urânio e pH acima e negativas das variáveis zinco e MST abaixo (Figura 23).

Figura 23 - Diagrama representativo dos eixos fatoriais 1 e 2 extraídos a partir da Análise de Componentes Principais aplicado sobre os resultados verticais.

De acordo com a disposição dos pontos de amostragem no perfil vertical (P14S, P14M, P14F, RB-S, RB-M e RB-F) que representaram os ambientes aquáticos: reservatório das Antas e reservatório Bortolan foi verificada a distinção entre estes dois corpos de água. Uma vez que os pontos P14S, P14M e P14F localizaram-se na extremidade esquerda do gráfico e os pontos RB-S, RB-M e RB-F, na extremidade direita do gráfico. Sendo assim, pode-se inferir que o perfil vertical da coluna d'água do RA possui características totalmente distintas do RB comprovando que o RA possui maiores das variáveis químicas, menores valores para as variáveis bióticas, em geral, e menores de pH da água, possuindo pior qualidade da água.

O RB, por outro lado, possui maiores valores de matéria orgânica, clorofila *a*, nutrientes (fósforo) e bióticas (BTProto, DTBac, BIOFITO, DTProto), bem como melhor qualidade química da água, apresentando correlação totalmente negativa em relação às variáveis químicas avaliadas.

Sazonalmente, tanto para o RA quanto para o RB, houve distinção entre os meses de amostragem avaliados, quando os meses de out/08 e jul/09 localizaram-se ao longo do eixo 2 nos quadrantes esquerdo e direito, na parte superior do gráfico de PCA e os meses de jan/09 e abr/09, ao longo do eixo 2 nos quadrantes esquerdo e direito (positivo e negativo, respectivamente), na parte inferior do gráfico de PCA. Em geral, nos meses de out/08 e jul/09 foram verificados os maiores valores para as variáveis químicas avaliadas. Provavelmente o início das primeiras chuvas em out/08 levou à ressuspensão do material depositado no sedimento e por outro lado, no mês de jul/09, a menor precipitação pode ter levado à concentração dos elementos na coluna d'água.

Espacialmente, verificou-se homogeneidade nos pontos do RA entre si e entre os pontos do RB também, pois todas as profundidades da coluna d'água avaliadas (superfície, meio e fundo) estiveram distribuídas ao longo dos 4 quadrantes, quando avaliada a disposição das setas no gráfico de PCA.

Os valores de BTProto, DTBac, BIOFITO e DTProto estiveram positivamente correlacionados ao RB e ao eixo 1 e negativamente correlacionados ao RA, evidenciando o efeito negativo dos elevados valores de concentração de espécies químicas sobre a microbiota no RA.

5.4 Índices

5.4.1 Perfil longitudinal

5.4.1.1 Índice de estado trófico

Os valores do Índice de Estado Trófico para os pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) estão apresentados na Figura 24. O índice foi determinado a partir da fórmula da média ponderada dos valores das concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido total e clorofila *a* (TOLEDO et al., 1983).

O ponto CM, de acordo com o índice de estado trófico foi classificado como Oligotrófico para o mês de out/08 e como Eutrófico para os meses de janeiro, abril e julho de 2009.

Para o reservatório das Antas, os pontos Cab, P41 e P14S foram classificados como Oligotróficos ao longo de todos os meses de coleta avaliados. Para o ponto RB-S do reservatório Bortolan, foi classificado como Mesotrófico ao longo dos meses de out/08, jan/09 e abr/09 e como Eutrófico para o mês de jul/09.

Espacialmente, ao longo dos pontos de amostragem de superfície, avaliando-se o perfil longitudinal dos pontos CM, Cab, P41, P14S e RB-S, o grau de trofia tendeu decrescer, a partir do ponto CM, em direção aos pontos Cab e P41 localizados no RA e elevaram-se, novamente, a partir do ponto P14S (RA), alcançado o maior grau de trofia no ponto RB-S, localizado no reservatório Bortolan.

Sazonalmente, o mês de jul/09 (CM e RB) apresentou, em geral, os maiores valores para o índice de estado trófico sendo um período caracterizado por menor índice pluviométrico, levando a uma maior concentração de nutrientes na água. Provavelmente, tal fato possa ser um dos fatores responsáveis pelo aumento do grau de trofia neste mês.

Figura 24 - Índice de estado trófico calculado pelas concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila *a* em amostras de água dos pontos de Superfícies (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

5.4.1.2 Índice de saprobidade

Os valores de índice de saprobidade, calculado com base nos gêneros de protozoários, identificados neste estudo, segundo Foissner (1992) estão apresentados na Figura 25.

De acordo com o Índice de Saprobiidade, os pontos CM, Cab, P41 e P14S foram classificados como Beta-mesosapróbicos, ao longo de todos os meses de amostragem avaliados, ou seja, local onde a decomposição dos produtos se aproxima da mineralização e o déficit de oxigênio é pequeno; há uma melhor variedade de protistas; plantas e animais ocorrem em números consideráveis, são corpos de água moderadamente poluídos em relação a fontes de origem orgânica e com qualidade da água Classe II (Foissner, 1992). Tais resultados corroboraram com a classificação, segundo o Conama 357/05.

Por outro lado, para os meses de out/08 e jan/09, o ponto RB-S foi classificado como Alfa-mesosapróbico (local onde o oxigênio está presente e a mineralização está se iniciando, mais espécies estão presentes e bactérias e protistas são dominantes, são corpos de água

considerados mais poluídos organicamente e com qualidade de água Classe III). Em abr/09 e jul/09, o RB-S foi classificado como Beta-mesosapróbico assim como o CM, Cab, P41 e P14S.

Provavelmente, o maior aporte de substâncias provenientes de fontes orgânicas alóctones e autóctones tenha contribuído para a elevação do índice de saprobidade e da classificação sapróbica do ponto RB-S do reservatório Bortolan, nestes meses de coleta avaliados. Uma vez que em outubro de 2008, iniciou-se o período de chuvas, ocorrendo o maior carregamento de solo, maior turbulência na coluna da água, remoção e ressuspensão do sedimento para a coluna de água, maior intensidade luminosa e floração de algas contribuindo para a maior ocorrência de organismos, como os protozoários.

Espacialmente, o ponto CM apresentou os menores valores de índice de saprobidade, quando comparado aos demais pontos de Superfície. Sazonalmente, o mês de jan/09 apresentou os maiores valores de índice de saprobidade, período qque se caracteriza por maiores índices pluviométricos, elevadas temperaturas, florações de águas e maior atividade metabólica microbiana.

Figura 25 - Índice de Saprobiidade de Pantle e Buck calculado a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados neste estudo, nos pontos de coleta de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

5.4.1.3 Índice de diversidade

Os valores de índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), obtidos a partir dos valores de biomassa protozooplanctônica (Odum, 1985) para os pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S) estão representados na Figura 26.

De acordo com os resultados obtidos no ponto CM, a menor diversidade protozooplanctônica ocorreu no mês de abr/09 ($H' = 0,245$) e a maior no mês de jul/09 ($H' = 0,426$).

Para os valores de índice de diversidade do protozooplâncton nos pontos de superfície localizados no RA (Cab, P41 e P14S), a menor diversidade ocorreu no mês de jul/09 no ponto Cab ($H' = 0,000$) quando ocorreu somente o protozoário ciliado *Strombidium* sp.. e, a maior no mês jan/09 no ponto P41 ($H' = 0,711$; *Campanella umbellaria*, *Enchelys* sp., *Monodinium balbiani*, *Paradileptus elephantinus*, *Paramecium* sp., *Strombidium* sp. e *Urotricha* sp.).

Para o ponto de Superfície do RB, ou seja, ponto RB-S, a menor diversidade ocorreu no mês de jan/09 ($H' = 0,236$; *Campanella umbellaria*, *Enchelys* sp., *Monodinium balbiani*, *Strombidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.) e a maior no mês de jul/09 ($H' = 0,719$; *Codonella cratera*, *Holophrya* sp., *Monodinium balbiani*, *Stokésia vernalis*, *Strobilidium* sp., *Strombidium* sp., *Tintinnidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.).

Espacialmente, em geral, a menor diversidade de organismos protozooplanctônicos foi verificada no ponto CM, quando comparado aos demais pontos de Superfície. O ponto CM é caracterizado por um corpo de água com qualidade química da água diferenciada devido á presença de elementos químicos dissolvidos e elevadas concentrações de radionuclídeos, em um meio líquido, com baixos valores de pH e elevados valores de condutividade elétrica da água.

Sazonalmente, em relação aos reservatórios (RA e RB), o mês de out/08 apresentou a menor diversidade de organismos protozooplanctônicos. Neste mesmo mês, foram detectados valores de elementos químicos, avaliados neste estudo (ex: fluoreto, molibdênio e manganês) acima dos limites previstos pela legislação vigente para água de Classe II, bem como o menor índice pluviométrico e, conseqüentemente, a possibilidade maior concentração de elementos químicos na água. Tais fatores podem ter influenciado a menor diversidade de espécimes protozooplanctônicas neste mês.

Figura 26 - Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H'), calculados a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados, nos pontos de Superfície (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), nos meses de amostragem avaliados.

5.4.2 Perfil vertical

5.4.2.1 Índice de estado trófico

Os valores do Índice de Estado Trófico para os pontos Verticais do reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F) e reservatório Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F) estão apresentados na Figura 27. O índice foi determinado a partir da fórmula da média ponderada dos valores das concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido total e clorofila a (Toledo, ano).

Para o perfil vertical do reservatório das Antas, os pontos P14S, P14M e P14F foram classificados como Oligotróficos, ao longo de todos os meses de coleta avaliados.

Especialmente, o ponto P14S apresentou maiores valores de estado trófico, quando comparado aos pontos mais profundos (P14M e P14F). Sazonalmente, o mês de abr/09 apresentou o maior grau de trofia, quando comparado aos demais meses de amostragem no RA.

Para o perfil vertical do reservatório Bortolan, o ponto RB-S foi classificado como Mesotrófico (IET = 45,9) para o mês de out/08, como Oligotrófico para jan/09 (IET = 44,0) e

abr/09 (IET = 44,2) e como Eutrófico para o mês de jul/09 (IET = 98,0). O ponto RB-M foi classificado como Oligotrófico para os meses de out/08 e jan/09, como Mesotrófico para abr/09 e como Eutrófico para jul/09. Por outro lado, o ponto RB-F foi classificado como Oligotrófico, ao longo de todos os meses de coleta, avaliados neste estudo.

Espacialmente, ao longo dos pontos Verticais do RB, o ponto RB-S apresentou o maior grau de trofia, quando comparado aos pontos mais profundos (RB-M e RB-F), mesmo padrão verificado para o RA.

Sazonalmente, para o RB, o mês de jul/09 apresentou os maiores valores de estado trófico quando comparado aos demais meses de amostragem avaliados.

Comparativamente, o reservatório Bortolan possui maior IET comparado ao RA.

Figura 27 - Índice de estado trófico calculado pelas concentrações de fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila *a* em amostras de água dos pontos Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), ao longo dos meses de amostragem avaliados.

5.4.2.2 Índice de saprobidade

Os valores de índice de saprobidade, calculados com base nos gêneros de protozoários, identificados neste estudo, segundo Foissner (1992) estão apresentados na Figura 28.

De acordo com o Índice de Saprobidade, o perfil vertical do reservatório das Antas foi classificado como Beta-mesosapróbico, ao longo de todos os pontos verticais e meses de amostragem avaliados. Exceção do ponto P14F, para o mês de abr/09, classificado como Alfa-mesosapróbico.

Por outro lado, o perfil vertical do reservatório Bortolan foi classificado como Alfa-mesosapróbico para todos os pontos verticais (RB-S, RB-M e RB-F) para os meses de out/08 e jan/09. Para abr/09 e jul/09, o perfil vertical do RB foi classificado como Beta-mesosapróbico; com exceção do ponto RB-M, em jul/09.

Figura 28 - Índice de Saprobidade de Pantle e Buck calculado a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados neste estudo, nos pontos de coleta Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14f) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.4.2.3 Índice de diversidade

Os valores de índice de diversidade de Shannon-Wiener (H'), obtidos a partir dos valores de biomassa protozooplanctônica (Odum, 1985), para os pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), estão representados na Figura 29.

De acordo com os resultados obtidos através do índice de diversidade para o RA (P14S, P14M e P14F), a menor diversidade protozooplanctônica ocorreu no mês de jul/09 no ponto P14F ($H' = 0,253$; *Codonella cratera*, *Lagynus* sp., *Strombidium* sp. e *Tintinnidium* sp.) e a maior em jan/09, no ponto P14M ($H' = 0,655$; *Askenásia* sp., *Campanella umbellaria*, *Enchelys* sp., *Mesodinium* sp., *Strombidium* sp. e *Urotricha* sp.).

Espacialmente, os valores de índice de diversidade não apresentaram grandes variações em direção ao fundo do reservatório das Antas.

Sazonalmente, o mês de jan/09 apresentou a maior diversidade de organismos protozooplanctônicos, quando comparado aos demais meses de amostragem avaliados no RA.

Para a variação vertical dos valores de diversidade de protozoários para o RB (RB-S, RB-M e RB-F), a menor diversidade protozooplanctônica ocorreu no mês de jul/09 no ponto RB-M ($H' = 0,003$; *Campanella umbellaria*, *Codonella cratera*, *Holophrya* sp., *Monodinium balbiani*, *Stokésia vernalis*, *Strobilidium* sp., *Strombidium* sp., Sp. 9, *Tintinnidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.) e a maior diversidade no mês de jul/09 no ponto RB-F ($H' = 0,724$; *Campanella umbellaria*, *Codonella cratera*, *Enchelys* sp., *Monodinium balbiani*, *Stokésia vernalis*, *Strobilidium* sp., *Strombidium* sp., *Tintinnidium* sp., *Urotricha* sp. e *Vorticella* sp.), seguido do RB-S em jul/09 ($H' = 0,719$).

Espacialmente no RB, a maior diversidade de organismos protozooplanctônicos esteve igualmente distribuída na coluna d'água, exceto para o mês de jan/09, no RB-S e jul/09, no RB-M.

Sazonalmente, o RB apresentou maior diversidade no mês de abr/09.

Figura 29 - Índice de Diversidade de Shannon-Wiener (H') calculados a partir dos valores de biomassa dos protozoários planctônicos registrados, nos pontos Verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F), nos meses de amostragem avaliados.

5.5 Resultados FISH

5.5.1 Resultados das etapas testadas e adicionadas a metodologia FISH

5.5.1.1 Dispersão celular - detergente TWEEN90

Nas figuras 30A e 30B, pode-se observar a aparência da amostra do ponto CM filtrada em membrana de polycarbonato preta (0,22 μm poro), respectivamente sem o tratamento com o detergente TWEEN90 e após o tratamento com TWEEN90.

Figura 30A - Sem a adição do detergente TWEEN90. **Figura 30B** - Utilizando o detergente TWEEN90.

5.5.1.2 Dispersão celular - Banho de ultrassom sonicador

Nas figuras 31A e 31B, pode-se observar a aparência da amostra do ponto CM filtrada em membrana de polycarbonato preta (0,22 µm poro), após a sonicação da amostra em banho de ultrassom e antes de ser sonicada.

Figura 31A - Sonicada.

Figura 31B - Sem sonicar.

5.5.1.3 Limpeza da amostra

O teste para padronizar o melhor filtro de membrana para a pré-limpeza da amostra foi realizado utilizando-se filtros de membrana de poros, apresentando os tamanhos de 0,8 - 8,0 µm; 1,2 µm; 3,0 µm, 10 µm e 20 µm, como mostram as Figuras 32A, 32B, 32C, 32D e 32E.

Após cada pré-filtragem da amostra através dos filtros de membrana citados foi procedida a filtração em membrana de polycarbonato preta com poro de 0,22 μm e realizada a coloração com DAPI, a fim de verificar o que permaneceu retido e o que passou pelos poros da membrana.

Figuras 32A e 32B - Figura 32A: Pré - filtragem em membranas de polycarbonato de 0,8 - 8,0 μm ; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras. Figura 32B: Pré - filtragem em membranas de polycarbonato de 1,2 μm ; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.

Figuras 32C e 32D - Figura 32C: Pré - filtragem em membranas de polycarbonato de 3,0 μm ; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras. Figura 32D: Pré - filtragem em membranas de polycarbonato de 10 μm ; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.

Figura 32E - Pré - filtração em membranas de polycarbonato de 20 μm ; resultado após filtração em membrana de 0,22 micras.

O melhor tamanho de poro para proceder à limpeza da amostra foi o de 10 μm , porque retirou significativas frações de partículas indesejáveis, porém manteve células bacterianas filamentosas.

Para o filtro de membrana de 20 μm de poro, todo o material passou, não sendo verificada uma limpeza efetiva da amostra. Para os demais filtros de membrana (0,8 - 8,0 μm , 1,2 μm e 3,0 μm), foi verificada a retenção de muitas partículas, bem como de possíveis bactérias filamentosas da amostra, sendo inviável.

Além dos interferentes verificados no campo microscópico citados acima, sendo retirados com a utilização de pré-filtração foi detectada a presença de um envoltório capsular de polissacarídeos ao redor das células bacterianas, principalmente em amostras de água procedentes do ponto CM, como mostram as Figuras 33A e 33B. Para a confirmação da presença do envoltório capsular, foi realizado um teste corando as amostras, segundo a metodologia de coloração de cápsulas e envoltórios bacterianos, descrita por Gerhardt et al. (1981): o Método de Coloração de Anthony.

A medida tomada foi o uso de lavagem das amostras quando ainda em Kit Millipore de Filtração; com Etanol 96% P.A. para a retirada parcial deste envoltório (Figuras 34A e 34B).

Figuras 33A e 33B - Teste para confirmação da existência de envoltório capsular nas células bacterianas do ponto CM. Microscopia de contraste de fase.

Figura 34 (A e B) - Amostra fixada com formaldeído e lavada com Etanol 96% P.A.

5.5.1.4 Permeabilização celular

Para melhorar o processo de hibridização, utilizou-se lisozima ([] de 10 mg.mL^{-1}) para promover pequenas lises na parede celular das bactérias, a fim de facilitar a passagem da sequência de oligonucleotídeos. As amostras tratadas previamente com lisozima estão representadas nas Figuras 35A, 35B, 35C e 35D.

Nestas imagens, pôde-se verificar a existência da célula e, externamente, a presença da cápsula deteriorada pela ação do etanol e da lisozima.

Figura 35 (A e B) - Figura 35A: DAPI (ponto CM): Amostra fixada com formaldeído, lavada com etanol 96% e permeabilizada com lisozima. Figura 35B: DAPI (ponto CM): Amostra fixada com formaldeído, lavada com etanol 96% e permeabilizada com lisozima.

Figura 35C - DAPI e Cy3 sonda EUBmix (ponto CM). Amostra hibridizada, após uso de etanol 96%, permeabilizada com lisozima.

Figura 35D - DAPI e Cy3 sonda EUBmix (ponto CM). Amostra hibridizada, após o uso de etanol 96%, permeabilizada com lisozima.

5.5.1.5 Hibridização

Nas Figuras 36a e 36b, a seguir, pode-se observar os resultados obtidos para as amostras coradas em DAPI, bem como a hibridização fluorescente *"in situ"* com a sonda ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3. As figuras são procedentes de amostras de água da UTM/INB do ponto CM, coletadas no dia 17 de abril de 2012. Foi utilizado filtro de membrana de polycarbonato preto de 0,22 μm de poro e filtrado o volume total de 420 mL de amostra fixada, previamente, com formaldeído.

Figura 36 (a e b) - Células coradas em DAPI e hibridização com a sonda ARCH915 / corante Cy3.

Figura 36 (c e d) - Figura 36c: Células de *Escherichia coli* hibridizadas com as sondas EUB338, EUB338-II, EUB338-III e marcadas com o corante fluorescente Cy3. Figura 36d: Células de *Escherichia coli* hibridizadas, utilizando-se a sonda EUB338 marcada com Rodamina Red-X.

Nas Figuras 36c e 36d, foi realizado o processo de hibridização com as sondas EUB338-mix com o corante fluorescente Cy3 em culturas puras de *Escherichia coli*, a fim de visualizar a hibridização, já que se tratava de uma amostra conhecida e compatível com as sondas utilizadas, bem como a hibridização com a sonda EUB338 corada com o corante fluorescente Rodamina para verificar diferenças nos resultados. Sendo assim, verificou-se a superioridade dos resultados obtidos com as sondas marcadas com o corante fluorescente Cy3 juntamente com a adequação da metodologia para os ambientes aquáticos, avaliados neste estudo.

5.5.1.6 Testes de funcionalidade das sondas de oligonucleotídeos

Os resultados obtidos para a total confirmação de que as novas sondas adquiridas (EUB338, EUB338-II, EUB338-III e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Cy3) estivessem em perfeitas condições, seguem nas Figuras 37a, 37b e 37c. A funcionalidade das sondas foi testada como uma medida preventiva, antes que se iniciasse a segunda etapa de testes.

O teste de funcionalidade foi realizado analisando-se uma quantidade definida da solução de sonda com água MilliQ estéril, em espectrofotômetro de luz visível. A realização dos testes de funcionalidade foi de acordo com as recomendações de Fuchs, B. 2012 (Comunicação pessoal⁴). Os picos esperados para as sondas eram de 260 nm para a presença de DNA e de, aproximadamente, 549 nm para a presença do corante fluorescente, ou seja, o Cy3.

⁴ Comunicação pessoal (Fuchs, B.; Alemanha, 2012).

a -)

b -)

c -)

Figura 37 (a, b e c) - Testes de funcionalidade das sondas. (Pico de absorção da sequência de oligonucleotídeos do DNA em torno de 260 nm; pico de absorção do fluorocromo Cy3 em torno de 549 nm).

5.5.2 Resultado final: metodologia FISH implantada

5.5.2.1 Coleta e fixação das amostras

Foram utilizados, para a coleta de água, frascos de vidro âmbar de 1 L esterilizados. Em seguida, as amostras de água foram fixadas com formaldeído 4% (CM) e paraformaldeído 4% (RA e RB) e mantidas sob refrigeração, por período de 4 a 24 horas.

As amostras de água, coletadas nos reservatórios das Antas e Bortolan, passaram pela etapa de sonicação: foi adicionado 1 ml (para cada 100 mL de amostra de cada ponto de coleta) do detergente TWEEN90 em tubos de ensaio, visando à desaglomeração das células da matéria orgânica presente na amostra, onde permaneceram por 24 a 48 horas. Após a incubação, cada amostra foi sonicada em banho de ultrassom por 40 min. (FAZI et al., 2007; HOSHINO et al., 2008; ZARDA et al., 1997). Todos os passos estão sumarizados na Tabela 11.

Tabela 11 - Metodologia padronizada para a técnica FISH nos três corpos de água, avaliados neste estudo.

Fatores	Valores
Fixação da amostra campo	*PFA / **Fa
Dispersão celular TWEEN90 (mL)/h	1 / 2
Sonicação (min)	40
Limpeza da amostra (membrana)	10 µm poro
Permeabilização celular Lisozima	[] 10 mg.mL ⁻¹
Tempo Hibridização (h)	1,5
Temperatura Hibridização (°C)	46
Concentração formamida (%)	30* / 20**
Pré-aquecimento câmara (°C)	48
Temperatura lavagem (°C)	48
Tempo lavagem (min)	15
Concentração NaCl (mM)	1120* / 900**
Concentração DAPI (µg/mL)	2
DAPI (quantidade µL)	100
Tempo DAPI (min)	5 / 10

*RA e RB

**CM

* mix EUBmix/NON338

** ARCH915

5.5.2.2 Filtração

Logo após, as amostras sonicadas e as amostras não sonicadas (ponto CM) foram filtradas em membranas de polycarbonato de 10 µm de poro, a fim de realizar uma pré-limpeza, retirando-se detritos e matéria orgânica (ALFREIDER et. al., 1996). O filtrado foi recolhido e re-filtrado em membranas de polycarbonato pretas de 0,22 µm de poro e 47 mm diâmetro. A membrana, contendo a amostra, foi tratada com etanol 96% (AMANN; FUCHS, 2008) por 2

min., seguido de filtração e lavagem com água ultrapura esterilizada. Os filtros de membrana foram delicadamente acomodados em placas de petri e secos ao ar livre e armazenados à -20 °C.

5.5.2.3 Permeabilização

Para facilitar a entrada da sequência de oligonucleotídeos das sondas EUB338 I, II, III, ARCH915 e NON338, as membranas com amostra já filtrada passaram por um tratamento de permeabilização celular.

Foram imersas em solução de agarose 0,2 %, retiradas rapidamente e secas em estufa a 35 °C por 10 min. Após banho de agarose, foram adicionadas 2 ml de Lisozima (Sigma-Aldrich, São Paulo, S.P., Brasil) na concentração de 10 mg.mL⁻¹ sobre o filtro contendo a amostra, e incubado em estufa a 37 °C por 1 hora. A membrana foi novamente acondicionada no kit de filtração, com cuidado para evitar a perda de células, novamente com o auxílio da bomba de vácuo, foi filtrada para eliminação do excesso de lisozima. Retirada a membrana do kit foi colocada para secar em papel absorvente, dentro do fluxo laminar devidamente esterilizado. As amostras, assim preparadas, foram armazenadas em placas de petri a -20 °C, até o momento da hibridização.

5.5.2.4 Hibridização Fluorescente "In Situ"

Antes de iniciar o processo de hibridização, procedeu-se à preparação das lâminas de vidro; foram encapadas com parafilme fosco e, posteriormente, o pedaço de membrana foi acondicionado. Os tampões de hibridização (ARCH915: 20% de FA e EUB-mix e NON338: 30% de FA) foram mantidos em banho-maria à 48 °C por 15 min.

Em seguida, adicionou-se 2 mL de tampão de hibridização (pré aquecido à 48 °C por 15 min) em um pedaço de papel absorvente dobrado dentro da câmara de hibridização escura (tubo falcon envolto com papel alumínio) e incubou-se a câmara de hibridização por 1,5 h a 48 °C em estufa.

Retiraram-se as sondas do freezer e as amostras reviamente fixadas e permeabilizadas, para que atingissem a temperatura ambiente.

Depois de descongeladas, dividiu-se a membrana em 4 partes iguais, com o auxílio de uma tesoura, previamente esterilizada com álcool. Colocou-se então cada pedaço de membrana sobre a lâmina com parafilme.

Adicionou-se 200 a 400 μL de tampão de hibridização sobre cada pedaço de membrana juntamente com:

- Sonda EUBmix: 3 tipos de sondas (EUB I, II e III), 3,33 μL de cada sonda sobre um pedaço da membrana;
- Sonda ARCH915: 7,5 μL sobre outro pedaço da membrana;
- Sonda NON338: 7,5 μL sobre outro pedaço da membrana.

Retirou-se a câmara de hibridização previamente aquecida em estufa a 48 °C e colocaram-se as respectivas lâminas com as amostra nas câmaras de hibridização, mantendo o papel absorvente previamente embebido com solução de tampão de hibridização (20% ou 30%). Cuidadosamente, incubaram-se as câmaras assim preparadas dentro de estufa a 46 °C por 1,5 h a fim de hibridizar a amostra.

Cerca de 15 min antes de terminar o processo de hibridização, aqueceram-se os tampões de lavagem (ARCH915: 900 mM de NaCl e EUB338mix/NON338: 1.125 mM de NaCl) em banho maria a 48 °C.

Após o término da hibridização, retiraram-se as câmaras da estufa e colocaram-se as membranas em placas de petri de acrílico pequenas, adicionando 1 - 2 mL de tampão de lavagem pré-aquecido e incubando-se novamente em estufa à 48 °C por 15 minutos.

Após a lavagem da amostra, foram as membranas das placas de acrílico, lavadas com 1 mL de água ultrapura esterilizada. Para a secagem, as lâminas foram colocadas sobre papel absorvente.

Em seguida, acondicionaram-se as membranas novamente sobre as respectivas lâminas com parafilme adicionando-se de 100 a 200 μL de DAPI na concentração de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Deixou-se descansar ao abrigo da luz por cerca de 15 minutos.

Após a coloração com Dapi, as membranas foram submersas em solução de Etanol de 50%, 70% e 90% (1 minuto em cada solução), deixando-se secar sobre papel absorvente.

Após este último passo, a amostra estava pronta para ser montada em lâmina de vidro e analisada em microscópio de epifluorescência.

Sendo assim, de acordo com os resultados apresentados, pôde-se observar uma evolução nos conhecimentos sobre a técnica FISH, bem como para os resultados registrados ao longo

deste estudo, que pretendeu padronizar e implantar a técnica independente de cultivo Hibridização Fluorescente "*in situ*" (FISH), para amostras do lago de mina ácido e dos reservatórios das Antas e Bortolan.

5.5.3 Hibridização Fluorescente "In Situ" (FISH) - adequamento e Implantação da técnica independente de cultivo para as águas do lago ácido de mina de urânio e para os reservatórios das Antas e Bortolan

Os resultados preliminares obtidos na primeira etapa de testes realizados, visa a implantação da técnica independente de cultivo FISH, utilizando-se as sondas EUB338 e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Rodamina Red-X, em amostras de água do ponto CM, bem como dos reservatórios das Antas e Bortolan não foram satisfatórios.

Foram detectados baixos sinais de fluorescência das amostras ao microscópio de epifluorescência, reduzido número de células coradas, problemas de background com partículas fluorescentes e, principalmente, ausência de hibridização celular (ANEXO A). Sendo assim, novas medidas foram adotadas.

Diante das informações adquiridas em revisões de literatura e contato direto com inúmeros autores de artigos científicos sobre o tema de interesse, foi iniciada a segunda etapa de testes, incorporando-se à metodologia do FISH alterações e sugestões descritas nas metodologias delineadas nos trabalhos consultados (AMANN e FUCHS, 2008; ALFREIDER et al., 1996; FAZI et al., 2007; FRANKS et al., 1998; GLOCKNER et al., 1999; GONZÁLEZ-TORIL et al., 2003; HOSHINO et al., 2008; SEKAR et al., 2003; ZARDA et al., 1997).

Na Tabela 12, está apresentado o número de testes realizados na segunda etapa visando adequações na metodologia do FISH para os corpos de água, avaliados neste estudo.

Na Tabela 13a e na Figura 38, estão apresentados o número de campos microscópicos avaliados em microscopia de epifluorescência e fotografados, o total de células coradas com o corante fluorescente Dapi, bem como o número de campos microscópicos onde foi possível verificar a hibridização positiva nas células bacterianas frente às diferentes sondas utilizadas tanto para a 1ª etapa de testes quanto para a 2ª.

Nas Tabelas 13b e 13c, estão os resultados para as análises estatísticas utilizadas mostrando a diferença significativa entre os resultados positivos obtidos com o uso das

sondas marcadas com o corante Rodamina Red-X e os resultados positivos obtidos com o melhoramento da técnica FISH, após o uso das sondas marcadas com o corante fluorescente Cy3.

Tabela 12 - Número de testes realizados na 2ª Etapa para cada passo testado e incluído (dispersão celular, sonicação, concentração de formamida (FA) no tampão de hibridização, limpeza da amostra e permeabilização celular) na metodologia de hibridização fluorescente *"in situ"* para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Cy3.

Parâmetros	Nº de Testes - 2ª Etapa	
	Reservatórios (RA e RB)	Cava da Mina
Tween (dispersão celular)	21	21
Sonicação (dispersão celular)	20	20
[] de FA tampão de hibridização	10	15
Limpeza da amostra	15	15
Permeabilização celular	15	15

Tabela 13a - Comparativo entre o número total de campos microscópicos avaliados em DAPI e de resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodamina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.

Amostras	Nº Total de Campos microscópicos avaliados (DAPI) e Nº de campos apresentando resultados positivos (Rodamina x Cy3)					
	Marcador - Rodamina			Marcador - Cy3		
	1ª Etapa de Testes			2ª Etapa de Testes		
	DAPI	EUB338*	ARCH915*	DAPI	EUB338 (I, II e III)*	ARCH915*
Cava da Mina (CM)	84	1	0	189	52	36
Reservatório das Antas (RA)	71	1	0	83	11	22
Reservatório Bortolan (RB)	47	3	0	85	25	9
<i>Escherichia coli</i>	39	11	0	8	8	X
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (ponto CM)	X	X	X	63	19	X
Bactérias Heterotróficas (ponto CM) CPS	14	0	1	17	5	X
TOTAL	370	46	27	442	120	67

* Número de resultados positivos.

X = não avaliado

Figura 38 - Comparativo entre a porcentagem de resultados positivos (células hibridizadas) na 1ª Etapa de Testes (roxo) e na 2ª Etapa de Testes (azul), frente à porcentagem total de células visualizadas (DAPI).

Tabela 13b - Teste t-Pareado para o comparativo entre os resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Rodmina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.

Teste - t: duas amostras em par para médias		
	Rodamina	Cy3
Média	22,58333333	45,41666667
Variância	912,2651515	2800,992424
Observações	12	12
Correlação de Pearson	0,8093927	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	11	
	-	
Stat t	2,357581573	
P(T<=t) uni-caudal	0,01898784	
t crítico uni-caudal	1,795884819	
P(T<=t) bi-caudal	0,03797568	
t crítico bi-caudal	2,20098516	

Tabela 13c - Resultado do Teste de Wilcoxon para o comparativo entre os resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodmina Red-X e para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3.

Teste Wilcoxon			Valid	T	Z	p-value
Rodamina	X	Cy3	12	9,500000	2,314170	0,020659
Valor de p						< 0,05

Em relação ao número de resultados positivos para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodmina, quando comparados ao número de resultados positivos para as sondas EUB338 mix I-II-III e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Cy3, verificou-se maior eficiência das sondas e da metodologia utilizada na segunda etapa de testes como mostram a Figura 38 e as Tabelas 12b e 12c, evidenciada pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os dois tratamentos.

6 DISCUSSÃO

6.1 Variáveis abióticas

O Planalto de Poços de Caldas possui padrão climático dividido em estações seca e úmida, com mais de 80% da precipitação entre os meses de outubro a março. A precipitação média anual da região em 30, anos segundo Bonotto (1989), foi de 1.700 mm e durante 1983, foi de 2.710 mm. Segundo Alberti (2008), que realizou a caracterização fisiográfica e a avaliação hidrológica na bacia do Ribeirão das Antas, Planalto de Poços de Caldas, MG. a precipitação média, em oito anos, obtida em uma estação meteorológica próxima a UTM/INB (Caldas, MG), foi de 1.560 mm. Por outro lado, em outra estação meteorológica localizada no chamado Baixo Antas (próxima à cidade de Poços de Caldas, MG) o índice pluviométrico foi de 1.678 mm. De acordo com Lage-Filho (1996), o clima da região de Poços de Caldas segundo a classificação de Köppen, é do tipo sub-mesotérmico de inverno seco, geralmente de abril a setembro, com temperaturas mais baixas e menores índices pluviométricos e de verão brando, no período de outubro a março, com temperaturas mais elevadas e maiores

índices pluviométricos. Tais informações corroboram com resultados registrados durante o presente estudo.

Foram verificadas diferenças significativas entre os valores de pH da água registrados no LMA Cava da Mina Osamu Utsumi, quando comparados aos reservatórios das Antas e Bortolan. Já eram esperados menores valores de pH no ponto CM, pois tais valores de pH neste ambiente estão relacionados à própria litologia da região, que é caracterizada por maiores concentrações de urânio e outros metais em associação ao minério de urânio e a geração da drenagem ácida de mina devido à pirita associada. A presença de pirita, na composição do solo onde foi realizada a extração mineira, está relacionada com a formação de ácido sulfúrico, favorecendo a acidificação das águas da cava de mina (CAMPOS, 2006; CAMPOS et al., 2010; FERRARI, 2010; SOUZA, 1995).

Para o reservatório das Antas (pontos Cab, P41, e P14S, P14M e P14F) que apresentou valores de pH de neutro a levemente acidificados segundo Lage-Filho (1996), assim como para a cava da mina, a região onde se localiza o RA também possui características litológicas que favoreceriam valores de pH tendendo a acidez, devido à possível disponibilização de íons (silicato, sódio e potássio) presentes no sedimento para a coluna de água, bem como a questão da liberação dos efluentes ácidos tratados procedentes da UTM/INB no ponto P41 do RA.

Os maiores valores de condutividade elétrica da água sempre foram registrados no CM CM, condizendo com as características deste local, onde baixos valores de pH e elevadas concentrações de elementos químicos como manganês, zinco, fluoreto e ferro (LADEIRA; GONÇALVES, 2007) e radionuclídeos estão presentes em seu estado dissolvido, bem como a elevada dureza da água verificada neste local de estudo, relacionada diretamente à presença de íons cálcio, provenientes do sistema de tratamento de efluentes da UTM/INB.

Para os reservatórios, o RA apresentou elevados valores de condutividade elétrica da água, quando comparado ao RB, principalmente nos meses de out/08 e jul/09. Provavelmente, a entrada do efluente da UTM/INB, tratado com hidróxido de cálcio, proveniente da bacia de decantação da UTM/INB, favoreceu o aumento da concentração de íons na coluna de água do RA os resultados mostraram elevados valores de condutividade elétrica da água no ponto P41, nos meses de out/08 = $765,0 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$ e jul/09 = $654,0 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$, o que mostra que o efluente tratado foi liberado antes que houvesse a precipitação de espécies químicas.

Assim, segundo Ferrari (2010), os elevados valores de condutividade elétrica registrados no RA, quando comparados ao RB, principalmente, nos meses de out/08 e jul/09 poderiam ser decorrentes do tratamento inadequado do efluente líquido pela UTM/INB, que estaria sendo liberado no ponto P41, antes da total precipitação dos íons presentes nos efluentes da bacia de decantação. Dessouki et al. (2005) citaram que, em seu estudo, em um lago de cava de mina de urânio no Canadá, as águas destes lagos de cava de mina são, frequentemente, tratadas e liberadas em bacias hidrográficas próximas à região entretanto tal água tratada ainda pode conter elevados níveis de contaminantes, tais como Ra-226, Mo e U os quais podem acarretar efeitos prejudiciais sobre as águas que os recebem.

O reservatório Bortolan apresentou maiores valores de pH e menores de condutividade elétrica da água, quando comparado aos registrados no RA e no ponto CM. Tais valores, segundo Ferrari (2010), sugerem que o efluente, tratado pela UTM/INB e lançado no reservatório das Antas, poderia ter sofrido um processo de diluição das águas que fluem pela Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, até alcançar o reservatório Bortolan, situado a jusante do reservatório das Antas.

Em relação aos valores de material em suspensão total, orgânico e inorgânico, de um modo geral, para os pontos de superfície, o CM Cava da Mina Osamu Utsumi apresentou maiores concentrações de MSI, quando comparados aos demais pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S). Tal fato pode ser atribuído à própria composição da água deste lago de mina, rico em elementos químicos e radionuclídeos dissolvidos devido aos baixos valores de pH. Kalin et al. (2001) descreveram, em seu estudo em um lago de cava de mina, que elevada concentração de sólidos em suspensão é uma característica comum em lagos de cava de mina, devido à ressuspensão deste do sedimento destes lagos.

Tanto para os pontos de superfície do RA (Cab, P41, P14S) quanto para os pontos verticais (P14S, P14M e P14F), foi verificada maior concentração da fração inorgânica do material em suspensão. Por outro lado, para o RB, a fração orgânica constituiu a maior parte do material em suspensão deste reservatório. Tais diferenças podem ser atribuídas ao fato de que o RA sofre interferências antropogênicas de fontes poluidoras de origens inorgânicas, como o lançamento dos efluentes tratados liberados pela UTM/INB no ponto P41, bem como pela própria litologia da bacia hidrográfica que o constitui. No caso do RB, localizado próximo à malha urbana da cidade de Poços de Caldas e sendo utilizado como receptor dos esgotos

domésticos e industriais da região, o maior aporte de poluentes de fonte orgânica é condizente, explicando assim tal distinção entre os dois reservatórios.

No mês de jan/09, foram verificados os maiores valores de material em suspensão total, concordaram com o período quando houve maiores índices pluviométricos: o material em suspensão depositado no sedimento foi resuspenso para a coluna d'água, influenciando as concentrações deste, bem como o carreamento de material alóctone proveniente das margens e afluentes das represas. Por outro lado, para o mês de jul/09, os valores de material em suspensão foram baixos, evidenciando a estação seca, quando não houve contribuição das chuvas para a maior turbulência da coluna d'água e entrada de material alóctone nos reservatórios.

No presente estudo, foi verificada diferença significativa entre os valores de clorofila *a* para o CM Cava da Mina Osamu Utsumi e os demais pontos de superfície avaliados. Frente aos valores de concentração de clorofila *a*, o ponto CM mostrou-se rico em formas clorofiladas, quando comparado aos pontos de superfície do RA. Bell; Weithoff (2003) verificaram valores de clorofila *a* variando de 0,8 a 2,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no LMA 111 (pH = 2,6) na Alemanha. Moser e Weisse (2011) registraram valores de clorofila *a* na região do epilimínio de um LMA na Áustria, variando de 0,6 a 6,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, Derham (2004) registrou valores de clorofila *a* variando de 0,1 a 4,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ nas zonas pelágicas de quatro lagos de mina ácidos (Blue Waters, Chicken Creek, Stockton e WO5B; faixa de pH 2,8 - 5); tais valores eram comparáveis aos sistemas naturais considerados como oligo e ultra-oligotróficos com respeito à biomassa algal. Kleeberg et al. (2006), no lago de mina Grunewalder Lauch pertencente à área de mineração de Lausitz, Alemanha, verificaram concentrações de clorofila *a* consideradas em níveis de oligomesotrofia (0,2 - 9,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Segundo os autores, devido às águas do LMA serem relativamente claras, ocasionariam a regulação negativa do crescimento algal nas camadas superficiais do lago devido ao excesso de luz e da supersaturação.

Os valores de concentração de clorofila *a*, registrados no CM, foram semelhantes aos relatados pelos autores supracitados (Cl *a* CM = 0,0 a 10,75 $\mu\text{g.L}^{-1}$), podendo classificar este lago de mina como um ambiente de baixa produtividade algal, considerando-se os resultados e a interpretação observada por estes autores. Entre os reservatórios, o Antas (pontos Cab, P41 e P14S) apresentou valores de concentração de clorofila *a* menores que os

registrados no ponto RB-S, no reservatório Bortolan e mais próximo dos valores verificados para o ponto CM; o que concorda com a classificação oligomesotrófica verificada para o RA.

Em relação à variação vertical nos valores de clorofila *a*, o RA manteve suas características de oligotrofia. Por outro lado, o reservatório Bortolan apresentou-se como um corpo aquático mais produtivo, com maiores valores de clorofila, mesmo nos pontos mais profundos. Szpakowska et al. (2010) descrevem, em seu estudo, que corpos de água localizados em áreas municipais, como é o caso do reservatório Bortolan, são frequentemente utilizados para o lazer e despejo de poluentes resultando em um maior aporte de nutrientes e poluentes, para o interior dos reservatórios.

Neste estudo, foram quantificados os valores de carbono orgânico total e suas formas dissolvidas o carbono orgânico dissolvido e o carbono inorgânico dissolvido para os reservatórios das Antas e Bortolan. A maior parcela de carbono, em todos os pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S), foi de COD, que se origina principalmente da decomposição de plantas e animais e a partir de produtos da excreção destes organismos estando diretamente relacionado com o estado trófico do corpo aquático e com o tipo de influência à qual o mesmo está submetido (ex: elevada contribuição alóctone, lançamento de esgotos, etc). A excreção do COD também possui estreita relação inversa à disponibilidade de nutrientes do meio. Assim, em condições mais eutróficas (em termos de nutrientes), ocorre menor taxa de excreção de COD e, em condições oligotróficas, maiores excreções de COD são esperadas. Uma vez que os pontos de superfície do RA, bem como o ponto RB-S localizado no reservatório Bortolan são ambientes com grau de trofia de oligo a mesotróficos, ou seja, com menor disponibilidade de nutrientes no meio, explica-se a maior parcela de taxa de excreção de COD (ESTEVES, 2011).

Em relação às formas de carbono na coluna de água dos reservatórios das Antas e Bortolan, a fração de carbono orgânico dissolvido também foi mais representativa em ambos. Segundo Biddanda, Ogdahl e Cotner (2001), ambientes aquáticos oligotróficos são caracterizados por uma maior relação entre a matéria orgânica dissolvida e a particulada, em comparação aos sistemas eutróficos. Lagos oligotróficos, dominados pela matéria orgânica na sua forma dissolvida, estão propensos a apoiar uma teia alimentar predominantemente microbiana, enquanto que massas de água eutróficas estão mais susceptíveis a sustentar uma cadeia alimentar predominantemente predadora/pastadora. De acordo com os autores, tais resultados forneceram suporte para a ideia de que os

recursos orgânicos dissolvidos são elevados em meio ambientes de baixa produtividade. Consequentemente, prevalecem diferenças nas fontes nutricionais em águas oligotróficas comparadas às águas eutróficas, podendo esperar-se diferentes tipos de cadeias alimentares uma vez que, as bactérias heterotróficas e o fitoplâncton autotrófico são os osmótrofos primários em ecossistemas aquáticos. Portanto, a predominância de nutrientes, dissolvidos em sistemas oligotróficos, pode selecionar as bactérias, como os heterótrofos dominantes sobre os fagotróficos. Morris e Lewis Jr. (1992) verificaram valores de carbono orgânico dissolvido, variando de 14,2 a 20,4 mg.L⁻¹, em um lago mesotrófico (Lago Dillon, Colorado). Petrucio, Barbosa e Furtado (2006) estudaram sete lagos, localizados na Bacia do Rio Doce (Brasil) e registraram valores de carbono orgânico dissolvido variando de 3,5 a 9,3 mg.L⁻¹ na estação seca e de 0,6 a 20,1 mg.L⁻¹ na úmida. Todos os lagos, avaliados no estudo de Petrucio, Barbosa e Furtado (2006) possuíam valores de pH similares aos verificados no reservatório das Antas e Bortolan, ou seja, valores variando de 5,2 a 7,8 e foram classificados como oligotróficos e mesotróficos, ao longo do período avaliado.

Podemos verificar que os valores de COD, registrados no presente estudo, para o RA e o RB tanto para os pontos de superfície quanto para o perfil vertical da coluna d'água estiveram abaixo dos verificados nos estudos citados, porém estando de acordo com a classificação trófica destes sistemas, como oligotróficos.

O carbono inorgânico dissolvido origina-se no meio aquático proveniente da atmosfera, da chuva, de águas subterrâneas, da decomposição e respiração de organismos e está diretamente relacionado aos valores de pH do meio aquático e à temperatura da água (ESTEVES, 2011). Sendo assim, elevadas temperaturas ocasionalmente aceleram as taxas de decomposição da matéria orgânica, podendo elevar os valores de carbono inorgânico na água, além da decomposição, maiores taxas de respiração dos organismos também podem elevar as taxas de carbono inorgânico da água, liberando maiores frações de gás carbônico. Por outro lado, elevada atividade fotossintética traduz-se em menores valores de carbono inorgânico na coluna d'água. Em relação ao pH, valores deste < 6 propiciam maiores concentrações de gás carbônico na água e valores de pH acima de 6 tendem a diminuir as concentrações de gás carbônico na água. Podemos inferir que, em todo o período de estudo nos reservatórios das Antas e Bortolan, provavelmente as taxas fotossintéticas poderiam ter sido superiores à decomposição e respiração dos organismos aquáticos, favorecendo as maiores concentrações de COD sobre o CID.

Há muito é conhecida a importância do fósforo nos ecossistemas aquáticos, sendo um dos principais fatores limitantes da produtividade destes ambientes, quando se encontra em baixas concentrações. As principais fontes de fósforo vêm de origem natural ou artificial; as rochas da bacia de drenagem constituem a fonte básica de fosfato para os ecossistemas aquáticos continentais. Outras seriam o material particulado presente na atmosfera e o fosfato resultante da decomposição de organismos de origem alóctone. As fontes artificiais mais importantes são os esgotos domésticos e industriais, bem como o material particulado de origem industrial, contido na atmosfera (ESTEVES, 2011).

Para o ponto CM, os valores das formas fosfatadas variaram de 5,60 a 17,95 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para fósforo total, de 0,25 a 4,67 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o fosfato total dissolvido e de 1,80 a 11,98 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para o fosfato inorgânico estiveram situados dentro dos valores registrados por outros autores para lagos de cava de mina ácido. Röncke et al. (2010) verificaram, em um lago de cava de mina (Lago Bockwitz - Alemanha), que foi neutralizado (pH = 2,65 para 7,1) após tratamento químico com carbonato de cálcio, valores de fósforo total variando de 6,0 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Dessouki et al. (2005) verificaram valor de fósforo total de 6,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em um lago de cava de mina de urânio no Canadá. Geller et al. (2009), realizando estudos sobre o LMA 111 (Alemanha), verificaram valores de fósforo total de 14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e de fosfato inorgânico de 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Krawczyk-Bärsch et al. (2011), estudando a influência do urânio na drenagem ácida de mina gerada a partir da mina Königstein (Alemanha), registraram valor de fosfato < 5000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por outro lado, Kalin et al. (2001), verificaram, em um LMA, valor médio de fosfato total dissolvido de 145 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Neste estudo foram verificados, em geral, baixos valores de fósforo total, fosfato total dissolvido, bem como de fosfato inorgânico, ao longo dos pontos de superfície do RA (Cab, P41 e P14S), bem como para os pontos verticais do RA (P14S, P14M e P14F). Somente para os pontos localizados no RB (RB-S, RB-M e RB-F) foi verificada uma maior concentração de tais elementos. Takamura, Shen e Xie (2000) realizaram um estudo sobre a riqueza de Protozoa em lagos japoneses, em relações às características morfométricas dos lagos e ao estado de trofia. As coletas foram realizadas na região do epilimínio dos quinze lagos (Lago: Chuzenji - oligotrófico; Iwaya, Ikeda, Biwa Norte, Unagi-Ike, Nakatsuna, Seitaen, Akikawa, Kizaki, Yunoko - mesotróficos e; Biwa Sul, Koyama-Ike, Kitakata, Mikata e Kasumigaura - eutróficos). Os valores de fósforo total para os lagos oligo e mesotróficos variaram de 6 a 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e; para os lagos eutróficos de 43 a 52 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quando avaliados os maiores valores de

fósforo total registrados tanto para os pontos de superfície do RA e RB quanto para o perfil vertical de ambos os reservatórios, ou seja, RA = $14,60 \mu\text{g.L}^{-1}$ e RB = $39,20 \mu\text{g.L}^{-1}$, tais resultados estiveram dentro do determinado para corpos de água de classificação trófica de oligo a mesotróficos. Horváth et al. (2012), realizaram um estudo sobre a qualidade da água do reservatório Balaton (reservatório foi amostrado em duas regiões distintas: a cabeceira e a jusante em 4 pontos de coleta; a média da profundidade deste corpo de água é de 1,1 m e a transparência da água variou entre 0,20 m a 0,45 m) localizado na região de turismo e recreação mais importante da Hungria e utilizado para o abastecimento de água potável, verificaram valores de fósforo total variando de: 206,0 a $346,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de fosfato total dissolvido de 50,5 a $120,7 \mu\text{g.L}^{-1}$, sendo extremamente elevados, quando comparados aos verificados nos reservatórios das Antas e Bortolan.

O valor da razão de Redfield 16N:1P é, frequentemente, assumido como o valor ótimo para que não ocorram limitações por nitrogênio ou fósforo nos ambientes aquáticos (FERRAGUT; BICUDO, 2009) sendo, portanto, considerado como referência padrão na avaliação das limitações de nutrientes em ecossistemas aquáticos, sejam eles de origem marinha ou de água doce (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008). De acordo com García et al. (2002), o melhor indicador do estado nutricional dos lagos parece ser a razão (N:P). Estes autores, em estudo realizado no reservatório Valle do Bravo (México), registraram razão de 0,98 N : 5,68 P, indicando limitações de nitrogênio nesse ambiente. Horváth et al. (2012) verificaram no reservatório Balaton razão de Redfield para N:P variando de 2,57 a 7,48. Segundo os autores tais proporções mostraram razões relativamente baixas entre N e P, sugerindo elevada biomassa de cianobactérias registradas no estudo e intensiva fixação de nitrogênio. No presente estudo, um comportamento diferente ao registrado por esses autores foi observado no ponto CM na UTM/INB, no reservatório das Antas e no reservatório Bortolan, que apresentaram concentrações expressas na razão de nitrogênio para fósforo de 64N:1P; 111N:1P e 28,7N:1P, respectivamente. Tais resultados indicaram que, nesses ambientes, o fósforo atuou como fator limitante, uma vez que o nitrogênio esteve em excesso (FERRARI, 2010). Ainda, segundo Ferrari (2010), a maior limitação de fósforo no ponto CM na UTM/INB (64N:1P) e no reservatório das Antas (111N:1P), pode ter afetado, de maneira direta, a produtividade primária desses ambientes, devido às menores concentrações das formas fosfatadas, principalmente de fosfato inorgânico, o qual é a principal fonte de assimilação de fósforo para o fitoplâncton. Assim, a menor densidade e

riqueza de organismos zooplancctônicos registrados no CM e na RA, quando comparados com o reservatório Bortolan, podem estar relacionados à limitação por fósforo.

De acordo com Esteves (2011), o nitrogênio é um dos elementos mais importantes para o metabolismo dos ecossistemas aquáticos. As principais fontes de nitrogênio são a chuva, matéria orgânica e inorgânica de origem alóctone e a fixação do nitrogênio molecular dentro do próprio ecossistema aquático. Baixa concentração de nitrogênio torna-se um fator limitante para a produtividade primária do sistema. Além do nitrogênio, o nitrato e o íon amônio são as principais fontes de nitrogênio para os produtores primários. Por outro lado, o nitrito é geralmente encontrado em baixas concentrações em ambientes oxigenados, sendo a forma intermediária entre o íon amônio (forma mais reduzida do N) e o nitrato (forma mais oxidada do N). Dentre as formas de N verificadas, o íon amônio é a forma mais energeticamente viável para os organismos produtores: sendo verificadas baixas concentrações na camada do lago, onde se encontra a maior parte da comunidade fitoplanctônica.

Para o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi foram verificados, em geral, os menores valores de nitrogênio total, quando comparados aos demais pontos de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S). Os valores de nitrato, nitrito e íon amônio para o ponto CM estiveram condizentes com as informações descritas por Esteves (2011), mesmo sendo um corpo de água artificial contendo efluentes radioativos. Os resultados da CM indicaram menores valores de nitrito (indica um estado intermediário entre o íon amônio e nitrato, processo denominado nitrificação, sendo mediado por bactérias que oxidam o amônio a nitrito e o nitrito a nitrato) e maiores valores de nitrato e íon amônio, que se caracterizam pelas formas biodisponíveis para o fitoplâncton, como citado por Esteves (2011).

Kalin et al. (2001), verificaram, em seu estudo, em um LMA, valor médio de nitrato de $330 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o íon amônio. Geller et al. (2009) realizando estudos sobre o LMA 111 (Alemanha), verificaram valores de nitrato de $320 \mu\text{g.L}^{-1}$, de íon amônio de $3000 \mu\text{g.L}^{-1}$, de nitrito de $<1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de nitrogênio total de $3500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Dessouki et al. (2005) registraram valor de nitrogênio total de $11000 \mu\text{g.L}^{-1}$ em um lago de cava de mina de urânio no Canadá. Röncke et al. (2010) verificaram em um lago de cava de mina (Lago Bockwitz - Alemanha) que foi neutralizado ($\text{pH} = 2,65$ para $7,1$) após tratamento químico com carbonato de sódio, valores de nitrato variando de 190 a $370 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de íon amônio variando de 700 a $1300 \mu\text{g.L}^{-1}$. Krawczyk-Bärsch et al. (2011), estudando a drenagem ácida de mina gerada a partir da

mina de urânio Königstein (Alemanha), registraram valor de nitrato $<2000 \mu\text{g.L}^{-1}$. Moser e Weisse (2011) estudaram dois lagos de mina ácidos localizados ao norte da Áustria e registraram valores de nitrato de $460 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de íon amônio de $3140 \mu\text{g.L}^{-1}$. Analisando-se os valores descritos acima e os resultados obtidos, para o presente estudo, no LMA Cava da Mina Osamu Utsumi, tal corpo de água apresentou sempre menores valores para nitrogênio total, nitrato e íon amônio, sendo um corpo aquático de limitada disponibilidade de formas nitrogenadas, frente aos lagos de mina descrito na literatura.

Por outro lado, tanto para os pontos de superfície do RA (Cab, P41 e P14S) e do RB (RB-S) quanto para o perfil vertical dos reservatórios das Antas e Bortolan, os valores de nitrogênio total registrados foram comparáveis a valores detectados em lagos meso e eutróficos: Takamura, Shen e Xie (2000) realizaram estudo sobre a riqueza de Protozoa, em lagos japoneses, em relações às características morfométricas destes e ao estado de trofia. As coletas foram realizadas na região do epilimínio dos quinze lagos (Lago: Chuzenji - oligotrófico; lago: Iwaya, Ikeda, Biwa Norte, Unagi-Ike, Nakatsuna, Seitaen, Akikawa, Kizaki, Yunoko - mesotróficos e; lago: Biwa Sul, Koyama-Ike, Kitakata, Mikata e Kasumigaura - eutróficos). Para o Lago Chuzenji, oligotrófico o valor de nitrogênio total foi de $207 \mu\text{g.L}^{-1}$; para os lagos mesotróficos, os valores de N total variaram de 131 a $757 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para os lagos eutróficos, os valores variaram de 400 a $1.710 \mu\text{g.L}^{-1}$. Porém, mesmo o RA, nos pontos de superfície e nos pontos verticais, apresentando elevados valores de nitrogênio total, o RB possui, em todos os seus pontos, valores das formas reduzidas de N total, ou seja, nitrato e íon amônio mais elevados, quando comparados ao RA. Isso indica que, mesmo com maiores concentrações de N total, o RA parece não possuir um ciclo biogeoquímico do nitrogênio que propicie a disponibilização deste em suas formas biodisponíveis (nitrato e íon amônio) para a cadeia alimentar autotrófica. Na escassez destes dois compostos, várias espécies do fitoplâncton passam a utilizar o nitrito e/ou matéria orgânica dissolvida, a qual é a fração mais abundante depois do N^2 molecular, sendo suas principais fontes resultado da lise celular (morte ou herbivoria), decomposição e excreção pelo fitoplâncton e macrófitas (REYNOLDS, 1997; ESTEVES, 2011).

Por outro lado, na época de floração do fitoplâncton, o nitrato torna-se a principal forma de nitrogênio assimilado pelas células, podendo ser detectado em menores concentrações no meio. Em lagos oligotróficos a mesotróficos também ocorre depleção durante a primavera e verão do íon amônio, devido ao consumo pelo fitoplâncton no epilimínio

(REYNOLDS, 1997; ESTEVES, 2011). Tais fatores também poderiam explicar as menores concentrações de nitrato e íon amônio na coluna d'água do reservatório das Antas.

As concentrações de nitrito em ambientes de água doce são bem mais baixas do que as de amônio e nitrato, exceto em lagos poluídos e em lagos eutróficos, onde há formação de nitrito, através da desnitrificação em condições anóxicas (REYNOLDS, 1997; ESTEVES, 2011). Os resultados do presente estudo concordaram com o relatado pelos autores, frente ao comportamento do N total em corpos de água com características de oligomesotrofia, como é o caso dos reservatórios avaliados.

A Resolução CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) e a Deliberação COPAM/CERH-MG nº 1 (BRASIL, 2008) estabelecem um limite de $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$ para nitrato e de $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$ para nitrito em corpos de água Classe II. Verifica-se que os valores médios de nitrato e de nitrito obtidos no presente estudo estiveram dentro dos limites estabelecidos.

A sílica presente no ambiente aquático provem, principalmente, da decomposição de minerais de silicato de alumínio (ex: feldspato), que são mais frequentes em rochas sedimentares. Na água, a sílica pode estar sob três formas principais: íon sílica solúvel, sílica coloidal e sílica particulada = incorporada principalmente ao fitoplâncton ou aos detritos orgânicos, sob a forma de quartzo e minerais de silicatos em suspensão e, ainda, adsorvida a compostos orgânicos e inorgânicos (ex: hidróxido de alumínio e de ferro) (ESTEVES, 2011).

Os maiores valores de silicato registrados neste estudo foram no reservatório Bortolan, tanto para os pontos de superfície quanto para o perfil vertical, seguido do RA e do ponto CM. Segundo Moniz, (1964) o principal mineral encontrado na borda e no interior da caldeira vulcânica, onde se localiza o Planalto de Poços de Caldas, bem como os corpos de água avaliados neste estudo, é a gibbsita, acompanhada de hidróxido de alumínio amorfo (cliarquita) predominando na fração de argila, proveniente de rochas alcalinas, o que concorda com o descrito por Esteves (2011) que relatou que uma das formas para a presença de sílica nos sistemas aquáticos seria adsorvida a compostos inorgânicos como o hidróxido de alumínio.

Ainda, Leonardi, Ladeira e Santos (2010), em seu estudo sobre a geoquímica e a posição da paisagem dos perfis bauxíticos do Planalto de Poços de Caldas (MG), descreveram que as jazidas de bauxita do Planalto de Poços de Caldas ocorreram sob dois tipos: Jazidas de Serra: localizadas na borda do planalto, apresentando menor teor de sílica reativa e Jazidas de Campo: localizadas no interior do Planalto, com maior teor de sílica reativa. Além dos tipos

de jazidas, existem dois tipos de bauxita no Planalto: de origem hidrotermal que se caracteriza por elevada percolação da água para a remoção da sílica e outros elementos e a bauxita de origem supérgena, onde ocorre a lixiviação de elementos como a sílica e de outros elementos insolúveis, que permanecem como depósito residual, como o alumínio. Segundo os autores, os perfis bauxíticos de Serra e de Campo do Planalto de Poços de Caldas apresentaram elevadas concentrações de sílica (SiO_2) e alumínio associados à composição mineral da rocha e que, principalmente, para o perfil de Serra, o intemperismo químico prevaleceu e a drenagem de material foi intensa o suficiente para lixiviar a maior parte do óxido de sílica presente no material de origem. Tais fatores condizem com as maiores concentrações de silicato verificados no reservatório Bortolan, que está geograficamente localizado na região onde se encontram os perfis de Serra e de Campo.

Regiões com elevado background de radiação natural podem ser importantes fontes de exposição humana à radiação e um significativo componente de radiação proveniente de radionuclídeos naturais do solo. Estes radionuclídeos são elementos radioativos das séries do urânio e tório (OYEDELE et al., 2010) que presentes no meios podem causar inúmeros impactos ambientais. Sendo assim, a presença e o comportamento destes rádio-elementos em águas naturais provenientes de diferentes fontes têm sido amplamente estudados em todo o mundo (HAKAM et al., 2001). O Planalto de Poços de Caldas (M.G.) se caracteriza por uma região de elevado background natural de radiação onde se localiza a primeira mina de extração e beneficiamento do urânio do Brasil. A presença de atividades de mineração de urânio causa uma variedade de impactos ambientais e dentre eles a poluição das águas de reservatórios próximos às extrações mineiras por elementos químicos e radionuclídeos (SZPAKOWSKA et al., 2010) acelerados quando se têm adicionalmente a drenagem ácida de mina que causa a acidificação dos corpos de água e dissolução dos elementos químicos disponibilizando-os na coluna d'água (MOSER; WEISSE, 2011).

Os maiores valores de dureza da água e dos elementos químicos: sulfato, fluoreto, manganês, zinco, urânio, tório e ferro total, como já era esperado, foram registrados no LMA CM, quando comparados aos demais valores registrados nos pontos de superfície avaliados (Cab, P41, P14S e RB-S). De acordo com Nascimento et al. (1988), os efluentes líquidos procedentes da UTM/INB, caracterizados quimicamente antes do tratamento, para posterior lançamento no reservatório das Antas, apresentam elevadas concentrações de fluoreto,

sulfato, manganês, zinco, urânio, tório entre outros elementos, concordando com os resultados do presente estudo.

Para os demais pontos de superfície do RA (Cab, P41, P14S) e do RB (RB-S) foi verificada diferença significativa em relação aos valores de dureza da água e dos elementos químicos sulfato, fluoreto, manganês, zinco, urânio, tório e ferro total, quando comparados ao ponto CM. Dentre tais elementos químicos, foi detectado valor de sulfato para o ponto P41, no mês de out/08 de $386,70 \text{ mg.L}^{-1}$ e valores de fluoreto nos pontos Cab de $1,55 \text{ mg.L}^{-1}$, P41 de $3,52 \text{ mg.L}^{-1}$ e P14S de $1,80 \text{ mg.L}^{-1}$, para o mês de out/08 e para o ponto P41 ($1,64 \text{ mg.L}^{-1}$) no mês de jul/09 acima dos limites permitidos pela legislação vigente para água de Classe II Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005) e pela Deliberação Normativa Copam/CERH-MG (BRASIL, 2008). Vale ressaltar que, na UTM/INB (CM), elevadas concentrações de fluoreto e sulfato foram registradas durante todo período de estudo, indicando a presença destes elementos no efluente lançado pela mineradora no RA. Assim, a provável explicação para os valores acima dos limites permitidos para fluoreto e sulfato detectados no reservatório das Antas, no período de out/08, poderia ser devido a uma possível falha no sistema de tratamento do efluente líquido pela UTM/INB, liberando-o antes que houvesse a total sedimentação dos elementos químicos na bacia de decantação.

Por outro lado, para o reservatório Bortolan, as concentrações de fluoreto e sulfato estiveram dentro dos limites fixados pelas legislações vigentes, durante todo período de estudo, fato que pode estar relacionado ao processo de diluição, uma vez que este reservatório se localiza a jusante da RA na Sub-Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, não recebendo diretamente os despejos de efluentes tratados, procedentes da mineradora UTM/INB (FERRARI, 2010).

Para os valores de manganês em todos os pontos de superfície dos reservatórios das Antas e Bortolan, foram registrados valores acima dos limites permitidos pela legislação vigente para água de Classe II (CONAMA 357/05); sendo que, para o RA, tais valores foram mais elevados quando comparados ao RB, uma vez que tal reservatório recebe os efluentes líquidos tratados procedentes do LMA. O metal manganês é considerado um dos elementos essenciais para o Homem, assim como para uma grande variedade de organismos vivos, por ser constituinte de várias enzimas. Tanto a falta quanto o excesso desse elemento pode ser considerado como um fator limitante. Em águas naturais, as concentrações de manganês são inferiores a $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo que exposições prolongadas a esse metal podem causar efeitos

adversos no sistema nervoso, respiratório e outros (NASCIMENTO, 2003). Os resultados do presente estudo confirmam os dados apresentados pelo Projeto ARCAL RLA01/10 (BRASIL, 2009), sobre a qualidade das águas do Ribeirão das Antas, que concluiu que a mineradora de urânio UTM/INB libera, em seu efluente líquido, concentrações elevadas de manganês (cerca de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (FERRARI, 2010). Ronqui (2008) em um estudo realizado no reservatório das Antas, registrou concentrações relevantes de manganês para o mês de fevereiro de 2008 (média = $6,05 \text{ mg.L}^{-1}$), quando comparado aos resultados apresentados nesse estudo.

Para o elemento químico ferro total, os valores registrados nos pontos de superfície do reservatório das Antas variaram de 0,09 a $1,22 \text{ mg.L}^{-1}$; já no reservatório Bortolan, para o ponto RB-S, houve variação de 0,22 a 0,51. De acordo com a Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005), os limites estabelecidos para concentração de ferro total para os corpos aquáticos de Classe II é $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Akoto, Bruce e Darko (2008) que avaliaram o perfil da coluna de água do Reservatório Owabi (Gana) em relação à poluição por elementos químicos, verificaram elevados valores de ferro total, variando de 0,02 a $1,43 \text{ mg.L}^{-1}$. Segundo os autores, todos os elementos químicos avaliados estiveram positivamente relacionados aos valores de pH da água ($\text{pH} = 7,0 - 7,8$), sendo que as maiores concentrações dos elementos químicos avaliados (Fe, Zn, Cu e As) ocorreram na estação de coleta de pH ácido. Segundo Alvarez et al. (2009), menores concentrações de ferro são registradas em locais com pH neutro, enquanto que locais com pH ácidos apresentam concentrações de ferro total mais elevadas. Em ambos os reservatórios, as maiores concentrações de ferro total foram registradas nos meses de jan/09 e abr/09, caracterizados por apresentarem valores de pH mais baixos, o que corrobora as observações de Alvarez et al. Tal padrão também pôde ser observado para os pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F).

Em relação à caracterização química realizada para alguns elementos químicos, como o molibdênio e os metais totais, somente os valores do metal alumínio apresentaram-se acima dos limites previstos pelas legislações vigentes para água de Classe II. Tais valores eram esperados, uma vez que a região do Planalto de Poços de Caldas é rica em bauxita, com inúmeras minas de extração e indústrias do ramo, como a Companhia Brasileira de Alumínio e Alcoa (BARROS et al., 2012; LEONARDI et al., 2010; MORAIS; JIMÉNEZ-RUEDA, 2008) Tal padrão também pôde ser observado para os pontos verticais dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F).

Quanto ao perfil vertical da coluna d'água no reservatório das Antas (P14S, P14M e P14F); foram registrados os maiores valores de dureza da água e concentrações dos elementos químicos sulfato, fluoreto e manganês, uma vez que este corpo de água recebe os efluentes líquidos tratados procedentes da UTM/INB, nos quais antes de sua liberação no meio ambiente passa por tratamento químico para a elevação do valor de pH, utilizando-se hidróxido de cálcio, o que explicaria os elevados valores de dureza. Por outro lado, os maiores valores de sulfato, fluoreto e manganês estejam relacionados com o efluente lançado, uma vez que o ponto P14 localiza-se a jusante do ponto P41, ou seja, a possível liberação do efluente antes que a total precipitação dos elementos químicos ocorra, pôde levar à detecção de maiores concentrações de tais elementos químicos no ponto P14 do reservatório das Antas.

Para o reservatório Bortolan, localizado mais distante do ponto de lançamento dos efluentes, tais elementos, se liberados antes de sua precipitação, já teriam sofrido um processo de diluição até o RB.

De acordo com Baborowski e Bozau (2006), o urânio é comumente encontrado em concentrações muito baixas no ambiente. Entretanto, este metal radioativo pode estar presente em maiores concentrações em algumas regiões como, por exemplo, águas superficiais e subterrâneas, devido às condições geológicas do local. Por estar nas proximidades de uma área mineradora de urânio (Mina Osamu Utsumi), a região do Planalto de Poços de Caldas, bem como suas bacias hidrográficas, apresentam radioatividade natural associada a rochas vulcânicas e depósitos de minerais de urânio (CIPRIANI, 2002; LAGE-FILHO, 1996). Assim, as concentrações de urânio, acima dos limites previstos pelo Ofício nº 50/SLC (junho/1997) da Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN (BRASIL, 1997) detectadas no período de out/08 e abr/09 nos reservatórios das Antas e Bortolan situados nessa região, podem estar relacionadas com a geologia do local, bem como estarem associado às atividades de mineração da UTM/INB (FERRARI, 2010). De acordo com Elbaz-Poulichet et al. (1999), atividades de mineração podem levar ao enriquecimento de metais estáveis e radioativos, como o urânio em águas naturais.

No reservatório das Antas, o ponto P14F apresentou concentrações de urânio de 0,07 mg.L⁻¹, em out/08, valor considerado acima dos limites previstos pelo Ofício CNEN (BRASIL, 1997), pela Resolução 357 do Conama (BRASIL, 2005) e pela Deliberação Copan COPAM/CERH-MG (BRASIL, 2008). No reservatório Bortolan, concentrações acima dos

limites estabelecidos pelo CONAMA 357/05 foram também detectadas no período de out/08, nos pontos RB-M e RB-F, que apresentaram concentrações no valor de $0,052 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,062 \text{ mg.L}^{-1}$. Dados sobre a toxicidade do urânio em ambientes aquáticos são escassos e diversos estudos têm apontado que a toxicidade desse elemento é dependente de muitas variáveis, principalmente pH e íons carbonato (POSTON; HANF JR.; SIMMONS, 1984). De acordo com Antunes et al. (2007), o urânio é uma das maiores preocupações, uma vez que é considerado potencialmente tóxico para a biota de água doce.

Com base em testes ecotoxicológicos, aplicados em alguns invertebrados de água doce, Sheppard et al. (2005) definiram que o limite máximo da concentração de urânio na água sem causar efeito tóxico para os invertebrados é $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ U (concentração previsível sem efeito - PNECs). Assim, as concentrações de urânio detectadas na água nos pontos CM, P14F, RB-M e RB-F no presente estudo, poderiam causar efeito tóxico nos invertebrados planctônicos. Vale ressaltar que, de acordo com Poston, Hanf Jr. e Simmons (1984), o elemento químico urânio apresenta alta tendência para solubilização em condições ácidas e transporte na água, sendo caracterizado pelo seu alto potencial tóxico, prejudicial para os organismos aquáticos expostos a efluentes procedentes de mina de urânio. Assim, o potencial efeito tóxico do urânio sobre a biota aquática foi verificado, principalmente, no ponto CM na UTM/INB, que apresentou condições ácidas durante todo período de estudo, permitindo a maior solubilidade desse elemento na água, o que pode estar relacionado com os menores valores de diversidade ecológica dos organismos protozooplânctônicos registrados.

6.2 Variáveis bióticas

6.2.1 Perfil longitudinal

Os conhecimentos sobre a estrutura das cadeias alimentares pelágicas vêm alterando-se, desde os anos 1980. O conceito tradicional de cadeia alimentar fitoplâncton - zooplâncton foi completado pelo conceito de elo microbiano, baseado no mecanismo de consumo da MOD pelos micro-organismos que transformam parte desta fração dissolvida de carbono em MOP. Assim, o carbono, que se encontrava inacessível aos organismos, é reintroduzido nas teias alimentares (AZAM et al., 1983). Sendo assim, há um número crescente de estudos

sobre o funcionamento de teias alimentares pelágicas que incluem a importância de protozoários e bactérias (AUER et al., 2004). Neste contexto, este estudo contemplou a comunidade de protozoários planctônicos, bactérias planctônicas e a estimativa de biomassa fitoplanctônica. Tais resultados foram utilizados para uma caracterização biológica dos ambientes estudados, bem como para uso de possíveis indicadores ambientais de qualidade da água e bioindicadores na avaliação da influência dos efluentes procedentes do LMA da Cava da Mina de Urânio Osamu Utsumi, sobre a qualidade da água dos reservatórios das Antas e Bortolan.

No presente estudo, dentre os gêneros de protozoários planctônicos registrados, a maior parte dos protozoários pertenceu ao filo dos Ciliophora, porém foram registrados Amoebozoas, Ochrophytas e Heliozoas. De acordo com Regali-Selegheim et al. (2011), listagens de espécies são importantes para o conhecimento da biota de um local, sua ecologia, possibilitando dimensionar sua exploração econômica, biotecnológica e conservação. Os autores levantaram dados de protozoários (ciliados, amebas nuas, amebas com carapaça, heliozoários e flagelados heterotróficos) de água doce do Estado de São Paulo. De 75 ambientes analisados, foi registrado um total de 471 diferentes taxas de protozoários distribuídos em 218 gêneros e 304 espécies. Dos grupos de protozoários avaliados, os mais bem representados foram os ciliados com 160 gêneros e 219 espécies. Estudo nos reservatórios das Antas e Bortolan e na CM os ciliados também foram o grupo dominante.

Em relação aos tipos nutricionais, ou seja, fontes de alimento preferenciais dos protozoários identificados no ponto CM e nos pontos de superfície dos reservatórios das Antas e Bortolan, a fonte de alimento preferencial foi primeiramente para o tipo "omnívoros". Tais organismos não possuem uma preferência alimentar específica, se alimentando de inúmeras fontes de alimento disponíveis no meio ambiente, o que lhes proporciona maiores condições de prosperar no sistema, frente a possíveis limitações de fontes de alimento. O segundo tipo nutricional predominante foram os bacterívoros/algívoros (bac/alg): tais protozoários se alimentam preferencialmente de bactérias e algas. De acordo com Sherr e Sherr (1994) e Regali-Selegheim et al. (2011), várias espécies de protozoários ciliados e flagelados são capazes de consumir algas, cianobactérias e outros protozoários flagelados, tendo funções semelhantes às dos organismos metazoários.

Em relação à frequência de ocorrência (dada pelo índice de constância de Dájoz - ICD) dos táxons pertencentes à comunidade protozooplanctônica, os protozoários planctônicos classificados como constantes, ou seja, ocorrendo em mais de 50% das amostras, foram *Campanella umbellaria*, *Urotricha* sp., *Strombidium* sp. e *Enchelys* sp.. Alimentam-se de bactérias/algas, de bactérias/flagelados, de diatomáceas/algas/bactérias (ki/alg/bac) e omnívora, respectivamente, concordando com as preferências alimentares citadas anteriormente. Tais organismos contemplam uma ampla faixa de fontes nutricionais. Regali-Selegim (2001) também verificou dominância do tipo nutricional bac/alg no Reservatório do Monjolinho (São Carlos – SP). Segundo o autor, a predominância desse tipo nutricional no ecossistema aquático foi atribuída à facilidade de adaptação dos protozoários bacterívoros/algívoros frente às flutuações na disponibilidade de alimento, ora se alimentando de organismos autotróficos, ora do bacterioplâncton. Em uma revisão sobre a importância da predação exercida pelos protozoários na rede alimentar microbiana, em oceanos e em ambientes de água doce, Sherr e Sherr (2002) citaram que os estudos realizados na região pelágica têm confirmado que os principais responsáveis pela mortalidade do bacterioplâncton são os protistas. Por outro lado, os omnívoros, provavelmente alimentem-se concomitantemente de algas e de outros como pequenos flagelados autotróficos e heterotróficos, protozoários menores, metazoários menores, ovos de metazoários e pequenos crustáceos (FOISSNER; BERGER; SCHAUMBURG, 1999; SHERR; SHERR, 2000). Packroff (2000) detectou, nas águas de um LMA (pH variando de 4,5 – 6,0) e com baixa concentração de nutrientes (Lago Cospuden, Alemanha), que as Classes Prostomatida (*Urotricha* sp.) e Peritrichia (*Vorticella* sp.) foram dominantes. Weisse e Stadler (2006) relataram que as espécies de ciliados do gênero *Urotricha* sp. apresentaram diferentes níveis de tolerância em relação aos valores de pH nos corpos aquáticos, o que influencia e facilita a sua distribuição em diversos ambientes aquáticos com características físicas e químicas variáveis.

Em relação aos valores de densidade e biomassa dos protozoários planctônicos, o maior número de indivíduos e a maior massa corpórea (biomassa) foram verificados no reservatório Bortolan para o ponto de superfície (RB-S: densidade = 25×10^4 ind.L⁻¹, biomassa = $43,1688 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$); no RB-S também foram verificados os maiores valores de concentração de clorofila *a*, nutrientes, densidade bacteriana (RB-S = 1×10^9 ind.L⁻¹) e biomassa fitoplanctônica (RB-S = $165222 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$); também se verificou a menor

incidência de valores das variáveis físicas e químicas, acima dos limites previstos pela Resolução 357 do Conama (BRASIL, 2005) e as melhores condições para os valores de pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica da água, evidenciando uma melhor qualidade da água neste corpo aquático propiciando a maior proliferação dos micro-organismos avaliados e manutenção da cadeia alimentar planctônica. Seguido do reservatório Bortolan (RB-S), a UTM-INB no ponto CM apresentou o segundo maior valor de densidade protozooplanctônica ($CM = 3,4 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$) e o RA o terceiro maior valor de densidade nos pontos de superfície, P14S ($3,6 \times 10^4 \text{ ind.L}^{-1}$). O mesmo comportamento foi verificado para os valores de biomassa do protozooplâncton, seguido do RB-S; o ponto CM apresentou o segundo maior valor de biomassa protozooplanctônica ($284,6325 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$) e, o reservatório das Antas apresentou o terceiro maior valor no ponto P14S ($6,4733 \mu\text{g C} \times 10^2 \cdot \text{L}^{-1}$). No ponto Cab, seguido do ponto P41, foram registrados os menores valores para densidade e biomassa de organismos protozooplanctônicos. A maior densidade e biomassa de protozoários no RB corroboram com as melhores condições físicas e químicas da água deste ambiente, bem como com as maiores concentrações de nutrientes e os maiores valores de densidade bacteriana e biomassa fitoplanctônica.

Por outro lado, os elevados valores de densidade e biomassa de protozoários no LMA CM podem ser explicados tanto pela capacidade de tolerância destes organismos frente às características físicas e químicas extremas ali presentes, quanto por um processo de adaptação bem sucedido de táxons específicos de protozoários planctônicos presentes na Cava da Mina, uma vez que tais organismos mostraram sucesso ao se reproduzirem e se alimentarem frente às condições ambientais neste lago de mina, onde, em geral, foi registrado o menor valor de densidade bacteriana e o maior valor de biomassa fitoplanctônica. De acordo com Eriksson et al. (1980); Kalin et al. (2001); Klapper e Schultze (1995); Nixdorf et al. (1998) muitos lagos de mina, devido às condições de vida estressantes (disponibilidade de luz, concentração de metais, nível dos nutrientes e pH), as comunidades consistem de táxons restritos, muitas vezes dominados por micro-organismos como bactérias, algas, fungos e protozoários. Tal fato corrobora com os valores de índice de diversidade verificados neste estudo, onde em geral, os menores valores de diversidade de protozoários foram registrados no ponto CM, quando comparados aos demais pontos de superfície. Moser e Weisse (2011) descreveram, em um LMA, na Áustria, que, como consequência das severas condições ambientais, a biodiversidade nestes ambientes é

reduzida a poucas espécies. Ainda segundo os autores, predadores de topo como peixes são completamente ausentes; a abundância de bactérias heterotróficas é aproximadamente uma ordem de magnitude menor do que em lagos mesotróficos e eutróficos neutros; a comunidade fitoplanctônica, nestes lagos de mina ácidos, é geralmente dominada por flagelados pertencentes às clorófitas, crisofíceas, criptofíceas e euglenofíceas; os protozoários ciliados não possuem papel principal na cadeia alimentar destes lagos, sendo os protozoários pertencentes aos Heliozoa, os que atuam como predadores de topo. No zooplâncton, ocorrem poucos rotíferos e alguns crustáceos como o *Chydorus sphaericus*. A descrição citada por Moser e Weisse corrobora, totalmente, com o verificado na Cava da Mina, onde foram verificados heliozoários, organismos que se alimentam de flagelados e a presença de ciliados na CM, bem como a menor ocorrência de organismos zooplanctônicos, como observado em Ferrari, (2010). Estes últimos poderiam exercer dois papéis junto à comunidade protozooplanctônica, como competidores pelas mesmas fontes de alimento e outro como predador de protozoários. A menor ocorrência de tais organismos da comunidade zooplanctônica também seria um dos fatores que pode ter contribuído para o sucesso dos protozoários.

Quando comparados os valores de densidade e biomassa de protozoários planctônicos registrados no ponto CM aos de densidade e biomassa no ponto de lançamento dos efluentes tratados, ou seja, ponto P41, o LMA apresentou maiores valores. Tal resultado pode ser um indicativo de que o lançamento dos efluentes tratados procedentes da UTM/INB, no RA, esteja causando possíveis alterações na população de protozoários uma vez que os gêneros de protozoários identificados no CM não são, em sua maioria, os mesmos detectados no ponto P41. De acordo com Dias et al. (1999), Lugo et al. (1991); Madoni (1993); Madoni (2005), os ciliados são organismos sensíveis a alterações ambientais e eficientes bioindicadores de poluição ambiental, tanto orgânica (LUGO et al., 1991; LEE et al., 2004; MADONI, 1993) quanto inorgânica (DIAS et al., 1999; MADONI; ROMEO, 2006); sendo assim, características químicas, presentes nos efluentes liberados no ponto P41, poderiam interferir na biologia da comunidade protozooplanctônica do RA.

Os menores valores de densidade e biomassa do protozooplâncton registrados, em geral, nos pontos de superfície do RA (Cab, P41 e P14S), quando comparados ao ponto CM e ao RB, possivelmente estão relacionados tanto com os efluentes lançados neste corpo de água quanto com as características tróficas do sistema, sendo um ambiente de baixa

produtividade e oligotrófico. Mieczan (2007) realizou um estudo sobre as relações entre os protozoários ciliados e a qualidade química da água em pequenos reservatórios de turfeiras (Łęczna-Włodawa Lakeland, Polônia Oriental). O autor relatou que a maior biomassa de ciliados ocorreu em reservatórios apresentando valores de pH baixos, ou seja, próximos a acidez. De acordo com o autor, os resultados sugeriram que a condutividade elétrica da água e o pH foram os fatores mais importantes para os ciliados planctônicos nos reservatórios, de turfeiras. Sendo assim, Mieczan concluiu que nestes reservatórios de turfeiras com baixos valores de pH, a principal variável que dirigiu a distribuição dos ciliados foi esta variável, enquanto que nos reservatórios com valores de pH mais elevados, o papel da matéria orgânica e a disponibilidade de nutrientes como o fósforo tornaram-se, cada vez mais importantes com o aumento de pH.

Dentre os pontos de superfície dos três corpos de água avaliados, os menores valores de densidade bacteriana foram registrados no ponto P14S abr/09 ($0,057 \times 10^9 \cdot L^{-1}$) e no ponto CM (CM abr/09= $0,062 \times 10^9 \cdot L^{-1}$). Provavelmente, um processo mais intenso de pressão de predação da comunidade protozooplânctônica sobre as bactérias presentes nos pontos P14S e CM seria um dos fatores responsáveis pelos menores valores de densidade bacteriana nestes pontos. Um possível déficit de matéria orgânica não seria o fator predominante no declínio da comunidade bacteriana nos pontos P14S e CM, já que nestes locais foram verificados elevados valores de biomassa fitoplânctônica para o mês de abr/09. De acordo com Moser e Weisse (2011), a ingestão de bactérias em lagos de mina ácidos é realizada por diversos organismos como os flagelados do gênero *Ochromonas* sp., os heliozoários, os ciliados e os rotíferos.

Em relação aos valores de biomassa fitoplânctônica, o maior valor foi registrado no reservatório Bortolan (RB-S = $16,5222 \mu g C \cdot 10^2 \cdot L^{-1}$), seguido do ponto CM (= $7,2025 \mu g C \cdot 10^2 \cdot L^{-1}$). Kalin et al. (2001) descrevem que, em lagos de cava de mina ácidos, o principal produtor primário é o fitoplâncton e que a biomassa deste, nestes locais, é limitada principalmente pela disponibilidade de nutrientes e não por valor ácido de pH. Segundo Kumar et al. (2011), em seu estudo, em um lago de Cava de Mina de Carvão (Oeste da Austrália) comprovaram que a limitação de nutrientes foi a principal limitação para o crescimento da biomassa algal no lago de cava de mina Collie, que possuía águas moderadamente ácidas, não devido à toxicidade dos metais e/ou o pH da água. Moser e Weisse (2011) também concluíram que a pressão de predação sobre o fitoplâncton, em

lagos de mina ácidos na Alemanha, foi menor quando comparados à pressão de predação sobre o bacterioplâncton.

Outro fator, que pode ter contribuído para as maiores biomassas algais no RB e no CM, seria o maior aporte de fósforo nestes ambientes, bem como a melhor razão proporcional de Redfield entre N:P para estes dois corpos de água, que corroboram com a hipótese de que a maior disponibilidade de nutrientes na coluna de água favorece a maior biomassa algal. Mesmo o fósforo tendo atuado como um fator limitante, foi mais expressivo no RA (111N:1P) em comparação ao RB (28,7N:1P) e ao CM (64N:1P).

A Cava da Mina juntamente com os pontos de superfície dos reservatórios das Antas (Cab, P41 e P14S) e Bortolan (RB-S) apresentaram diferenças em relação às variáveis físicas, químicas e comunidades protozooplanctônicas, bacterioplanctônicas, bem como para a estimativa de biomassa fitoplanctônica, confirmadas pelas análises de componentes principais (PCA) e de correspondência canônica (CCA).

De acordo com a análise de componentes principais, pôde-se distinguir claramente os três corpos de água avaliados neste estudo, onde o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi foi o ambiente mais extremo, apresentando relações positivas com os elevados valores para as variáveis químicas e os menores valores de pH, bem como relação positiva com os maiores valores de biomassa protozooplanctônica. Por outro lado, o reservatório das Antas caracterizou-se como um ambiente intermediário entre o CM e o RB, estando relacionado tanto aos nutrientes, a exemplo o N total, clorofila *a*, aos micro-organismos avaliados, valores de pH, quanto às variáveis químicas, durante o período de estudo. Provavelmente, a pior qualidade da água no RA esteja fortemente relacionada à influência dos efluentes da mineradora UTM/INB que, provavelmente, liberou o efluente tratado em condições inadequadas. O reservatório Bortolan demonstrou ser o corpo de água com melhor qualidade química da água, estando fortemente relacionado aos nutrientes, à clorofila *a*, aos elevados valores de densidade do protozooplâncton e bacterioplâncton e biomassa fitoplanctônica, bem como aos maiores valores de pH. O RB apresentou correlação totalmente negativa com relação aos metais pesados.

De acordo com Ferrari (2010), no reservatório Bortolan as maiores concentrações de nutrientes e clorofila *a* associadas aos baixos valores de condutividade elétrica da água, dureza, sulfato, fluoreto explicaram a maior densidade de organismos zooplanctônicos e,

portanto, a melhor qualidade da água nesse ambiente, quando comparada a UTM/INB e ao reservatório das Antas.

Por outro lado, de maneira geral, verificou-se que o reservatório das Antas recebe maior interferência da mineradora UTM/INB, sendo impactada por efluentes de origem inorgânica. Já o reservatório Bortolan, por estar sob influência da malha urbana da cidade de Poços de Caldas, sofreria maior influência de efluentes de origem orgânica, como evidenciado nas análises estatísticas.

Em relação aos resultados obtidos para a análise de correspondência canônica, frente às variáveis abióticas e os valores de densidade dos gêneros da comunidade protozooplânctônica, foi possível detectar um padrão de distribuição dos gêneros de protozoários planctônicos ao longo dos pontos de superfície dos três corpos de água avaliados neste estudo. Foi observado que certas propriedades químicas da água mostraram um efeito positivo e/ou nenhum efeito prejudicial acentuado na estrutura da comunidade de protozoários identificados no LMA (CM), evidenciando organismos tolerantes a tais condições ambientais. Ledin e Pedersen (1996), que avaliaram os impactos ambientais dos rejeitos de mineração e o papel dos micro-organismos presentes nestes rejeitos, inferiram que a ocorrência de organismos eucarióticos com elevada abundância como as *Amoeba* sp. Poderiam atuar como eficientes predadores de bactérias presentes nos lixiviados, ou seja, sobre bactérias oxidantes de ferro. Kamjunke et al. (2004) que avaliaram as diferenças verticais na composição do plâncton de um lago de mina extremamente ácido registraram a presença de heliozoários como o *Actinophrys sol* predador de topo e alguns poucos ciliados e rizópodos (amebas). Tais informações corroboram com os gêneros de protozoários identificados no ponto CM e agrupados positivamente com as variáveis químicas nos resultados da CCA. Kihlman e Kaupila (2010) ainda citam que os efeitos ecológicos dos metais podem ser suprimidos em meio ambientes de mineração devido à adaptação da biota aquática local, para suportar, naturalmente, os elevados níveis dos metais.

Por outro lado, foi verificada a forte relação de alguns gêneros de protozoários aos nutrientes e à matéria orgânica (*Tintinnidium* sp., *Holophrya* sp., *Stokésia Vernalis*, *Strobilidium* sp., *Codonella cratera*, *Ameba-Arcella* sp. e *Monodinium balbiani*) para os pontos P14S jul/09, P41 jul/09, RB-S jul/09 e RB-S abr/09 (estação seca e fria). De acordo com Finlay e Esteban (1998), o "grazing" (pastagem) exercido pelos protozoários sobre os micro-organismos, principalmente sobre o bacterioplâncton da coluna d'água parece

estimular toda a comunidade microbiana, possivelmente pelo aumento da taxa de rotatividade dos nutrientes essenciais presentes na água, que, de outra forma, permaneceriam aprisionados na biomassa bacteriana. Assim, a pastagem realizada pelos protozoários estimularia a velocidade de decomposição da matéria orgânica.

6.2.2 Perfil vertical

Para obter uma melhor compreensão das fontes de variabilidade que afetam a estrutura das comunidades planctônicas é necessário investigar os ecossistemas aquáticos de maneira individual, porém, ao mesmo tempo, permitindo avaliar, concomitantemente, a composição taxonômica da comunidade planctônica (ESCHEVARRÍA et al., 1990). No presente estudo foram estudados, os perfis verticais da coluna d'água dos reservatórios das Antas e Bortolan a fim de detectar possível influencia da mineradora UTM/INB a jusante do ponto de lançamento dos efluentes, ou seja, no ponto P14 do reservatório das Antas e no Bortolan.

De acordo com a composição taxonômica dos protozoários planctônicos, identificados nestes dois reservatórios, os pertencentes ao Filo Ciliophora foram dominantes no RA e no RB, apenas com a presença de um representante do Filo Amoebozoa (*Arcella* sp.) no RB. Segundo Beaver e Crisman (1989), lagos oligotróficos possuem uma modesta densidade de protozoários ciliados ($< 10 \text{ ind.mL}^{-1}$). Por outro lado, em lagos mais produtivos este valor é expressivamente mais elevado. Segundos os autores, três substituições ocorrem nos ambientes de água doce, conforme o grau de trofia se eleva: as ordens de ciliados Haptorida (ex: *Mesodinium* e *Askenásia*), Scuticociliatida (ex: *Cyclidium*), Oligotrichida (ex: *Strombidium*, *Strobilidium* e *Halteria*) tipicamente dominam o plâncton com a elevação do grau de trofia. Os Oligotrichas geralmente são a ordem dominante em lagos oligotróficos e em lagos sub-tropicais oligotróficos, pequenos ciliados (18 a 24 μm) são os mais importantes no plâncton. Muitos táxons de protozoários são ubiquamente distribuídos na maioria dos ambientes de água doce, como o ciliado *Strombidium viride* (ordem Oligotrichida).

Beaver e Crisman, em estudo prévio, de comunidades de ciliados planctônicos, em lagos sub-tropicais de água levemente ácidas (pH 4,7 - 6,8), notaram que a abundância e a biomassa dos ciliados diminuíram com o aumento da acidez, havendo uma nítida redução nos lagos com pH $< 5,0$. As ordens Oligotrichida, Haptorida e Scuticoliliatida co-dominavam a

comunidade de ciliados nos lagos, com valores de pH > 5,0, mas, com o passar do tempo, foram substituídas pelos oligotrichidas. Em adição, foi observada uma substituição da composição de ciliados menores (20 - 30 µm) por ciliados maiores (40 - 50 µm) com o aumento da acidez da água. No presente estudo, protozoários das ordens Oligotrichida (*Strombidium* sp. e *Strobilidium* sp.) e Haptorida (*Askenásia* sp., *Enchelys* sp., *Mesodinium* sp., *Monodinium balbiani* e *Paradileptus elephantinus*) foram organismos considerados dominantes juntamente com outras ordens de ciliados, concordando com as características citadas por Beaver; Crisman, para lagos oligotróficos e com menores valores de pH.

Em relação aos tipos nutricionais, ambos os reservatórios apresentaram a dominância dos protozoários omnívoros, seguidos dos bacterívoros/algívoros. Provavelmente, o amplo espectro de fontes de alimento seja um dos fatores de sucesso e necessário para tais organismos em ambientes com baixo grau de trofia como é o caso dos reservatórios estudados. O que vêm a concordar com os resultados para o índice de frequência de ocorrência de Dajóz; todos os gêneros de protozoários que foram classificados como constantes (ocorrendo em mais de 50% da amostra) apresentaram preferência alimentar ampla, ou seja, omnívora, seguidos de bacterívora, algívora e também a mixotrofia, no caso do ciliado *Stokésia vernalis*.

Estudos sobre os fatores que dirigem e controlam as comunidades pelágicas em lagos, e a disponibilidade de recursos tais como os nutrientes e a luz (controle bottom-up) ou a pressão de predação (controle top-down) e como a relativa importância destes dois controles altera-se ao longo de um gradiente nutricional são de extrema importância em ambientes de água doce. Vários autores ainda adicionam o efeito em cascata sobre a estrutura trófica pelágica (controle top-down), diminuindo com o aumento dos níveis dos nutrientes, enquanto outros acreditam que o papel regulatório do controle top-down seja mais pronunciado em lagos ricos, nutricionalmente. Além da influência da concentração dos nutrientes no meio, análises de dados de um grande número de lagos têm indicado que o controle top-down é o mais importante em lagos rasos (JEPPESEN et al., 2000). No presente estudo, o controle do tipo top-down foi evidenciado no perfil vertical do reservatório das Antas para o protozooplâncton sobre o bacterioplâncton e, talvez, um controle do tipo bottom-up também ocorreu neste reservatório. De acordo com os valores de nutrientes, matéria orgânica, concentração de clorofila *a* e índice de estado trófico, o RA é produtivamente pobre, o que funcionaria como um controle bottom-up para o

bacterioplâncton, exercendo consequência direta sobre o protozooplâncton também. Em um corpo de água com tais características nutricionais, maior competitividade pelas mesmas fontes de alimento unidas a fatores abióticos desfavoráveis, como é o caso do RA, devido ao lançamento dos efluentes líquidos tratados procedentes da UTM/INB, traduz-se em um ambiente extremamente estressante para a microbiota, o que explicaria os menores valores de densidade e biomassa protozooplanctônica neste sistema aquático.

Por outro lado, para o reservatório Bortolan houve a diminuição do efeito cascata do controle do tipo top-down do protozooplâncton sobre o bacterioplâncton, ou seja, a pressão de predação exercida pelos protozoários não levou à diminuição do número de células bacterianas e, assim, com o aumento do grau de trofia do corpo de água, o controle top-down tornou-se menos pronunciado.

Para os resultados obtidos para o perfil vertical dos reservatórios das Antas e Bortolan foi verificada relação positiva entre os valores de biomassa fitoplanctônica e biomassa do protozooplâncton, com exceção dos meses de abr/09 e jul/09 para o RB. Provavelmente uma relação de pressão de predação dos protozoários sobre as algas, levando à diminuição dos valores de biomassa fitoplanctônica, bem como menores temperaturas do ar e da água, menor incidência luminosa e menor índice pluviométrico, uma vez que os meses de abril e julho foram caracterizados como uma estação fria e seca. Por outro lado, para o mês de abr/09, no RB, foram verificados valores de molibdênio, manganês, zinco e ferro total, em maiores concentrações em todo o perfil vertical da coluna d'água.

Os limites previstos pelas legislações vigentes para água de Classe II (CONAMA 357/05 e COPAM 2008) (BRASIL, 2005; 2008) para Mn é de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, Fe de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, Zn de $0,18 \text{ mg.L}^{-1}$ e a WHO prevê para Mo, o limite de $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ para água potável. Dentre estes elementos, somente o zinco apresentou-se abaixo dos limites para todos os outros foram detectados valores acima do recomendado. Sendo assim, possíveis efeitos tóxicos destes elementos sobre o plâncton no RB, para o mês de abr/09, pode ter interferido na dinâmica da comunidade protozooplanctônica, bem como para a fitoplanctônica. Elementos-traço e metais potencialmente tóxicos denotam um dos mais sérios problemas de poluição ambiental devido à sua toxicidade, persistência no meio e bioacumulação dentro da cadeia alimentar aquática, bem como possibilidade de posterior toxicidade indireta à vida humana (GREANEY, 2005).

A avaliação do perfil vertical dos reservatórios das Antas (P14S, P14M e P14F) e Bortolan (RB-S, RB-M e RB-F) apresentaram diferenças em relação às variáveis físicas, químicas e das comunidades protozooplanctônicas, bacterioplanctônicas, bem como para a estimativa de biomassa fitoplanctônica, confirmadas pelas análises de componentes principais (PCA).

Em geral, de acordo com o gráfico de PCA, houve homogeneidade entre os diferentes pontos de amostragem, ao longo da coluna d'água de ambos os reservatórios, ou seja, a coluna de água do RA não possui diferenças significativas entre superfície, meio e fundo o mesmo foi verificado para o RB.

Sazonalmente, foi extremamente acentuada a distinção entre os meses de out/08 (início das primeiras chuvas de verão) e jul/09 (estação seca e fria) e os meses de jan/09 (estação quente e úmida) e abr/09 (período seco e de menores temperaturas) para ambos os reservatórios. Tais diferenças podem estar associadas tanto pela questão meteorológica quanto pela detecção de elevados valores de concentração para as espécies químicas, acima dos limites previstos pela legislação vigente, nos meses de out/08 e jul/09.

Espacialmente, pôde-se observar que o reservatório das Antas difere totalmente do reservatório Bortolan. O RA possui correlações com as variáveis químicas, os menores valores de pH da água e elevados valores de nitrogênio total, sendo um dos fatores limitantes do fósforo neste sistema e o RB possui correlações positivas com as variáveis abióticas de matéria orgânica, clorofila, fósforo, maiores valores de pH da água e os maiores valores para a densidade e a biomassa das comunidades protozooplanctônicas, bacterioplanctônicas e fitoplanctônicas, evidenciando sua melhor qualidade da água para a manutenção da vida lacustre.

6.3 Índices

6.3.1 Índice de estado trófico

De acordo com os resultados obtidos para o índice de estado trófico, descritos, por Toledo et al. (1983), utilizando-se as variáveis fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila *a*; o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi foi classificado como oligotrófico no mês de out/08 e como eutrófico para os demais meses, ou seja, jan/09, abr/09 e jul/09. Analisando-

se os valores de fósforo total e de clorofila *a*, tais valores realmente foram mais elevados, a partir do mês de jan/09, quando comparados ao mês de out/08.

Provavelmente, estas variáveis foram as responsáveis pela elevação do estado trófico do lago ácido de óleo para eutrófico, visto que concentrações elevadas de fósforo geralmente aceleram a eutrofização de corpos de água doce. De acordo com Kleeberg e Grüneberg (2005), para grandes corpos de água doce neutro e acidificados, conhecimentos sobre poluentes transportados pelo ar como o fósforo já são bem conhecidos, porém, ainda há uma lacuna sobre o papel do fósforo como um nutriente chave em lagos de mineração acidificados pela drenagem ácida de mina, dentre outros fatores. É importante seu conhecimento, porque muitos lagos de mina estão sujeitos ao rápido enriquecimento por fósforo por medidas ecotecnológicas (alcalinização e neutralização do lago) ou pelas inundações com águas de rios com características mais alcalinas, numa tentativa de elevar os valores de pH de tais lagos de mina. Mudanças nas condições pelágicas e bentônicas (por exemplo, pH, potencial redox, C, e fornecimento Fe) ocorrem através do desenvolvimento natural ou devido à manipulações antropogênicas também afetam a mobilidade do fósforo nestes ecossistemas (KLEEGERG; GRÜNEBERG, 2005).

Boehrer et al. (2013); Geller et al. (2013), também afirmaram que o fósforo, em lagos ácidos de mineração, exerce um importante papel nos ciclos biogeoquímicos, porém o papel do fósforo como um nutriente não é adequadamente considerado. Segundo os autores, lagos de mina ácidos são caracterizados geralmente por baixas concentrações pelágicas de fósforo (em torno de 5 - 38 $\mu\text{g.L}^{-1}$; dados obtidos a partir de 23 lagos de mina ácidos por Nixdorf et al., 1998); estes lagos são geralmente classificados como oligotróficos (NIXDORF et al., 1998 e 2003). Tais valores foram condizentes aos registrados na cava da mina neste estudo (P total CM = 5,6 - 17,95 $\mu\text{g.L}^{-1}$) porém sendo classificada como eutrófica, de acordo com o índice de estado trófico de Toledo et al.

Boehrer et al. (2013) distinguiram os lagos de mina ácidos classificados como Eutróficos os que possuíam elevadas concentrações de fósforo total ($> 42 - 230 \mu\text{g.L}^{-1}$), ocorrendo geralmente em lagos de mina ácidos meromíticos ou segundo Woelfl et al. (2000), comprometidos por esgotos domésticos. Tais valores relatados por Woelfl et al. (2000) são várias ordens de grandeza maiores que os verificados no LMA Cava da Mina Osamu Utsumi para os meses de jan/09, abr/09 e jul/09 não condizendo com os valores verificados na cava da mina, que estaria mais próxima da oligotrofia, segundo estes autores.

Boehrer e Schultze (2006) já alertavam para questões como a vulnerabilidade dos lagos de mina em todo o mundo, frente ao aporte de fósforo, proveniente de inundações externas dos fluxos de rios. Lessman et al. (2003) citaram, outro fator impactante ligado ao aporte de fósforo o possível enriquecimento por medidas de remediação destes lagos ácidos utilizando-se deste por nutrientes e matéria orgânica levando a uma eutrofização artificial e saprobiose do sistema e Axler et al. (1996, 1998); Rümmler et al. (2005) e Yokom et al. (1997) citaram a emissão de poluentes provenientes de fazendas de cultivo de peixes como outro fator enriquecedor de lagos de mina ácidos por fósforo sendo uma preocupação presente e futura.

Assim, a previsão do real estado trófico destes lagos originados de explorações mineiras requer o conhecimento dos mecanismos de entrada e acumulação do fósforo em relação a outras substâncias, durante o processo de sucessão destes lagos de mina ácidos, particularmente sobre a precipitação e fixação do fósforo pelágico, sobre a diagênese bentônica do fósforo e os aspectos de mobilidade conhecidos por influenciar a retenção e a disponibilização na zona pelágica dos lagos de mina ácidos (BOEHRER et al., 2013).

A aplicação do índice de estado trófico descrito por Toledo et al. (1983) não foi uma ferramenta adequada para classificar o estado trófico do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi, pois não possui a sensibilidade necessária para classificar, com maior exatidão, o grau de trofia de tal sistema aquático, pois os valores de clorofila *a* e fósforo, citados na literatura para lagos de mina ácidos, não condizem com a classificação de eutrofização descrita por Toledo et al. (1983). Sendo assim, serão necessários maiores estudos para o reconhecimento dos processos internos e externos que ocorrem e afetam tais ambientes, propiciando assim a formulação de um índice específico para tais lagos. Fatores como o tipo de rocha e o minério que foi extraído, a origem das águas que o preencheram, águas subterrâneas ou influxo de rios, o tipo de vegetação, solo e atividades antrópicas no entorno, traduzindo-se em outras fontes poluidoras, além das relacionadas a tais lagos de mina ácido e; que elementos possam estar sendo carreados para o interior do lago pelas chuvas. A presença da drenagem ácida de mina e de tratamentos para neutralização ou alcalinização das águas do lago de mina também são fatores importantes; não obstante, conhecimentos sobre a composição do sedimento do lago, o que é depositado e o que é reabsorvido é de suma importância, já que inúmeros processos de eutrofização se iniciam pela presença de

condições anóxicas na região do hipolimínio do lago e pela sedimentação de elementos químicos, como o fósforo, o alumínio, o ferro, dentre outros (BOEHRER et al., 2013).

Além de tais fatores, não podemos deixar de citar a importância da rede trófica microbiana presente em tais lagos de mina ácidos, que atuam diretamente nos processos de oxidação e redução de elementos, absorção e adsorção de outros, remineralização e decomposição (BOEHRER et al., 2013).

Outra explicação para o processo de enriquecimento de um LMA ou o manutenção de seu grau de trofia abaixo do esperado seria segundo Boehrer et al. (2013); Geller et al. (2013), através da entrada de água do rio que o suplementa (água mais alcalina) que é necessária para muitos lagos de mina ácidos, como uma medida contínua de gestão para amenizar a acidez, como ex. Senftenberger See - lago de mina Dreizeibern; ou ainda a utilização dos lagos de mina ácidos como reservatórios de descargas de efluentes de origens diversas, realizando o tamponamento de tais poluentes. Os autores mostraram que os lagos de mina ácidos podem compensar tais cargas de nutrientes adicionais (por ex. 20% no caso do lago de mina Dreizeibern) por uma elevada retenção de fósforo, dependendo do grau de impacto sofrido, mantendo, assim, um estado de mesotrofia ou oligotrofia, mesmo frente a descarga de efluentes que deveriam elevar seu grau de trofia.

Como uma medida comparativa, após constatar que a cava da mina neste estudo foi classificada como eutrófica, nos meses de janeiro, abril e julho de 2009, frente ao índice de estado trófico descrito por Toledo et al. (1983), foi calculado o índice de estado trófico segundo Carlson (1977), como pode ser visualizado na tabela abaixo (Tabela 14), onde foram obtidos os valores médios de IET = 19,8 para clorofila *a* e de IET = 39,7 para fósforo total, indicando oligotrofia e oligo-mesotrofia, respectivamente, adequando-se melhor ao citado na literatura e aos valores de fósforo e clorofila *a* verificados neste lago de mina, que não são considerados elevados, a ponto de classificar este corpo de água como eutrofizado organicamente.

Tabela 14 - Índice de Estado Trófico descrito por Carlson (1977) para os valores de clorofila *a* e fósforo total do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi.

IET Carlson (1977)	Cava da Mina Osamu Utsumi				
	Meses	Clorofila <i>a</i>	Classificação	Fósforo total	Classificação
	Out/08	0,0	Oligotrófico	29,0	Oligotrófico
<i>IET < 30: oligotrófico</i>	Jan/09	17,1	Oligotrófico	37,9	oligo-meso
<i>IET 30 – 40: oligo-mesotrófico</i>	Abr/09	16,3	Oligotrófico	45,8	mesotrófico
<i>IET 40 – 50: mesotrófico</i>	Jul/09	17,6	Oligotrófico	41,3	mesotrófico
<i>IET 50 – 60: eutrófico</i>					
<i>IET 60 – 70: eu- hipereutrófico</i>	média total *	19,8	Oligotrfico	39,7	oligo-meso
<i>IET > 70: hipereutrófico</i>					

* valor médio de Cl *a* e de P total para o cálculo do IET.

Sendo assim, um estudo objetivando o desenvolvimento de índices de estado trófico específicos para lagos de mina ácidos é de suma importância para a caracterização e enquadramento de tais lagos frente às leis ambientais (CONAMA 357/05 e COPAM 1997). Além do desenvolvimento de um índice específico, é plausível adequar tal índice para lagos de mina ácido tropicais, como é o caso da cava da mina, uma vez que o índice de estado trófico de Carlson (1977) é mais apropriado para corpos de água de regiões temperadas.

Para o reservatório das Antas, foi possível comparar os resultados obtidos para o índice de estado trófico frente a uma série histórica.

De acordo com Ronqui (2004), em seu estudo sobre a "Caracterização Sazonal de Bactérias, de Protozoários e de Fitoflagelados Planctônicos na Represa das Antas em Poços de Caldas – Minas Gerais" e posteriormente, em estudo sobre a "Caracterização Limnológica e Avaliação de Efeitos Ambientais causados por Efluentes de Mina de Urânio sobre populações microbianas planctônicas da Represa das Antas, Caldas (M.G.)" também por Ronqui (2008) o reservatório das Antas foi classificado, de acordo com os resultados de clorofila *a* obtidos durante o período de fevereiro a julho de 2004 como eutrófico, sendo utilizado o índice de Carlson (1977) e como oligotrófico, de acordo com os resultados obtidos para o índice de estado trófico de Carlson (1977), modificado por Toledo et al. (1983), calculado utilizando-se os valores de clorofila *a*, bem como os valores de transparência da água, durante o período de amostragem de jan/06, abr/06, jul/06, out/06 e fev/2007.

No presente estudo, o reservatório das Antas, tanto para os pontos de superfície (Cab, P41 e P14S) quanto para os pontos verticais (P14S, P14M e P14F) foi classificado como oligotrófico, frente ao índice de estado trófico de Carlson (1977) modificado por Toledo et al. (1983) utilizando-se as variáveis fósforo total, fosfato inorgânico dissolvido e clorofila *a*.

Revisando os valores de clorofila *a*, ao longo dos anos de 2004 a 2009, para o reservatório das Antas, tais valores relativamente decresceram, ao longo dos anos, sendo verificados valores variando de 0 a 9,89 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 2004; de 0 a 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 2005/2006 e de 0,25 a 5,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para 2008/2009. Concordando com a evolução do índice de estado trófico de eutrófico para oligotrófico, frente aos valores de clorofila *a*, nos anos de amostragem no RA. Além disso, ao longo de todo o período de estudo no reservatório das Antas, sempre foi verificado que a maior fonte poluidora deste corpo de água advinha de fontes inorgânicas devido ao lançamento dos efluentes líquidos tratados procedentes de drenagens ácidas do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi e não de fontes orgânicas.

Por outro lado, para o reservatório Bortolan, tanto para os pontos de superfície quanto para os pontos verticais, foram detectadas diferenças entre os resultados de índice de estado trófico. O ponto RB-S foi classificado como mesotrófico, para os meses de out/08, jan/09 e abr/09 e eutrófico, para o mês de jul/09. O estado de mesotrofia verificado no RB na superfície do reservatório, poderia ser explicado por fatores sazonais, quando no mês de out/08 estariam iniciando-se as primeiras chuvas de verão, contribuindo com o enriquecimento da coluna de água pela remoção de partículas do fundo, bem como pelas maiores temperaturas da água e intensidade luminosa, propiciando a elevação da taxa de produtividade primária e floração de algas nesta região da coluna d'água. Por outro lado, o estado de eutrofização verificado no ponto RB-S, para o mês de jul/09, seria resultante do enriquecimento das águas do reservatório pelos fatores citados acima, nos meses anteriores, e também pela escassez de chuvas nesta época do ano, quando os níveis de água dos reservatórios abaixam, levando a uma maior concentração dos nutrientes e transparência de água.

O ponto RB-M foi classificado como oligotrófico, para os meses de out/08 e jan/09, mesotrófico para abr/09 e eutrófico para jul/09; sem dúvida, na região mediana do reservatório, ocorreram as maiores diferenças do estado de trofia. Partindo do ponto de vista que tal região seria uma faixa transitória entre a superfície do lago e o fundo, maiores

oscilações em suas características são aceitáveis, uma vez que o reservatório Bortolan não apresenta elevada profundidade, sendo verificados valores máximos de 11,5 metros.

Do ponto RB-F foi classificado como oligotrófico, ao longo de todo o período de estudo avaliado. Os fatores que poderiam explicar o estado de oligotrofia na região mais profunda do reservatório Bortolan, seria uma baixa taxa de sedimentação das partículas, ao longo do perfil vertical ou uma baixa taxa de remoção de partículas do sedimento para a coluna de água, bem como a menor intensidade luminosa, levando, conseqüentemente, à menor taxa de produtividade primária.

Bartolelli et al. (2005) estudaram a hidrologia de um reservatório, na região central dos Alpes Italianos. Verificaram que, de acordo com os valores de clorofila *a* e fósforo total, o reservatório foi classificado como oligo-mesotrófico, com dominância do nível oligotrófico. O mesmo possui profundidade média de 24 metros e total de 50 metros. Berdjeb et al. (2011) estudaram o efeito da pastagem e dos vírus sobre a estrutura e a produtividade da comunidade bacteriana, em dois lagos extremamente diferentes, ou seja, Lago Bourget localizado na região ocidental dos Alpes franceses, com profundidade média de 80 m e máxima de 147 m e; Lago Annecy, localizado na parte oriental da França, com profundidade média de 41 m e máxima de 65 m. Os autores verificaram graus de trofia de mesotrófico e oligotrófico, respectivamente; nas estações de primavera e verão. Por outro lado, Alemeida, Melão e Moura (2012) que estudaram a diversidade planctônica e a caracterização limnológica em dois reservatórios rasos tropicais, na região urbana do Estado de Pernambuco, Brasil, verificaram que os diferentes usos de tais corpos de água acarretaram alterações no grau de trofia dos reservatórios. O reservatório Prata, que possui profundidade máxima de 4,40 m e águas claras utilizadas para o abastecimento e sem impactos antropogênicos diretos, foram classificados como oligotrófico. Por outro lado, o reservatório Apipucos, construído para a contenção de enchentes e recreação, consistindo de dois subsistemas interconectados, foi classificado como eutrófico devido à liberação de esgoto não tratado e efluentes de origem comercial e industrial, resultando em uma carga poluidora elevada neste sistema. Rosas et al. (1993) estudaram a comunidade algal, um indicador de estado trófico do Lago Patzcuaro, México, que é caracterizado como um ecossistema de origem vulcânica a 2.035 m acima do nível do mar e com profundidade média de 8 m e máxima de 12,5 m, utilizado para o abastecimento de água, disposição de esgotos domésticos e produção de peixes, foi classificado como mesotrófico. Pode-se

verificar que diferentes reservatórios com diferentes fontes poluidoras ou não, mais profundos e menos profundos, em regiões temperadas ou em regiões tropicais, também apresentaram graus de trofia similares aos verificados no reservatório Bortolan.

De um modo geral, observou-se que os pontos RB-S e RB-M, em relação ao seu estado de trofia, sofreram maiores alterações frente às questões sazonais e o ponto RB-F, talvez por estar mais ao fundo, permaneceu mais homogêneo. Também vale ressaltar que o reservatório Bortolan localiza-se próximo à malha urbana da cidade de Poços de Caldas, recebendo seus esgotos tanto de origem doméstica quanto de origem industrial. Na região também se localizam propriedades rurais que fazem uso de fertilizantes e agrotóxicos, e com a ação das chuvas podem carrear material alóctone para dentro do reservatório, não podendo descartar a questão do uso de tal recurso hídrico para recreação, embarcações de turismo que se utilizam de combustíveis.

6.3.2 Índice de saprobidade

Vários indicadores podem ser utilizados para analisar a qualidade ambiental de rios e lagos (GUI-ZHEN et al., 2007). O índice de saprobidade de Pantle e Buck (1955) é um deles, sendo uma ferramenta útil para a classificação da qualidade ecológica da água de lagos e reservatórios, frente às espécies de protozoários verificados nos corpos de água (FOISSNER; BERGER; HOHMANN, 1992). Indicadores biológicos de qualidade da água podem ser ferramentas úteis utilizadas por auditores e tomadores de decisões para a verificação da eficácia das políticas ambientais, planos e programas de proteção ao meio ambiente (GUI-ZHEN et al., 2007).

Frente à escala de classificação sapróbica do índice de saprobidade de Pantle; e Buck (1955), o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi foi classificado durante todo o período de estudo com beta-mesosapróbico (ISPB = 1,8). Uma vez que tal índice contempla a classificação ecológica da água frente a fontes de poluição de origem orgânica. Assim, de acordo com os gêneros de protozoários planctônicos registrados no ponto CM, verificou-se valores de índice de saprobidade por espécie variando de IS = 1,6 a 4,0. Devido aos valores de IS foi possível detectar que a CM seria um ambiente poluído organicamente, concordando com os resultados das variáveis físicas e químicas registradas neste estudo, onde os maiores contribuintes poluidores do lago são de origem inorgânica.

Para o reservatório das Antas, foi possível comparar os resultados obtidos para o índice de saprobidade frente a uma série histórica. De acordo com Ronqui (2004), o reservatório das Antas foi classificado de acordo com o índice de saprobidade obtido durante o período de fevereiro a julho de 2004 como alfa-mesosapróbico (ISPB = 2,8, valor médio para a represa toda) e em Ronqui (2008), como beta-mesosapróbico para os meses de abr/06 (ISPB = 2,46), jul/06 (ISPB = 2,21), out/06 (ISPB = 2,03), fev/2007 (ISPB = 2,25) e alfa-mesosapróbico para o mês de jan/06 (ISPB = 2,71).

No presente estudo, o reservatório das Antas, tanto para os pontos de superfície (Cab, P41 e P14S) quanto para os pontos verticais (P14S, P14M e P14F) foi classificado como beta-mesosapróbico frente ao índice de saprobidade de Pantle e Buck (1955); com exceção do ponto P14F no mês de abr/09 classificado como alfa-mesosapróbico (ISPB = 2,71).

Segundo Foissner, Berger e Hohmann (1992), ambientes classificados como beta-mesosapróbicos apresentam uma zona onde há decomposição de elementos, próximo de um estado de mineralização e um baixo déficit de oxigênio. Uma grande variedade de protistas, plantas e animais ocorrem em números consideráveis, com qualidade de água Classe II. Ambientes alfa-mesosapróbicos indicam um ambiente que possui uma região oxigenada e um início de remineralização, muitas espécies, sendo bactérias e protistas dominantes, com qualidade da água Classe III, de acordo com Foissner, Berger e Hohmann (1992).

Verifica-se, de um modo geral, que o índice de saprobidade decresceu, ao longo dos anos avaliados, visto que, na maior parte do período, tal corpo de água foi classificado como beta-mesosapróbico, ou seja, a qualidade biológica da água no RA teria melhorado organicamente, ao longo dos anos, favorecendo a presença de gêneros de protozoários característicos de ambientes menos poluídos organicamente em detrimento de protozoários oriundos de ambientes apresentando maior carga de poluentes. Por outro lado, a menor taxa de enriquecimento orgânico, pode ter levado a uma menor disponibilidade de recursos.

Vale ressaltar que, assim como os valores de Índice de Estado Trófico, o Índice de Saprobidade também decresceu, entre 2004 e 2009, concordando entre si. De acordo com o valor de Índice de Saprobidade, esse reservatório foi classificado, na maior parte do tempo como beta-mesosapróbico, ou seja, um corpo de água moderadamente poluído, frente à presença de compostos orgânicos e de Classe II (PANTLE; BUCK, 1955) e, de acordo com o valor de Índice de Estado Trófico, o RA apresentou-se como um corpo de água limpo, de

baixa produtividade, em que não ocorrem interferências indesejáveis sobre os usos da água, segundo a especificação descrita por Toledo et al. (1983) para o estado de trofia e de Classe II frente à Resolução Conama 357/2005.

O reservatório Bortolan, por outro lado, foi classificado como alfa-mesosapróbico, tanto para o ponto de Superfície quanto para o perfil vertical, nos meses de out/08 e jan/09; como beta-mesosapróbico tanto para o ponto de Superfície quanto para o perfil vertical, no mês de abr/09 e como beta-mesosapróbico para os pontos RB-S e RB-F para jul/09 e, alfa-mesosapróbico para o RB-M em jul/09.

Os maiores valores de saprobidade verificados no RB, ocorreram nos meses de out/08 e jan/09, quando foram verificadas chuvas de verão, elevadas temperaturas do ar e da água, maior incidência luminosa e, provavelmente, maior produtividade primária, traduzindo num maior aporte de nutrientes tanto alóctones quanto autóctones e propiciando o maior grau de saprobidade do reservatório, frente a fontes de enriquecimento orgânicas.

Já para os meses de abr/09 e jul/09, quando as temperaturas tenderam a cair, a ausência de chuva, menor incidência luminosa, provavelmente menor produtividade primária, foi verificada diminuição do índice de saprobidade do reservatório, frente ao enriquecimento de origem orgânica. Andrade et al. (1995) realizaram um estudo sobre a qualidade biológica da água, na Ribeira de Oeiras (Alentejo - Portugal), antes da instalação das minas Neves-Corvo (extraí minérios de cobre e de zinco). Os autores utilizaram, entre outros índices, o de Saprobiidade de Pantle e Buck (1955), para a verificação da qualidade ecológica das águas da ribeira. Os autores verificaram que, das cinco estações amostradas em campanhas de nove dias de duração durante dois anos, todos os pontos de amostragem foram classificados como águas de boa qualidade. A estação 3 foi a que apresentou um comportamento mais irregular, o que pôde ser atribuído a esta estação encontrar-se imediatamente a jusante do local onde decorreram as obras de abertura de um poço para a exploração mineira de Neves-Corvo. De acordo com o índice de saprobidade, todas as estações de amostragem foram classificadas como beta-mesosapróbicas (grau de poluição moderado), no entanto para as estações 3 e 5 os valores do índice estiveram na zona limite da beta-saprobidade.

Assim como no RB registrado no presente estudo, os autores acima atribuíram os valores mais elevados de índice de saprobidade devido às chuvas torrenciais que ocorreram anteriormente às campanhas de amostragem e também às águas oriundas dos trabalhos de escavação da mina, cujo efeito só se fez sentir a certa distância da sua descarga.

Cadjo, Miletic e Djurkovic (2007); Popovskaya et al. (2012), verificaram, em seus estudos, em reservatórios (reservatório Potpec-Sérvia e reservatório Irkutsk-Rússia, respectivamente) valores de índice de saprobidade de Pantle e Buck (1955) que variaram entre oligo, alfa e beta-mesosapróbico, com qualidade da água Classe II. Popovskaya et al. (2012) também verificaram que os valores do índice de saprobidade foram mais elevados no verão (ISPB = 1,3 - 1,4) do que na primavera e outono (ISPB = 1,0 - 1,2). O mesmo padrão foi verificado no presente estudo para o reservatório Bortolan.

6.3.3 Índice de diversidade

De acordo com o índice de diversidade, o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi apresentou os menores valores de diversidade, quando comparado aos demais pontos de coleta de superfície (Cab, P41, P14S e RB-S) avaliados. Tal resultado já era esperado, uma vez que, nestes lagos de mina ácidos, as condições ambientais (disponibilidade de luz, concentrações de metais, níveis dos nutrientes e pH) são extremamente estressantes e as comunidades consistem de táxons restritos (KALIN et al., 2001).

De acordo com Weithoff et al. (2010), lagos de mina ácidos apresentam um limitado número de espécies que são capazes de sobreviver e, conseqüentemente, é verificada como padrão a baixa diversidade de organismos planctônicos, devido aos baixos valores de pH, elevadas concentrações de sulfato, alumínio, ferro dentre outros metais presentes. Características estas condizentes com o LMA Cava da Mina Osamu Utsumi. Os autores ainda citaram que a comunidade planctônica, nestes lagos de mina, consiste basicamente de bactérias heterotróficas, flagelados mixotróficos, um limitado número de outras algas, muito poucos protistas heterotróficos e espécies de rotíferas. Isso pode ser comprovado pelas preferências alimentares verificadas nos gêneros de protozoários planctônicos registrados na cava da mina. Nenhum dos gêneros registrados é especialista e sim generalista, ou seja, obtém alimento de diversos recursos presentes nas águas do lago, sendo todos protozoários heterótrofos.

Para o reservatório das Antas, foi possível comparar os resultados obtidos para o índice de diversidade de Shannon-Wiener frente a uma série histórica. De acordo com Ronqui (2004), a maior diversidade verificada no RA foi no ponto P14S ($H' = 0,261$), seguidos do ponto Cab ($H' = 0,179$) e o menor valor no ponto P41 ($H' = 0,138$), ao longo dos meses de

fevereiro a julho de 2004. Em Ronqui (2008), o RA também apresentou o maior valor de diversidade protozooplancônica no ponto P14S (P14S out/06 - $H' = 0,558$) e o menor também foi verificado no ponto P41 (P41 jul/06 - $H' = 0,000004$), ao longo dos meses de janeiro de 2006 a fevereiro de 2007.

No presente estudo, para os pontos de superfície do RA (Cab, P41 e P14S), a maior diversidade foi verificada no ponto P41, no mês de jan/09 ($H' = 0,711$) e o menor ocorreu no ponto Cab em jul/09 ($H' = 0,000$). De um modo geral, a diversidade do reservatório das Antas tendeu a aumentar, ao longo dos anos de 2004 a 2009, porém nos primeiros trabalhos, os maiores valores de diversidade ocorriam no ponto P14S e os menores no ponto de lançamento dos efluentes, ou seja, no ponto P41. Neste último estudo, os maiores valores de diversidade ocorreram no ponto P41 e os menores no Cab.

Pedrozo et al. (2001), citam em seu estudo, que em muitos estudos de lagos afetados por chuva ácida, drenagem ácida de mina e atividades vulcânicas, é verificado que o pH reduz a diversidade e a riqueza de espécies do fitoplâncton e do zooplâncton. A maior diversidade ecológica dos gêneros de protozoários registrados no ponto P41 pode ser resultado da ausência de competidores pelágicos e predadores, uma vez que tal ponto de amostragem recebe os efluentes tratados procedentes do lago de mina ácido Cava da Mina Osamu Utsumi, sofrendo interferência na qualidade da água, devido ao recebimento deste efluente.

De acordo com Kalin et al. (2001) e Weithoff et al. (2010), lagos de mina ácidos, devido aos seus problemas com a qualidade química da água tendem a possuir uma restrita rede trófica microbiana. Propiciam o sucesso da colonização de espécies tanto bentônicas quanto pelágicas, distribuídas ao longo de toda a coluna d'água do lago, devido à ausência de fortes concorrentes pelágicas devido aos baixos valores de pH; ex.: ausência de organismos pertencentes ao zooplâncton. Tal dinâmica pode ser comprovada para o ponto P41, em que Ferrari (2010) avalia os efeitos ambientais de efluentes radioativos de mineração de urânio sobre as características físicas, químicas e diversidade da Comunidade Zooplancônica na Unidade de Tratamento de Minérios, Represa das Antas e Represa Bortolan, Poços de Caldas (M.G.). A autora registrou menor densidade, riqueza e diversidade dos grupos Cladocera, Copépoda e Rotífera no ponto P41; ou seja, menor interferência de competidores pelos mesmos recursos alimentares e menor pressão de predação, já que integrantes destes grupos se alimentam de algas e bactérias como os protozoários, competindo com estes e em alguns casos também são predadores do protozooplâncton. Sendo assim, podemos inferir

que a maior diversidade protozooplanctônica no ponto P41, ponto de lançamento dos efluentes procedentes da cava da mina, provavelmente esteve relacionada ao resultado da menor presença ou ausência de potenciais competidores e predadores. Mageed, Mohammadein e Desouky (2002) estudaram a importância da comunidade protozooplanctônica, como fonte de alimento para o zooplâncton utilizando amostras de água do Lago Qaroun (Egito), confirmam que os protozoários foram utilizados como fonte de alimento pelo zooplâncton (rotíferas e copépodos) e por algumas espécies de peixes planctívoros também, uma vez que a diminuição no número de organismos protozooplanctônicos foi concomitante ao aumento do número de rotíferas e copépodos. Isto significou que ambos os rotíferos e larvas de nauplios de copepodas exerceram efeito regulatório sobre os organismos protozooplanctônicos, competindo por alimento e predando-os.

No reservatório Bortolan, dentre os pontos de superfície avaliados (CM, Cab, P41, P14S e RB-S), o ponto RB-S apresentou o segundo maior valor de diversidade, sendo menor apenas que os valores registrados no ponto P41. Provavelmente, a maior diversidade registrada no reservatório Bortolan esteja relacionada à melhor qualidade química da água, bem como ao maior aporte de matéria orgânica e nutrientes. Declerck et al. (2005) citaram que existem mecanismos para manter e gerar riqueza nos diferentes níveis tróficos, primeiramente, a manutenção da riqueza em diferentes grupos de organismos pode ser determinada pelas mesmas variáveis, tais como produtividade, clima, condições ambientais extremas ou limitação à dispersão; secundariamente, associações entre a riqueza de espécies através dos níveis tróficos podem ser formadas por interações tróficas. Por outro lado, a riqueza em um nível trófico inferior pode afetar positivamente a riqueza dos níveis tróficos superiores, ou seja, quanto maior a diversidade de fontes de alimento maior a co-existência e diversidade de consumidores. Inversamente, a elevada diversidade de predadores pode conduzir a co-existência de presas, porque os diferentes predadores de cada presa seletivamente eliminam espécies competitivas superiores que contrariamente tenderiam a dominar a comunidade.

Para os pontos verticais do RA, ou seja, P14S, P14M e P14F a maior diversidade foi verificada no ponto P14M no mês de jan/09 ($H' = 0,655$) e a menor no ponto P14F no mês de jul/09 ($H' = 0,253$), ao longo dos meses de out/08 a jul/09. De acordo com Margalef (1983), os valores para o índice de Shannon-Wiener variam entre 1,5 a 3,5, raras vezes

ultrapassando 4,5. Mieczan (2010) estudou a micro-zonação vertical de amebas testáceas e ciliados em água de turfeiras, em relação aos parâmetros físicos e químicos e registrou valores de índice de diversidade de Shannon-Wiener variando de 2,2 - 2,5 no fundo e de 0,75 - 0,83 nas águas intersticiais. Jyothibabu et al. (2008) estudaram a variação sazonal de microzooplâncton (20-200 μm) e suas possíveis implicações no fluxo de carbono vertical, na Baía de Bengala ocidental, registraram valores de índice de diversidade de Shannon-Wiener de 7,75 - 2,4 na primavera, de 2,6 - 2,7 no inverno e de 2,3 a 2,5 no verão. Ainda segundo os autores, a Baía de Bengala é convencionalmente conhecida como um sistema oligotrófico onde há o esgotamento do nitrato nas águas superficiais e falta de radiação solar no período de chuvas, o que limita o crescimento do fitoplâncton. Schweizer (1997) estudou a distribuição de fitoplâncton e protozoários ciliados, ao longo de um transecto do litoral ao pelágico do Lago Constance (mesotrófico temperado) e registrou valores de índice de diversidade nos sete pontos amostrados variando de 0,614 - 0,788 na primavera e de 0,692 - 0,856 no verão. Lovejoy et al. (1993) avaliaram gradientes microbianos em um estuário para análise da comunidade de protozoários, registraram valores de índice de diversidade nos três pontos de coleta de 1,19; 1,35 e 1,40. No presente estudo, os valores registrados no reservatório das Antas (ponto P14) foram menores em comparação a outros corpos aquáticos. Xu et al. (2005), que estudaram o lago Chaohu na China (lago raso com profundidade máxima de 6 m), enfatizaram que, situações estressantes, causadas pela presença de elementos químicos, extrema poluição orgânica, alterações no pH, flutuações na temperatura da água, ou ainda, mudanças agudas em outros fatores, geralmente reduzem o número de espécies e aumentam a concentração de formas de vida tolerantes.

Verticalmente, a maior diversidade foi verificada no ponto RB-F, seguido do RB-S e RB-M. Este reservatório, dentre os três corpos de água avaliados neste estudo, foi o que apresentou características físicas e químicas melhores, quando comparado ao CM e ao RA e maior grau de trofia em relação ao ponto CM e ao reservatório das Antas, ou seja, o RB possui melhor qualidade química da água, quando comparado ao CM e ao RA, menor aporte de poluentes procedentes da mineração de urânio e maior grau de trofia, traduzindo-se em um corpo de água mais produtivo, organicamente. Símék et al. (1998) estudando três reservatórios com diferentes graus de trofia, verificaram que, com o aumento da trofia dos corpos d'água, os protozoários ciliados tornaram-se os principais predadores do bacterioplâncton. Biyu (2000) estudou a composição das espécies, mudanças sazonais,

biomassa e abundância do protozooplâncton (ciliados, heliozoários e testaceas) em dois lagos mesotróficos rasos, na China e verificou que o lago, dominado por macrófitas, apresentou maior número de espécies de ciliados do que o dominado por algas. Nos dois lagos, os padrões de densidade e biomassa foram significativamente diferentes, porém em ambos os protozoários ciliados foram dominantes.

Assim, maiores valores de índice de diversidade são condizentes com as condições limnológicas deste reservatório. A maior diversidade de organismos protozooplanctônicos no ponto RB-F, provavelmente esteja intimamente relacionada à presença de potenciais fontes de alimento como bactérias, que se localizam mais próximas ao sedimento do lago. Analisando-se as preferências alimentares dos gêneros de protozoários registrados no RB-F, verificou-se uma ampla diversidade metabólica, onde a omnivoria predominou, estando acompanhada da bacterivoria, mixotrofia, bem como da algivoria. Analisando os valores de densidade bacteriana para o ponto RB-F, no mês de jul/09, pôde-se observar a diminuição do número de células bacterianas, provavelmente devido a uma maior pressão de predação dos protozoários ali presentes bem como o menor valor de biomassa fitoplanctônica, que pode ser atribuído a dois fatores pressão de predação e limitação de luz, por ser uma região mais profunda do reservatório.

6.4 Hibridização Fluorescente "*In Situ*" - FISH

Neste estudo, os resultados demonstraram que os protocolos existentes para a hibridização de células bacterianas planctônicas em drenagens ácidas de mina, com especial atenção às procedentes de minas de urânio bem como para ambientes oligo-mesotróficos, ainda possuíam inadequações e/ou lacunas a serem preenchidas para um uso geral em amostras de água doce com tais características.

Foi registrado aumento na porcentagem de hibridizações em células bacterianas, utilizando-se a metodologia independente de cultivo FISH, após as modificações metodológicas descritas na segunda etapa de testes. Foi obtido um total de 27% de resultados positivos para o mix de sondas EUB338 I-II-III e 15% de resultados positivos para a sonda ARCH915, do total de células coradas com o corante DAPI, ou seja, quase o dobro de hibridizações quando comparados aos resultados obtidos na primeira etapa de testes. Assim,

foi verificada diferença significativa para o número de hibridizações positivas obtidos na segunda etapa de testes, quando comparados aos resultados da 1ª, comprovando o melhoramento dos resultados, frente à metodologia padronizada e implantada.

De acordo com Alfreider et al. (1996), que testaram a introdução de um melhoramento na técnica de hibridização fluorescente "*in situ*", com sondas de oligonucleotídeos mono-marcadas, como as utilizadas neste estudo, numa tentativa de selecionar a comunidade bacteriana da cobertura do gelo da superfície do lago Gossenköllesee, Alpes Tyrolean e da zona pelágica deste mesmo lago (oligotrófico e de elevada altitude), os autores verificaram que a fração de bactérias detectadas após a hibridização com a sonda EUB338 variou de 40 a 81% do total das células coradas com DAPI. A comunidade bacteriana do lago Gossenköllesee variou, consideravelmente, entre e dentre os habitats (neve, lama e nas águas do lago). Por outro lado, Glockner et al. (1996) no estudo sobre o melhoramento do protocolo de FISH para a detecção e identificação de bactérias planctônicas em amostras de água de ambientes meso e oligotróficos, registraram porcentagens de células hibridizadas variando de 29% a 64% para a sonda universal EUB338, marcada com o corante fluorescente Cy3. Willhartitz et al. (2007) registraram valores percentuais de hibridizações com a técnica FISH variando de 8% a 23% em um estudo sobre a comunidade procariótica em águas de superfície e subterrâneas (Austria) ultra-oligotróficas utilizando FISH e CARD-FISH. Para as archaeas não foram verificados resultados positivos segundo os autores. Os resultados de porcentagem de hibridizações do presente estudo utilizando-se sondas EUB338-I, II e III marcadas com Cy3, assemelham-se aos verificados por Willhartitz.

Segundo Nicomrat, Dick e Tuovinen (2006) no estudo sobre as populações microbianas em áreas alagadas, construídas para o tratamento de drenagem ácida de mina de carvão, foi registrado que 40% das células bacterianas do total de células coradas em DAPI hibridizaram com o uso da técnica FISH nas amostras procedentes de dois meses de amostragem. Por outro lado, de acordo com González-Toril et al. (2003), que estudaram a ecologia microbiana de um ambiente extremamente ácido (Rio Tinto, Huelva - Espanha) utilizando dentre outras técnicas moleculares o FISH, verificaram que a maioria das células bacterianas ali presentes eram pertencentes ao domínio Bacteria e uma menor fração (3%) correspondente ao domínio Archaea. No presente estudo, também foi verificada a presença de células do domínio Archaea, porém, em menor frequência, quando comparados, às do domínio Bacteria.

Esta pesquisa deteve-se em realizar uma primeira varredura dos corpos de água avaliados, visando comprovar a presença de bactérias e Archaeas, bem como a eficiência da sonda universal do domínio Bacteria para tais ambientes. Foram testados inúmeros passos da metodologia, outros introduzidos e modificados, a fim de obterem-se campos microscópicos, onde se verificasse efetiva hibridização das células bacterianas contidas nas amostras de água dos três ambientes avaliados. Assim, foi realizada a qualificação, através da obtenção de resultados positivos para a hibridização, ou seja, foi verificada a presença e a ausência de sinais de hibridização nas amostras, distinguindo-as de Bactérias e Archaeas.

Lindström, Agterveld e Zwart (2005) também se utilizaram das proporções relativas dos sinais de hibridização como medidas quantitativas, para monitorar diversos grupos bacterianos, ao longo de gradientes ambientais (quinze lagos de diferentes estados tróficos localizados na Suécia e na Ilha de Svalbard - Ártico Norueguês). Os autores utilizaram a metodologia de hibridização reversa ("reverse line blot hybridization") com sondas marcadas no gene 16S RNAr, para analisar a distribuição espacial de 15 grupos bacterianos previamente escolhidos através de informações sobre supostos grupos de bactérias designadas como "típicas de água doce", pela literatura. Os autores salientaram, ainda, que o principal objetivo do estudo foi explorar melhor a composição da comunidade bacteriana nos lagos de interesse e associar a ocorrência de tais grupos pré-determinados com fatores ambientais e não propriamente quantificar quantas células havia em cada corpo de água avaliado, sendo o mesmo realizado neste estudo no LMA Cava da Mina Osamu Utsumi e nos reservatórios das Antas e Bortolan.

Sabe-se, através de estudos anteriores, que no caso do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi há a presença dos grupos bacterianos: bactérias heterotróficas aeróbias, em menor número as bactérias heterotróficas anaeróbias e a predominância de bactérias redutoras de sulfato e bactérias oxidantes de enxofre (WEST; MCKINLEY; VIALTA, 1992); bactérias oxidantes de ferro como *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans* (CAMPOS et al., 2011) e elevado número de bactérias redutoras de sulfato (BRS) em amostras do sedimento da cava da mina e em menor número na coluna de água da CM (BENEDETTO et al., 2005).

Além dos estudos realizados na CM, a composição e diversidade bacteriana em pilhas de rejeitos de minério de urânio, em drenagens ácidas de mina e em lagos de mina ácidos foram estudadas em outros locais do mundo: foi verificada a presença de bactérias litotróficas e quimiorganotróficas como bactérias oxidantes de ferro, enxofre, amônia e

nitrito e bactérias redutoras de sulfato, nitrato, íon férrico e manganês por Schippers et al. (1995); archaeas e as divisões γ -proteobactéria, β -proteobactérias, α -proteobactérias heterotróficas, δ -proteobactéria, o grupo dos *Leptospirillum ferrooxidans*, a divisão *Firmicutes*, os *Sulfobacillus* gram-positivos e a divisão *Acidobacteria* do domínio Bacteria por Baker e Banfield (2003) e Kampe et al. (2010) registraram que a comunidade bacteriana foi composta por Alfa, Beta e Gama Proteobactérias. Por outro lado, as *Actinobactérias* e as *Acidobactérias* raramente ocorreram. Verifica-se que os trabalhos envolvendo o estudo de quais grupos bacterianos habitam ambientes extremos como pilhas de rejeitos de minério de urânio, drenagens ácidas de mina e lagos de cava de mina ácidos baseiam-se nos grupos pertencentes ao domínio Bacteria e poucos têm o objetivo de verificar mais profundamente os pertencentes ao domínio Archaea.

Neste estudo, foi detectada a presença de micro-organismos do domínio Archaea. Tais células poderiam pertencer às Ferroplasma, Termoplasma e Sulfolobales, como descrito na literatura existente até o presente momento. São estas células tipicamente verificadas em ambientes extremos, originados de atividades de mineração e com pH ácido, como é o caso do ponto CM.

A confirmação de micro-organismos do domínio Archaea no ponto CM e nos reservatórios das Antas e Bortolan geram conhecimentos importantes para o entendimento dos processos bioquímicos que ali ocorrem, propiciando informações para possíveis ações de remediação.

Os resultados do presente estudo mostraram que tanto bactérias planctônicas pertencentes ao domínio Bacteria, quanto células planctônicas pertencentes ao domínio Archaea, ainda que em frequência reduzida, compunham a comunidade bacterioplanctônica do ponto CM e dos reservatórios das Antas e Bortolan; ambientes que possuem distintas condições físicas, químicas e tróficas.

Comparando todos os sistemas avaliados, a fração de amostras hibridizadas com a sonda ARCH915 foi mais elevada no ponto CM. Segundo Mohapatra et al. (2011), as reações químicas geradas na drenagem ácida de mina são mediadas por vários micro-organismos filogeneticamente distintos pertencentes aos domínios Bacteria e Archaea. Segundo os autores, os relatos na literatura sobre quais archaeas habitam tais ambientes limitam-se às ordens thermoplasmatales, sulfolobales e methanomicrobiales. A ordem thermoplasmatales é representada pelas arqueas mesófilas oxidantes de ferro *Ferroplasma acidiphilium* e

Ferroplasma acidarmanus; a ordem sulfolobales é representada pela *Metallosphaera prunae* e para methanomicrobiales foi isolado apenas um clone, procedente de drenagem ácida de mina (BAKER; BANFIELD, 2003; MOHAPATRA et al., 2011).

Segundo Kock e Schippers (2008), que utilizaram, dentre outras técnicas moleculares, o FISH, para quantificaram a comunidade bacteriana de três diferentes depósitos de rejeito de mina ácidos, geradores de resíduos sulfetados em Botswana, Alemanha e Suécia, verificaram que, em contraste com o domínio Bacteria, as Archaeas foram detectadas em números muito baixos nas zonas oxidadas de dois depósitos de rejeitos avaliados. Segundo os autores, a razão pela qual as Archaeas não predominaram nestes rejeitos poderia ser porque *Ferroplasma* spp., que são frequentemente encontradas em DAM e em operações de lixiviação, são micro-organismos extremófilos que requerem condições extremamente ácidas ($\text{pH} < 2$) e elevadas concentrações de ferro e enxofre para ocorrerem, condições estas que não prevaleceram nos rejeitos de mina, neste estudo. Para os rejeitos de Botswana prevaleceu a presença dos elementos químicos Ni, Cu, Zn e Co, para a Suécia, prevaleceram os elementos Zn e Cu e, para a Alemanha, prevaleceram Pb e Zn. Provavelmente, no caso da CM e suas pilhas de rejeitos, um estudo mais aprofundado renderia resultados diferentes dos registrados por Kock e Schippers (2008), uma vez que a presença de ferro e enxofre (SOUZA, 1996) é fidedigna.

Outro importante fator para a detecção e identificação de células em ambientes de mineração e drenagem ácida de mina, especialmente para o domínio Archaea, é a relação custo-benefício para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação "in situ" para águas subterrâneas contaminadas com resíduos contendo urânio. Suzuki et al. (2005) verificaram a presença de processos de redução de urânio (VI) a urânio (IV), em amostras de sedimento de um lago raso, formado a partir de uma cava de mina de urânio desativada (localizada no município de Stevens, Washington). Os autores verificaram a predominância de archaeas dos gêneros *Methanobrevibacter arboriphillus* e *Methanobacterium* sp. (metanogênicas). Além da presença de tais archaeas, verificaram que o urânio havia sido concentrado na superfície de células e que, provavelmente, a redução de urânio (VI) a urânio (IV), bem como a consequente precipitação de sulfato de ferro foi realizada por atividades enzimáticas dos micro-organismos pertencentes à comunidade microbiana do lago, caracterizando as archaeas como importantes membros em processos de biolixiviação em minas de urânio e, futuramente promissoras em processos de biorremediação.

Chaban, Jarrel e Sandy (2006) já alertavam sobre a questão de que o papel das Archaeas nos ecossistemas estava sendo subestimado e que eram dignas de pesquisas mais minuciosas devido à sua ampla distribuição, que ia dos ambientes mais extremos aos considerados "normais" como oceanos, lagos e solos, além da diversidade metabólica e números absolutos.

Lentini, Gugliandolo e Maugeri (2012), que estudaram a distribuição vertical de Archaea e Bacteria em um Lago Meromítico (Lago Faro, Messina - Itália), utilizando a técnica de Hibridização Fluorescente "in situ", atribuíram às Archaeas detectadas um papel ativo nos ciclos biogeoquímicos do enxofre, nitrogênio e carbono. Devido à sua ampla diversidade metabólica, as archaeas poderiam sobreviver em ambientes aquáticos naturais utilizando-se fontes de energia como as citadas pelos autores (enxofre, nitrogênio e carbono). Tal fato poderia explicar a presença de resultados positivos para o domínio Archaea nos reservatórios das Antas e Bortolan, aqui avaliados, sendo ambientes aquáticos não extremos e com resultados positivos para archaeas, como o verificado por Lentini, Gugliandolo e Maugeri (2012).

Entre o conjunto de métodos moleculares aplicados em estudos ambientais, a hibridização fluorescente "in situ" foi escolhida por ser apreciada como, uma alternativa versátil para a análise da composição de comunidades bacterianas de ambientes naturais, como uma ferramenta de baixo custo e que ainda possibilitaria a quantificação e visualização das células bacterianas por métodos de microscopia.

Assim, a implantação e a padronização da técnica FISH, no presente estudo, foi uma tentativa de unir os inúmeros conhecimentos, gerados ao longo de duas décadas de aplicabilidade e otimização da técnica FISH, por inúmeros pesquisadores, que poderiam auxiliar na resolução dos problemas e restrições encontrados na utilização da técnica FISH na avaliação das comunidades bacterioplanctônicas nos corpos de água avaliados neste estudo. Vale ressaltar que a necessidade do desenvolvimento de metodologias específicas para cada tipo de ambiente ou ecossistema escolhido a ser estudado se faz necessária, visando à melhor aplicabilidade da técnica, frente às diferenças nas características físicas e químicas dos corpos de água, diferenças entre as comunidades bacterianas presentes, conteúdos celulares, taxa de crescimento, dentre outros aspectos.

7 CONCLUSÕES

- ❖ Foram verificadas diferenças em relação qualidade química da coluna d'água e as comunidades protozooplanctônicas e bacterioplanctônicas na comparação entre as amostras procedentes do ponto CM (UTM/INB), reservatório das Antas e reservatório Bortolan;
- ❖ O reservatório das Antas foi considerado um ambiente com qualidade da água intermediária entre a UTM/INB e o reservatório Bortolan. Neste corpo de água, as condições químicas nos meses de out/08 e jul/09 estiveram relacionadas ao impacto da mineradora, que, provavelmente, liberou o efluente tratado em condições inadequadas;
- ❖ Em relação à composição do protozooplâncton, no CM, foi registrada a predominância de protozoários heterotróficos, menor diversidade e maiores valores de densidade e biomassa de protozoários. Nos reservatórios das Antas e Bortolan foi verificada predominância de protozoários ciliados heterotróficos e autotróficos, maior diversidade quando comparados ao ponto CM;
- ❖ Em relação aos valores de densidade e biomassa da comunidade protozooplanctônica, o reservatório Bortolan apresentou os maiores valores, quando comparados ao RA e ao ponto CM, provavelmente, devido à melhor qualidade química da água e às maiores concentrações de nutrientes registrados neste corpo de água;
- ❖ Neste estudo, a ocorrência de heliozoários e sarcodinos no ponto CM indicou a resistência destes protozoários às condições ambientais extremas desse ambiente;
- ❖ O potencial efeito tóxico do urânio sobre a biota aquática foi verificado principalmente no ponto CM na UTM/INB, que apresentou condições ácidas, durante todo período de estudo, permitindo a maior solubilidade desse elemento na água, o que pode estar relacionado com os menores valores de diversidade ecológica dos organismos protozooplanctônicos registrados.
- ❖ De uma maneira geral, verificou-se que o reservatório das Antas recebe maior influência da mineradora UTM/INB, sendo impactada por compostos de origem inorgânica. Já o reservatório Bortolan por estar sob influência da malha urbana da cidade de Poços de Caldas, sofre maior impacto de compostos de origem orgânica;

- ❖ De acordo com os resultados obtidos para as variáveis químicas (dureza, sulfato, fluoreto, manganês, urânio e tório), analisadas neste estudo, no perfil vertical para o RA foi verificado que, a partir do ponto Meio e Fundo, foram detectados valores para as variáveis químicas mais elevadas e acima dos limites previstos pela resolução Conama 357/05. Além disso, foi verificado, também, para o RB, valores de urânio acima do limite permitido, a partir do ponto Meio e Fundo; tais resultados reafirmam a importância da realização de um estudo no perfil vertical de lagos, a fim de detectar possíveis alterações que muitas vezes não são detectadas nos pontos de superfície.
- ❖ Os valores de índice de diversidade da comunidade protozooplânctônica registrada no ponto CM reforçou as características, descritas na literatura de que lagos de mina ácido possuem baixa diversidade de organismos planctônicos, onde somente poucas espécies conseguem viver, uma vez que foram registrados no ponto CM gêneros de protozoários totalmente distintos dos registrados nos reservatórios das Antas e Bortolan;
- ❖ Foi concluído que a técnica independente de cultivo FISH é aplicável a ambientes oligotróficos, com valores de pH da água ácidos e com elevadas concentrações de elementos químicos dissolvidos, porém, para maximizar sua eficiência, é necessário adaptar inúmeros passos metodológicos e a contínua otimização dos protocolos se faz de suma importância.
- ❖ Em relação aos resultados obtidos, após a adequação da metodologia molecular independente de cultivo Hibridização Fluorescente "In Situ", no lago ácido de mina CM e nos reservatórios das Antas e Bortolan, foi confirmada a presença de micro-organismos pertencentes ao Domínio Archaea para os três corpos de água avaliados.

REFERÊNCIAS⁵

- ABE, D. S. **Desnitrificação e caracterização filogenética de bactérias de vida livre aderidas às partículas no hipolímnio do Lago Kizaki, Japão**. 1998. 106 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, S.P. 1998.
- ABE, D. S.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ROCHA, O.; TUNDISI, J. G. Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. **Hydrobiologia**, v. 504, p. 67–76, 2003.
- ABE, D. S.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; CHAN, W. P. **Caracterização das comunidades de bacterioplâncton pela técnica de hibridização fluorescente In Situ (FISH) em corpos de água da UGRHi Tietê/Jacaré. Estado de São Paulo**. In: SIMPÓSIO DO PROGRAMA BIOTA FAPESP, 3., São Paulo, S.P. 2004, p. 79. 151 p.
- AKOTO, O.; BRUCE, N. T.; DARKO, G. Heavy metals pollution profiles in streams serving the Owabi reservoir. **African Journal of Environmental science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 353-359, 2008.
- ALBERTI, H. L. C. **Caracterização fisiográfica e avaliação hidrológica na bacia do Ribeirão das Antas, Planalto de Poços de Caldas, MG**. 2008. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências, Campinas, São Paulo, 2008.
- ALVAREZ, A. G.; FIGUEROA, D. M.; ATONDO, A. I. V.; GARCÍA, J. L. V.; HERNÁNDEZ, J. R.; TAPIA, J. A. Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), Mexico-US border. **Environmental Geology**, v. 57, p. 1469-1479, 2009.
- ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R.; SATTler, B.; GLOCKNER, O. F.; WILLE, A.; PSENNER, R. Community Analysis of the Bacterial Assemblages in the Winter cover and Pelagic Layers of a High Mountain Lake by in Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2138-2144, 1996.
- ALMEIDA, S. L. V.; MELÃO, G. G. M.; MOURA, N. A. Plankton diversity and limnological characterization in two shallow tropical urban reservoirs of Pernambuco State, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 537-550, 2012.
- AMARAL, S. C. E.; ROCHEDO, R. R. E.; PARETZKE, G. H.; FRANCA, P. E. The Radiological impact of agricultural activities in an area of high natural radioactivity. **Nuclear Technology Publishing**, v. 45, n. 1-4, p. 289-292, 1992.
- AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. **J. Bacteriol.**, v. 172. p. 762-770, 1990a.

⁴ * De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NRB 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AMANN, I. R.; BINDER, J. B.; OLSON, J. R.; CHISHOLM, W. S.; DEVEREUX, R.; STAHL, A. D. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Mixed Microbial Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919-1925, 1990b.

AMANN, R. I. Fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. **Mol. Ecol.**, v. 4, p. 543-554, 1995a.

AMANN, R. R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells with-out cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 143-169, 1995b.

AMANN, R.; SNAIDR, J.; WAGNER, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. In Situ Visualization of High Genetic Diversity in a Natural Microbial Community. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 12, p. 3496–3500, 1996.

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. **Environmental biotechnology**, v. 12, p. 231-236, 2001.

AMANN, R.; FUCHS, M. BERNHARD. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. **Reviews**, v. 6, n. 339, p. 339-348, 2008.

ANDERSON, R. T.; LOVLEY, D. R. Microbial redox interactions with uranium: an environmental perspective. In: KEITH-ROACH, M. J.; LIVENS, F. R. (Ed.). **Interactions of microorganismas with radionuclides**. Oxford: Elsevier Science Ltd., 2002. p. 205-223.

ANDRADE, I.; BRITO, F.; FERNANDES, J.; FERREIRA, M. T. Qualidade ecológica na água da Ribeira de Oeiras (Alenjo) antes da instalação das Minas Neves-Corvo. **Revista Florestal**, v. 8, n. 2, p. 19-32, 1995.

ANTUNES, C. S.; CASTRO, B. B.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Centrl Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 387-395, 2008.

ANNUAL BOOK OF ASTM STANDARDS. **Analytical methods (spectroscopy; chromatography; computerized systems)**. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 1980. Part 42. 646 p.

APHA: American Public Health Association; American Water Work Association; Water Control Federation (APHA/AWWA/WCPF) **Standard methods for health examination of water and wastewater**, 18 ed, New York: American Society, 1992. 1045 p.

APHA: American Public Health Association; American Water Work Association; Water Control Federation (APHA/AWWA/WCPF) **Standard methods for health examination of water and wastewater**, 19 ed, New York: American Society, 1995. 1041 p.

ARAÚJO, J. C. **Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes**. 2001. 189 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil/Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.

ARNDT, H.; DIETRICH, D.; AUER, B.; CLEVEN, E. J.; GRAË FENHAN, T.; WEITERE, M. Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In: LEADBEATER, B. S. C.; GREEN, J. **The flagellates**. London: Taylor & Francis, 2000. p. 240-268.

AUER, B.; ELZER, U.; ANDT, H. Comparison of pelagic food webs in lakes along a tropic gradient and with seasonal aspects: influence of resource and predation. **Journal of Plankton research**, v. 6, n. 6, p. 697-709, 2004.

AXLER, R. C.; LARSEN, C.; TIKKANEN, M.; MCDONALD, S. Y. As Water quality issues associated with aquaculture: A case study in mine pit lakes. **Water Environ. Res.**, v. 68. p. 995-1011, 1996.

AXLER, R.; YOKOM, S.; TIKKANEN, C.; MCDONALD, M.; RUNKE, H. M.; WILCOX, D.; CADY, B. Restoration of a mine pit lake from aquacultural nutrient enrichment. **Rest Ecol.**, v. 6, p. 1–19, 1998.

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 10, p. 257–263, 1983.

BICCUDO, C. E. M.; BICCUDO, D. C. **Amostragem em Limnologia**. Rima, São Carlos, SP, 351 p., 2004.

BABOROWSKI, M.; BOZAU, E. Impact of Former mining activities on the uranium distribution in the River Saale (Germany). **Applied Geochemistry**, v. 21, p. 1073-1082, 2006.

BAKER, B. J.; BANFIELD, J. F. Microbial communities in acid mine drainage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 44, p. 139-152, 2003.

BALDI, F. D.; MARCHETTO, D.; BATTISTEL, S.; DANIELE, C.; FALERI, C.; DE CASTRO, R. LANZETTA. Iron-binding characterization and polysaccharide production by *Klebsiella oxytoca* strain isolated from mine acid drainage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1241–1250, 2009.

BARRETO, C. M. P.; FUJIMORI, K. Natural analogue studies: geology and mineralogy of morro do ferro, Brasil. **Chemical Geology**, v. 55, p. 297-312, 1986.

BARROS A. D.; GUIMARÃES, C. C. J.; PEREIRA, A. A. J.; BORGES, C. A. L.; SILVA, A. R.; PEREIRA, S. A. A. Characterization of the bauxite mining of the Poços de Caldas alkaline massif and its socioenvironmental impacts. **Mineração Mining**, v. 65, n. 1, p. 127-133, 2012.

BEAVER, J. R.; CRISMAN, T. L. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. **Microbiology and Ecology**, v. 17, p. 111-136, 1989.

BIDDANDA, B.; OGDahl, M.; COTNER, J. Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. **Limnol. Oceanogr.**, v. 46, n. 3, p. 730–739, 2001.

BIYU, S. A comparative study on planktonic ciliates in two shallow mesotrophic lakes (China): species composition, distribution and quantitative importance. **Hydrobiologia**, v. 427, p. 143-153, 2000.

BATHE, S.; HAUSNE, M. Design and evaluation of 16S rRNA sequence based oligonucleotide probes for the detection and quantification of *Comamonas testosteroni* in mixed microbial communities. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 54, p. 1-8, 2006.

BENEDETTO, J. S.; ALMEIDA, S. K.; GOMES, H. A.; VAZOLLER, R. F.; LADEIRA, A. C. Q. Monitoring of sulfate-reducing bacteria in acid water from uranium mines. **Minerals Engineering**, v. 18, p. 1341-1343, 2005.

BLODAU, C. A review of acidity generation and consumption in acidic coal mine lakes and their watersheds. **Science of the Total Environment**, v. 369, p. 307–332, 2006.

BLOUIN, A. C. Patterns of plankton species, pH and associated water chemistry in Nova Scotia lakes. **Wat. Air Soil Pollut**, v. 46, p. 343–358, 1989.

BOEHRER, B. Limnology of pit lakes. Chapter 3. In: GELLER, W.; SCHULTZE, M.; KLEINMANN, B.; WOLKERSDORFER, C. (Ed.). **Acidic Pit Lakes - The Legacy of Coal and Metal Surface Mines**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, p. 23-224. 525 p.

BALVERT, S. F.; DUGGAN, I. C.; HOGG, I. D. Zooplankton seasonal dynamics in a recently filled mine pit lake: the effect of non-indigenous *Daphnia* establishment. **Aquat Ecol.**, v. 43, p. 403–413, 2009.

BARTOLELLI, K.; COCCHIONI, M.; UOMO DELL, A.; SCURI, S. Hydrobiological study of a reservoir in the central Apennines (Italy). **Ann.Limnol.-Int. J. Lim.**, v. 41, n. 2, p. 127-139, 2005.

BELL, E. M.; WEITHOFF, G. Benthic recruitment of zooplankton in an acidic lake', **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 285, p. 205-219, 2003.

BERDJEB, L.; GHIGLIONE, J. F.; JACQUET, S. Bottom-Up versus Top-Down Control of Hypo- and Epilimnion Free-Living Bacterial Community Structures in Two Neighboring Freshwater Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3591–3599, 2011.

BEULKER, C.; LESSMANN, D.; NIXDORF, B. 'Aspects of phytoplankton succession and spatial distribution in an acidic mining lake (Plessa 117, Germany). **Acta Oecologica**, v. 24, Supplement 1, p. S25-S31, 2003.

BOEHRER, B.; SCHULTZE, M. On the relevance of meromixis in mine pit lakes. In: BARNHISEL, R. I. (Ed.). PROCEEDINGS OF THE 7TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ACID ROCK DRAINAGE (ICARD), Mar 2006, St. Louis, USA. **Anais...** Lexington: American Society of Mining and Reclamation, 2006. p. 200-213.

BONOTTO, D. M. The behavior of dissolved uranium in groundwaters of the Moro do Ferro Thorium Deposit, Brazil. **Journal of Hydrology**, v. 107, p. 155-168, 1989.

BOUVIER, T. C.; Del GIORGIO, P. A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. **Microbiology Ecology**, v. 44, p. 3-15, 2003.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

BRASIL. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Ofício nº 050/SLC, de 27 de junho de 1997. **Limites derivados para os pontos de lançamento de efluentes líquidos do Complexo Industrial de Poços de Caldas da Unidade de Tratamento de Minérios das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM-INB)**. Rio de Janeiro, R.J., 1997.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. **Resolução do CONAMA para a classificação de águas de acordo com sua composição e os teores máximos de substâncias potencialmente prejudiciais**. São Paulo. Legislação: Publicado no DOU de 03 de julho de 1986, p. 5-6, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Recursos Hídricos. **Plano Nacional de Recursos Hídricos, Panorama e Estado dos Recursos Hídricos do Brasil**. Brasília, D.F., v. 1, p. 288. 2006.

BRASIL. Conselho Estadual de Política Ambiental. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 1, 05 de Maio de 2008. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências** (Publicação – Diário do Executivo – “Minas Gerais” – 13/05/2008).

BRASIL. Projeto ARCAL RLA01/10, 01 de abril de 2009. **Qualidade das águas do Ribeirão das Antas**. Poços de Caldas, M.G., 2009. v. 1, 27 p.

BRODIE, E. L.; DESANTIS, T. Z.; JOYNER, D. C.; BAEK, S. M.; LARSEN, J. T.; ANDERSEN, G. L.; HAZEN, T. C.; RICHARDSON, P. M.; HERMAN, D. J.; TOKUNAGA, T. K.; WAN, J. M.; FIRESTONE, M. K. Application of a High-Density Oligonucleotide Microarray Approach To Study Bacterial Population Dynamics during Uranium Reduction and Reoxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6288–6298, 2006.

CADJO, S.; MILETIC, A.; DJURKOVIC, A.; Zooplankton of the Potpec reservoir and the saprobiological analysis of water quality. **Science Direct**, v. 213, p. 24-28, 2007.

CHABAN, B.; JARRELL, K. F.; SANDY, Y. M. N. Archaeal habitats--from the extreme to the ordinary. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 2-73, 2006.

CAMPOS, M. B. **Ocorrência e Flutuação de Acidithiobacillus spp. Em Efluentes de Mina de Urânio, Caldas - MG.** 2006. 40 f. Monografia (Ciências Biológicas) - Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos, São João da Boa Vista, São Paulo, 2006.

CAMPOS, M. B.; AZEVEDO, H. de.; NASCIMENTO, M. R. L.; ROQUE, C. V.; RODGER, S. Environmental assessment of water from a uranium mine (Caldas, Minas Gerais State, Brazil) in a decommissioning operation. **Environmental Earth Science**, v. 62. p. 857–863, 2011.

CARLSON, R. E. A trophic state index for lakes. **Limnology and Oceanography**, v. 22, p. 361 - 380, 1977.

CIPRIANI, M. **Mitigação dos impactos sociais e ambientais decorrentes do fechamento definitivo de minas de urânio.** 2002. 332 f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Geociências, Campinas. 2002.

COMTE, J.; JACQUET, S.; VIBOUD, S.; FONTVIEILLE, D.; MILLERY, A. Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget). **Microb. Ecol.**, v. 52, p. 72–89, 2006.

COTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. **Limnology and Oceanography**, v. 48, n. 1, p. 168-187, 2003.

DAIMS, H.; NIELSEN, L. J.; NIELSEN, H. P.; SCHLEIFER, KARL-HEINZ.; WAGNER, M. In Situ Characterization of Nitrospira-Like-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5273-5284, 2001.

DECLERCK, S.; VANDEKERKHOVE, J.; JOHANSSON, L. Multi-group biodiversity in shallow lakes along gradients of phosphorus and water plant cover. **Ecology**, v. 86, p. 1905–1915, 2005.

DENEKE, R. Review of rotifers and crustaceans in highly acidic environments of pH values ≤ 3 . **Hydrobiologia**, v. 433, p. 167–172, 2000.

DERHAM, T. Communities and water quality in acidic mine lakes. 2004. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Ambiental. The University of Western Australia. Austrália. 2004.

DESSOUKI, E. C. T.; HUDSON, J. J.; NEAL, R. B.; BOGARD, J. M. The effects of phosphorus additions on sedimentation of contaminants in a uranium mine pit-lake. **Water Research**, v. 39, p. 3055-3061, 2005.

DIAS, N. N.; NICOLAU, A.; CARVALHO, G. S.; MOTA, M.; LIMA, N. Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: Ensaio *In Vitro*. In: CONFERÊNCIA

NACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO AMBIENTE, 6., 1999, Lisboa. **Anais...** Lisboa: Universidade Nova, 1999. v. 2. p. 789-798.

DRUMMOND, G. M. Contribuição à geologia do maciço alcalino de Poços. In: ELLERT, R. **Plano de manejo da reserva particular do patrimônio natural do Retiro Branco**. Minas Gerais: Fundação Biodiversitas, 2009. 177 p.

EARY, E. L. Predicting the effects of evapoconcentration on water quality in mine pit lakes. **Journal of Geochemical Exploration**, n. 64, p. 223-236, 1998.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. Baltimore: Editora United Book Press, 1995. p. 4-98. 1095 p.

EDMONDSON, W. T. **Freshwater biology**. 2nd ed. New York: Editora: Wiley, 1959. 1248 p.

ELBAZ-POULICHET, F.; MORLE, N. H.; CRUZADO, A.; VELASQUEZ, Z. A.; ACHTERBERG, E. P.; BRAUNGARDT, C. B. Trace metal and nutrient distribution in an extremely low pH (2.5) river-estuarine system, the Rio of Huelva (South-West Spain). **Science Total Environmental**, v. 227, p. 73-83, 1999.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011. 790 p.

ERIKSSON, M. O.; HENRIKSON, G. L.; NILSSON, B. I.; NYMAN, G.; OSCARSON, H. G.; STENSON, A. E. Predator-prey relations: important for biotic changes in acidified lakes. **Ambio**, v. 9, p. 248-249, 1980.

ESCHEVARRÍA, F.; CARRILLO, P.; JIMENEZ, F.; SANCHEZ-CASTILLO, P.; CRUZ-PIZARRO, L.; RODRIGUEZ, J. The size-abundance distribution and taxonomic composition of plankton in an oligotrophic, high mountain lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain). **Journal of Plankton Research**, v. 12, n. 2, p. 415-422, 1990.

FAGUNDES, J. R. T.; LEITE, A. L.; MELLO, C. E. F.; GOMES, R. C. Balanço hídrico do bota-fora BF4 da Mina de Urânio Osamu Utsumi, como Subsídio para Projetos de Remediação de Drenagem Ácida. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 13, n. 1, p. 19-28, 2008.

FAZI, S.; AMALFITANO, S.; PIZZETTI, I.; PERNTHALER, J. Efficiency of fluorescence in situ Hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content. **Systematic and Applied Microbiology**, doi:10.1016/j., 2007.

FERNANDES, N. A. E.; BODE, P. Sampling and homogenization studies of uranium mining waste rocks using normal and large-sample INAA. **Journal of Radionalytical and Nuclear Chemistry**, v. 244, n. 3, p. 589-594, 1999.

FERRAGUT, C.; BICUDO, D. C. Efeito de diferentes níveis de enriquecimento por fósforo sobre a estrutura da comunidade perifítica em represa oligotrófica tropical (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 571-585, 2009.

FERRIS, F. G.; SCHULTZE, S.; WITTEN, T. C.; FYFE, W. S.; BEVERIDGE, T. J. Metal interactions with microbial biofilms in acidic and neutral pH environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1249-1257, 1989.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G. F. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. **Biodiversity and Conservation**, n. 7, p. 1163-1186, 1998.

FORTIN, D.; FERRIS, F. G. Precipitation of iron, silica, and sulfate on bacterial cell surfaces. **Geomicrobiology Journal**, v. 15, n. 4, p. 309-324, 1998.

FERRARI, A. C. **Comunidade de bactérias e de nanoflagelados ao longo de um gradiente trófico em ambientes subtropicais rasos**. 2002. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.

FERRARI, C. R. **Avaliação de efeitos ambientais de efluentes radioativos de mineração de urânio sobre as características físicas, químicas e diversidade da Comunidade Zooplantônica na Unidade de Tratamento de Minérios, Represa das Antas e Represa Bortolan, Poços de Caldas (M. G.)**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

FRANKS, H. A.; HARMSSEN, M. J. H.; RAANGS, C. G.; JANSEN, J.; WELLING, W. G.; SCHUT, F. Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent in Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3336-3345, 1998.

FRIESE, K.; HUPFER, M.; SCHULTZE, M. Acidic mining lakes: acid mine drainage, limnology, and reclamation. In: GELLER, W.; KLAPPER, H.; SOLOMONS, W. (Ed.). **Chemical characteristics of water and sediment in acid mining lakes of the lusatian lignite district**. Berlin: Springer Verlag, 1998. p. 25-46.

FRÖMMICHEN, R.; KELLNER, S.; FRIESE, K. Sediment conditioning with organic and/or inorganic carbon sources as a first step in alkalinity generation of acid mine pit lake water (pH 2-3). **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, p. 1414-1421, 2003.

FRÖMMICHEN, R.; WENDT-POTTHOFF, K.; FRIESE, K.; FISCHER, R. Microcosm studies for neutralization of hypolimnetic acid mine pit water (pH 2.6). **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 1877-1887, 2004.

FOISSNER, W. J.; BERGER, H.; KOHMANN, F. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida – Informationsberichte des Bayer. **Landesamtes für Wasserwirtschaft**, v. 5, p. 1-502, 1992.

FOISSNER, W. J.; BERGER, H. A user friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. **Freshwater Biology**, v. 35, p. 375-482, 1996.

FOISSNER, W.; BERGER, H.; SCHAUMBURG, J. **Identification and ecology of limnetic plankton ciliates**. Bavarian: Editora Munichen, 1999. 793 p.

FUKUMA, H. T.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; NASCIMENTO, M. P.; QUINELATO, A. L. Separation and spectrophotometric determination of thorium contained in uranium concentrates. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 248, n. 3, p. 549-553, 2001.

FYSON, A.; NIXDORF, B.; KALIN, M. The acidic lignite pit lakes of Germany—Microcosm experiments on acidity removal through controlled eutrophication. **Ecological Engineering**, v. 28, p. 288–295, 2006.

GAMMONS, C. H.; WOOD, S. A.; JONAS, J. P.; MADISON, J. P. Geochemistry of the rare-earth elements and uranium in the acidic Berkeley Pit lake, Butte, Montana. **Chemical Geology**, v. 198, p. 269-288, 2003.

GARCIA, Jr. O. **Estudos da biolixiviação de minérios de urânio por *Thiobacillus ferrooxidans***. 1989. 261 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1989.

GARCÍA, P. R.; NANDINI, S.; SARMA, S. S. S.; VALDERRAMA, E. R.; CUESTA, I.; HURTADO, M. D. Seasonal variations of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (Mexico). **Hydrobiologia**, v. 467, p. 99-108, 2002.

GEIBLER, A. **Prokaryotic microorganisms in uranium mining waste piles and their interactions with uranium and other heavy metals**. 2007. 190 f. Dissertação (Mestrado) - Von der Fakultät für Chemie und Physik der Technischen Universität Bergakademie Freiberg genehmigte, Germany. 2007.

GELLER, W.; KOSCHORRECK, M.; POTTHOFF, W. K.; BOZAU, E.; HERZSPRUNG, O. B.; SCHULTZE, M. A pilot-scale field experiment for the microbiol neutralization of a holomictic acidic pit lake. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 100, p. 153-159, 2009.

GELLER, W. (Ed.). **Acidic pit lakes, environmental science and engineering**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILLOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1981. p. 29. 250 p.

GILBERT, D.; AMBLARD, C.; BOURDIER, G.; FRANCEZ, A. J. The Microbial Loop at the Surface of a Peatland: Structure, Function, and Impact of Nutrient Input. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 83–93, 1998.

GLOCKNER, O. F.; AMANN, R.; ALFREIDER, A.; PERNTHALER, J.; PSENNER, R.; TREBESIOUS, K.; SCHLEIFER, K. An In Hybridization Protocol for Detection and Identification of Planktonic Bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 19, p. 403-406, 1996.

GLOCKNER, O. F.; FUCHS, M. B.; AMANN, R. Bacterioplankton Compositions of Lakes and Oceans: a First Comparison Based on Fluorescence In Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3721-3726, 1999.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for chemical analysis of freshwater**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications., 1978. (IBP Handbook, n. 8). 213 p.

GONZÁLEZ-TORIL, E.; LLOBET-BROSSA, E.; CASAMAYOR E. O.; AMANN, R.; AMILS, R. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4853-4865, 2003.

GREANEY, K. M. **An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago, Gulf of Panama**. 2005. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Science in Marine Resource Development and Protection. School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh. 2005.

GUIMARÃES, J. C. C. Reabilitação de minas de bauxita em florestas nativas: “método tradicional” versus “método ecológico”. **Informe Agropecuário**, v. 29, n. 244, p. 30-33, 2008.

GUI-ZHEN, H.; YONG-LONG, L.; HUA, M.; XIAO-LONG, W. Multi-indicator assessment of water environment in government environmental auditing. **Journal of Environmental Science**, v. 19, p. 494-501, 2007.

HAHN, D.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; AKKERMANS, A. D. L.; SCHLEIFER, K. H. Detection of micro-organisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. **J. Gen. Microbiol.**, v. 138, p. 879-887, 1992.

HAHN, D.; AMANN, R. I.; ZEYER, J. Whole-cell hybridization of Frankia strains with fluorescence- or digoxigenin-labeled, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1709-1716, 1993.

HAHN, M. W.; LÜNSDORF, H.; WU, Q.; SCHAUER, M.; HÖFLE, M. G. BOENIGK, J.; STADLER, P. Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1442–1451, 2003.

HAKAM, K. O.; CHOUKRI, A.; MOUTIA, Z.; CHOUAK, A.; CHERKAoui, R.; REYSS, L. J.; LFERDE, M. Uranium and radium in groundwater and surface water samples in Morocco. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 61, p. 653-654, 2001.

HELDAL, M.; BRATBAK, G. Production and decay of viruses in aquatic environments. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 72, p. 205–212, 1991.

HOBBIE, J. E.; DALEY, R. J.; JASPER, S. Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1225-1228, 1977.

HOLMES, D. E.; FINNERAN, K. T.; O'NEIL, R. A.; LOVLEY, D. R. Enrichment of members of the family *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2300-2306, 2002.

HORVÁTH, H.; MÁTYÁS, K.; SÜLE, G.; PRÉSING, M. Contribution of nitrogen fixation to the external nitrogen load of a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). **Hydrobiologia**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2012.

HOSHINO, T.; YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R.; DAIMS, H.; WAGNER, M. Quantification of Target Molecules Needed To Detect Microorganisms by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Catalyzed Reporter Deposition-FISH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5068-5077, 2008.

INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL (INB). **Relatório Indústrias Nucleares do Brasil (INB) - Complexo Industrial do Planalto de Poços de Caldas - CIPC para solicitador Licença de Operação junto ao IBAMA**. Poços de Caldas: Diretoria de Recursos Minerais DRM da INB, 1999. 110 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO (IBRAM). **Informações e análises da economia mineral brasileira**. 4. ed. 2008. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/sites>>. Acesso em: 01 jun. 2010.

INSTITUTO DE GESTÃO DAS ÁGUAS DE MINAS. (IGAM). **Gestão de recursos hídricos - comitês de bacias**. Disponível em: <<http://www.igam.mg.gov.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2008.

INDÚSTRIAS NUCLEARES DO BRASIL (INB). **Reservas de urânio mundiais**. Disponível em: <www.inb.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2013.

JONES, J. G. A guide to methods for estimation microbial numbers and biomass in freshwater. **Scientific Public Freshwater. Biol. Ass.**, n. 39, 1979.

JÜRGENS, K.; PERNTHALER, J.; SCHALLA, S.; AMANN, R. Morphological and Compositional Changes in a Planktonic Bacterial Community in Response to Enhanced Protozoan Grazing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1241-1250, 1999.

JYOTHIBABU, R.; MADHU, N. V.; MAHESWARAN, P. A.; JAYALAKSHMY, K. V.; NAIR, K. K. C.; ACHUTHANKUTTY, C. T. Seasonal variation of microzooplankton (20–200 µm) and its possible implications on the vertical carbon flux in the western Bay of Bengal. **Continental Shelf Research**, v. 28, p. 737-755, 2008.

JEPPESEN, E.; LAURIDSEN, L. T.; MITCHELL, F. S.; CHRISTOFFERSEN, K.; BURNS, W. C., Trophic Structure in 25 Shallow New Zealand lakes: changes along nutrient and fish gradients. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 5, p. 951-968, 2000.

JERROLD, H. Z. **Biostatistical Analysis**. 5th ed. New York: Library of Congress Cataloging in Publication. Pearson Prentice Hall, 2010. 960 p.

KALIN, M.; YONG, C.; MARTIN S.; OLAVESON, M. M. Development of the phytoplankton community in a pit-lake in relation to water quality changes. **Water Research**, v. 35, n. 13, p. 3215–3225, 2001.

KAMJUNKE, N.; GAEDKE, U.; TITTEL, J.; WEITHOFF, G.; BELL, E. M. Strong vertical differences in the plankton composition of an extremely acidic lake. **Arch Hydrobiol.**, v. 161, n. 3, p. 289–306, 2004.

KAMJUNKE, N.; KÖHLER, B.; WANNICKE, N.; TITTEL, J. Algae as competitors of heterotrophic bacteria for glucose. **J. Phycol.**, v. 44, p. 616–623, 2008.

KAMPE, H.; DZIALLAS, C. L.; GROSSART, P.; KAMJUNKE, N. Similar Bacterial Community Composition in Acidic Mining Lakes With Different pH and Lake Chemistry. **Microbiology Of Aquatic Systems.**, v. 60, p. 618–627, 2010.

KAPUSTKA, A. L.; CLEMENTS, H. W.; ZICCARDI, L.; PAQUIN, M. S.; WALL, D. **Issue paper on the ecological effects of metals. U.S.** Environmental Protection Agency. Risk Assessment Forum 1200 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, D.C.: Springer Verlag, 2004. 74 p.

KASHEFI, K.; LOVLEY, D. R. Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1050–1056, 2000.

KIHLMAN, S.; KAUPPILA, T. Tracking the Aquatic Impacts of a Historical metal Mine Using Lacustrine Protists and Diatom Algae. **Mine Water Environ.**, v. 29, p. 116–134, 2010.

KIRCHMAN, L. D.; DITTEL, I. A.; MALMSTROM, R. R.; COTTRELL, T. M. Biogeography of bacterial groups in Delawarew Estuary. **Limnol. Oceanogr.**, v. 50, n. 5, p. 1697–1706, 2005.

KLAPPER, H.; SCHULTZE, M. Geogenically acidified mining lakes living conditions and possibility of restoration. **Internationale Revue gesamten Hydrobiologie**, v. 80, p. 639–653, 1995.

KLEEBERG, A.; GRÜNEBERG, B. Phosphorus mobility in sediments of acid mining lakes, Lusatia, Germany. **Ecological Engineering**, v. 24, p. 89–100, 2005.

KLEEBERG, A.; SCHUBERT, H.; KOSCHORRECK, M.; NIXDORF, B. Abundance and primary production of filamentous green algae *Zygonium ericetorum* in an extremely acid (pH 2.9) mining lake and its impact on alkalinity generation. **Freshwater Biology**, v. 51, p. 925–937, 2006.

KOCK, D.; SCHIPPERS, A. Quantitative microbial community analysis of three different sulfidic mine tailing dumps generating acid mine drainage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 16, p. 5211–5219, 2008.

KONHAUSER, K. O.; SCHULTZE-LAM, S.; FERRIS, F. G.; FYFE, W. S.; LONGSTAFFE, F. J.; BEVERIDGE, T. J. Mineral precipitation by epilithic biofilms in the Speed River, Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n 2, p. 549-553, 1994.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of sea water analysis**. Berlim: Verlag Chemie Weinheim, 1976. p. 117-181. 342 p.

KOTELNIKOVA, S.; MACARIO, A. J. L.; PEDERSEN, K. *Methanobacterium subterraneum* sp. a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 357-367, 1998.

KUMAR, N. R.; MCCULLOUGH, D. C. L.; LUND, A. M.; NEWPORT, M. Sourcing Organic Materials for Pit Lake Bioremediation in Remote Mining Regions. **Mine Water Environ.**, v. 30, p. 296-301, 2011.

KRAWCZYK-BÄRSCH, E.; LÜNSDORF, H.; ARNOLD, T.; BRENDLER, V.; EISBEIN, E.; JENK, U.; ZIMMERMANN, U. The influence of biofilms on the migration of uranium in acid mine drainage (AMD) waters. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 3059-3065, 2011.

LADEIRA, Q. CA.; GONÇALVES, R. C. Influence of anionic on uranium separation from acid mine water using strong base resins. **Journal of Hazardous Material**, v. 148, p. 499-504, 2007.

LAGE-FILHO, A. L. **Características ecológicas e limnológicas da bacia hidrográfica do Ribeirão das Antas, no período de menores precipitações (Poços de Caldas – MG)**. 1996. 192 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

LAYBOURN-PARRY, J. **Protozoan planckton ecology**. London: Chapman & Hall, 1992. 231 p.

LEE, J. J.; HUTNER, S. H.; BOVEE, E. C. **An illustrated guide to the Protozoa**. Kansas: Society of Protozoologists, 1985. 629 p.

LEE, J. J.; SOLDÓ, A. T. Protocols in Protozoology. In: FOISSNER, W. **Evaluating water quality using protozoa and saprobity indexes**. 1. ed. v. 2. Cap. 1 Salzburg: Editora Society of Protozoology, p. 1–19. 1992.

LEE, S.; BASU, S.; TYLER, C. W.; WEI, I. W. Ciliate populations as bio-indicators at Deer Island Treatment Plant. **Advances in Environmental Research**, v. 8, p. 371-378, 2004.

LEDIN, M.; PEDERSEN, K. The environmental impact of mine Wastes-Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. **Earth-Science Reviews**, v. 41, p. 67-108, 1996.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. Numerical ecology developments in environmental modelling, 3. **Elsevier Sci. Publ. Company**, 419 p, 1983.

LENTINI, V. V.; GUGLIANDOLO, C. C.; MAUGERI, T. L. T. L. Vertical distribution of Archaea and Bacteria in a meromictic lake as determined by fluorescent in situ hybridization. **Current Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 66-74, 2012.

LEONARDI, F. A.; LADEIRA, F. S. B.; SANTOS, M. Perfis bauxíticos do planalto de Poços de Caldas SP/MG: análise geoquímica e posição na paisagem. **Revista de Geografia**, n. 1, Set. 2010. (Publicação do VIII SINAGEO - Recife: UFPE – DCG/NAPA, v. especial).

LESSMANN, D.; NIXDORF, B. Acidification control of phytoplankton diversity, spatial distribution and trophic in mining lakes. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v. 21, p. 2208-2211, 2000.

LESSMANN, D.; UHLMANN, W.; GÜNEWALD, U.; NIXDORF, B. In: Proceedings of the Sixth ICARD. **Sustainability of the flooding of lignite mining lakes as a remediation technique against acidification in the Lusatian mining district, Germany**. Cairns, Australia, Qld, 14–17 July. p. 521–527, 2003. 261 p.

LINDSTRÖM, E. S.; AGTERVELD, M. P. K. V.; ZWART, G. Distribution of Typical Freshwater Bacterial Groups Is Associated with pH, Temperature, and Lake Water Retention Time. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 8201–8206, 2005.

LOBO, E.; LEIGHTON, G. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctonica de los sistemas de desembocaduras de rios e esteros de la zona central de Chile. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 22, n. 1, p. 1-29, 1986.

LÓPEZ-ARCHILLA, A. I.; AMILS, R.; MARÍN, I.; AMILS, R. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto river, Spain. **Microbial. Ecol.**, v. 41, n. 1, p. 20-35, 2001.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**, v. 12, p. 343-346, 1967.

LOVEJOY, C.; VINCENT, W. F.; FRENETTE, J. J.; DODSON, J. J. Microbial gradients in a turbid estuary: Application of a new method for protozoan community analysis. **Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 6, p. 1295-1303, 1993.

LUGO, A.; MARTINEZ, S.; RIVERA, F.; SANCHEZ, R. Protozoan indicator communities in waste stabilization pond systems. **Biological Approach to Sewage Treatment Process: Current Status and Perspectives**, p. 115-118, 1991.

LUÍS, A. T.; TEIXEIRA, P.; ALMEIDA, S. F. P.; MATOS, J. X.; SILVA, E. F. Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal): Chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4312-4325, 2011.

LYEW, D.; SHEPPARD, J. Technical Note Use of Conductivity to Monitor the Treatment of Acid Mine Drainage by Sulphate-Reducing Bacteria. **Water Research**, v. 35, n. 8, p. 2081-2086, 2001.

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. Water analysis. In: WILSON, T. **Some revised methods for limnologists. Freshwater Biological Association**. Scientific Association. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd. 1978. 117 p.

MACKINTOSH, M. E. Nitrogen Fixation by Thiobacillus ferrooxidans. **Journal of General Microbiology**, v. 105, p. 215-218, 1978.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. San Francisco, USA: Benjamin Cummings, 2011. 1043 p.

MAGEED, A. A.; MOHAMMADEIN, A.; DESOUKY, M. Importance of Protozoa as Food to Zooplankton and some Fish Species in Lake Qaroun, Egypt. **Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.**, v. 6, n. 2, p. 59-74, 2002.

MOHAPATRA, B. R.; GOULD, W. D.; DINARDO, O.; KOREN, D. W. Tracking the prokaryotic diversity in acid mine drainage-contaminated environments: A review of molecular methods. **Materials Engineering**, v. 24, p. 709-718, 2011.

MADONI, P. Ciliated protozoa and water quality in the Parma River (Northern Italy): long-term changes in the community structure. **Hydrobiologia**, v. 264, p. 129-135, 1993.

MADONI, P. Ciliated protozoan communities and saprobic evaluation of water quality in the hilly zone of some tributaries of the Po River (northern Italy). **Hydrobiologia**, v. 541, p. 55-69, 2005.

MADONI, P.; ROMEO, M. G. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. **Environmental and Pollution**, v. 141, p. 1-7, 2006.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic oligonucleotide probe for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. **Systematic Applied Microbiology**, v. 15, p. 593-600, 1992.

MARGALEF, R. Counting. In: VOLLENWEIDER, R. A. **A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments and molecular approaches**. New York: Oxford, 1969. p. 9-46. 203 p.

MARGALEF, R. **Limnologia**. Barcelona: Omega, 1983. 1010 p.

MARKER, A. F. H.; NUSCH, E. A.; RAI, H.; RIEMANN, B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. **Archive Hydrobiological Beih Ergebn Limnologie**, v. 14, p. 91-106, 1980.

MAHAMOUD, K. K.; LEDUC, L. G.; FERRONI, G. D. Detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in acid mine drainage environments using fluorescent in situ hybridization (FISH). **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p. 33-45, 2004.

MARQUES, C. N. **Análise morfológica de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio destativada com ênfase em *Aphanothece* e sua capacidade de bio sorção do ^{226}Ra** . 2006. 118f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. Calanoida (Copepoda) species composition changes in the reservoirs of São Paulo State (Brazil) in the last twenty years. **Hydrobiologia**, v. 504, p. 215-222, 2003.

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. Plankton in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 542, p. 367-378, 2005.

MIECZAN, T. Relationships among ciliated protozoa and water chemistry in small peat-bog reservoirs (Łęczna-Włodawa Lakeland, Eastern Poland). **International Journal of Oceanography and Hydrobiology**, v. 36, n. 2, p. 77-86, 2007.

MIKRJUKOV, K. A.; PATTERSON, D. J. Taxonomy and Phylogeny of Heliozoa. III. Actinophryids. **Acta Protozoologica**, v. 40, p. 3-25, 2001.

MINCHIN, E. A. **Protozoa Microbiology & Guide to Microscopic Identification**. Seaside, OR: Watchmaker Publishing, 2003. 257 p. 536 p.

MORAIS, F. T.; JIMÉNEZ-RUEDA, J. R. Fisiografia da região do planalto de Poços de Caldas, MG/SP. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 38, n. 1, p. 196-208, 2008.

MONIZ, A. C. **Estudo mineralógico de argilas do maciço alcalino de Poços de Caldas**. 1964. 304 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., 1964.

MONTENEGRO, M. A.; Araújo, J. C.; Vazoller, R. F. Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence in situ hybridization. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 6, p. 65-73, 2003.

MORRIS, D. P.; LEWIS, JR. M. Nutrient limitation of bacterioplankton growth in Lake Dillon, Colorado. **Limnol. Oceanogr.**, v. 37, n. 6, p. 1179-1192, 1992.

MOSER, M.; WEISSE, T. H. The most acidified Austrian lake in comparison to a neutralized mining lake. **Limnologia**, v. 41, p. 303-315, 2011.

MOSTAJIR, B.; DOLAN, R. J.; RASSOULZADEGAN, F. Seasonal variations of pico-and nano-detrital particles (DAPI YELLOW Particles, DYP) in the Ligurian Sea (NW Mediterranean). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 9, p. 267-277, 1995.

NASCIMENTO, M. R. L.; FUKUMA, H. T.; HORTELLANI, M. A. **Projeto Itataia** – Controle de processo na produção de ácidos fosfórico e urânio. Poços de Caldas: INB, 1988. 143 p. (Manual de Métodos e Análises Químicas).

NASCIMENTO, M. R. L. **Proposição de valores de Referência para Concentração de Metais e Metalóides em Sedimentos Limnóticos e Fluviais na Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, SP.** 2003. 111 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

NEVIN, K. P.; FINNERAN, K. T.; LOVLEY, D. R. Microorganisms associated with uranium bioremediation in a high-salinity subsurface sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3672-3675, 2003.

NICOMRAT, D.; DICK, W. A.; TUOVINEN, O. H. Microbial community structure in iron precipitates from a constructed wetland treating acid coal mine drainage. **International Biohydrometallurgy Simposium**. September, 16-19, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. Poster 18. 2001.

NICOMRAT, D.; DICK, W. A.; TUOVINEN, O. H. Microbial Populations Identified by Fluorescence In Situ Hybridization in a Constructed Wetland Treating Acid Coal Mine Drainage. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 1329-1337, 2006.

NISHIO, R. S. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares- FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de descargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa.** 2010. 156 f. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, S.P. 2010.

NIXDORF, B. K.; WOLLMANN, K.; DENEKE, R. Ecological potentials for planktonic development and food web interactions in extremely acidic mining lakes in Lusatia (Eastern Germany). In GELLER, W.; KLAPPER, H.; SALOMONS, W. (Eds.). **Acidic mining lakes**. Germany: Springer Verlag. 1998, p. 147-168. 263 p.

NIXDORF, F. B.; MISCHKE, U.; LEBMANN, D. Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists extremely acidic mining lakes (pH < 3) in Lusatia (Germany). **Hydrobiologia**, v. 369-370, p. 315-327, 1998.

NIXDORF, B.; KRUMBECK H.; JANDER J.; BEULKER C. Comparison of bacterial and phytoplankton productivity in extremely acidic mining lakes and eutrophic hard water lakes. **Acta Oecologica**, v. 24, p. 281-288, 2003.

NIXDORF, B.; UHLMANN, W.; LESSMANN, D. Potential for remediation of acidic mining lake evaluated by hydrogeochemical modeling: Case study Grunewalder Lauch (Plessa 117, Lusatia/Germany). **Limnologia**, v. 40, p. 167-174, 2010.

NORDSTROM, D. K.; SMELLE, J. A. T.; WOLF, M. **Chemical and isotopic composition of groundwaters and their seasonal variability at the Osamu Utsumi mine and Morro do**

Ferro analogue study sites, Poços de Caldas, Brazil. Sweden: Swedish Nuclear Fuel and Waste Management CO, 1990. 111 p.

NORTH, N. N.; DOLLHOPF, S. L.; PETRIE, L.; ISTOK, J. D.; BALKWILL, D. L.; KOSTKA, J. E. Change in bacterial community structure during in situ biostimulation of subsurface sediment cocontaminated with uranium and nitrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4911-4920, 2004.

NYMAN, J. L.; MARSH, T. L.; GINDER-VOGEL, M. A.; GENTILE, M.; FENDORF, S.; CRIDDLE, C. Heterogeneous response to biostimulation for U(VI) reduction in replicated sediment microcosms. **Biodegradation**, v. 17, p. 303-316, 2006.

ODUM, E. **Princípios de ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 434 p.

OCHSENREITER, T.; SELEZI, D.; QUAISER, A.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, L.; SCHLEPER, C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 787–797, 2003.

OLIVEIRA, M. A. **Prospecção, pesquisa e produção de urânio no Brasil**: planejamento, busca e resultados. 2011. 51 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) - Departamento de Estudos da Escola Superior de Guerra. Rio de Janeiro, R.J. 2011.

OLSON, G. J.; BRIERLEY, J. A.; BRIERLEY, C. L. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 63, p. 249–257, 2003.

OYEDELE, A. J.; SHIMBOYO, S.; SITOKA, S.; GAOSEB, F. Assenssment of radioactiviy in the soil of Rossing U ranium Mine and its satellite town Wester Namibia, southern Africa. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A.**, v. 619, p. 467-469, 2010.

PACE, M. L.; ORCUTT JR. J. D. The relative importance ofprotozoans, rotifers, and crustaceans in a freshwater zooplankton community. **Limnological and Oceanography**, v. 26, p. 822-830, 1981.

PACKROFF, G. Protozooplankton in acidic mining lakes with special respect to ciliates. **Hydrobiologia**, v. 433, p. 157-166, 2000.

PAGE, F. C. **An Illustrated key to Freshwater and Soil Amoebae**. San Francisco: Freshwater Biological Association, 1976. n. 34, p. 155 p.

PANTLE, R.; BUCK, H. Die biologische Überwachung der Gewässer und die Darstellung der Ergebnisse. **Gasu. WassFach (Wasser/Abwasser)**, v. 96, p. 604– 620, 1955.

PEDROZO, F.; KELLY, L.; DIAZ, M.; TEMPORETTI, P.; BAFFICO, G.; KRINGEL, R.; FRIESE, K.; MAGES, M.; GELLER, W.; WOELFL, S. First results on the water chemistry, algae and trophic status of an Andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). **Hydrobiologia**, v. 452, p. 129-137, 2001.

PENNAK, R. W. **Freshwater Invertebrates**. New York: Editora: Ronald, 1953. 769 p.

PERNTHALER, J.; GLOÖCKNER, F. O.; UNTERHOLZNER, S.; ALFREIDER, A.; PSENNER, R. AND AMANN, R. Seasonal community and population dynamics of pelagic Bacteria and Archaea in a high mountain lake. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4299-4306, 1998.

PETRUCIO, M. M.; BARBOSA, R. A. F.; FURTADO, S. L. A. Bacterioplankton and phytoplankton production in seven lakes in the Middle Rio Doce basin, south-east Brasil. **Limnologia**, n. 36, p. 192-203, 2006.

PINHEIRO, A. J. G. **Caracterização do compartimento bacteriano do estuário do Rio Minho com base em dados da sua culturabilidade e de epifluorescência**. 1998. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Minho, Porto, Portugal. 1998.

POPOVSKAYA, G. I.; FIRSOVA, D.; BESSUDOVA, A. Y.; SAKIRKO, M. V.; SUTURIN, A. N.; LIKHOSHWAY, Y. V. Phytoplankton of the Irkutsk Reservoir as an indicator of water quality. **International Journal of Oceanography and Hydrobiology**. v. 24, n. 2, p. 29-38, 2012.

PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of dapi for identifying and counting microflora. **Limnology and Oceanography**, v. 25, p. 943-948, 1980.

POSTON, T. M.; HANF JR.; R. W.; SIMMONS, M. A. Toxicity of uranium to *Daphnia magna*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 22, p. 289-298, 1984.

PUTT, M.; STOECKER, D. K. An experimentally determined carbon: volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters. **Limnology and Oceanography**, v. 34, n. 6, p. 1097-1103, 1989.

REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. **Águas Doces do Brasil: Capital Ecológico, Uso e Conservação**. 3. ed. São Paulo, S.P.: Editora Escrituras, 2006. 748 p.

REGALI-SELEGHIM, M. H. **Flutuações nas comunidades planctônicas e bentônicas de um ecossistema artificial raso (Represa do Monjolinho – São Carlos – SP), com ênfase nas populações de protozoários e bactérias**. 1992. 162 f. (Dissertação) Mestrado – Faculdade de Biologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 1992.

REGALI-SELEGHIM, M. H.; GODINHO, M. J. L.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Checklist dos "protozoários" de água doce do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropical**, v. 11, n. 1, p. 140-172, 2011.

RELATÓRIO PROJETO ARCAL RLA01/10. **Qualidade das Águas do Ribeirão das Antas**. 2009. 27 p.

REYNOLDS, C. S.; TUNDISI, J. G.; HÍNO, K. Observations on a Metalimnetic *Lyngya* Population in a Stably Stratified Tropical Lake (Lagoa Carioca Eastern Brazil). **Arch. Hydrobiol.**, v. 97, p. 1-14, 1997.

RODGHER, S.; AZEVEDO, H.; FERRARI, R. C.; ROQUE, V. CL.; LEILANE, B. R.; CAMPOS, B. M.; NASCIMENTO, L. R. M.; Evaluation of surface water quality in aquatic bodies under the influence of uranium mining (MG, Brasil). **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, n. 3, p. 2395-2406, 2013.

RÖNICKE, H.; SCHULTZE, M.; NEUMANN, V.; NITSCHKE, C.; TITTEL, J. Changes of the plankton community composition during chemical neutralisation of the Bockwitz pit lake. **Limnologia**, v. 40, p. 191-198, 2010.

RONQUI, L. B. **Caracterização sazonal de bactérias, protozoários e de fitoflagelados planctônicos na Represa das Antas em Poços de Caldas – Minas Gerais**. 2004. 70 f. Trabalho de conclusão de curso (Monografia) – Faculdade de Ciências Biológicas. Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos, São João da Boa Vista, S.P. 2004.

RONQUI, L. B. **Caracterização Limnológica e Avaliação de Efeitos Ambientais causados por efluentes de mina de urânio sobre populações microbianas planctônicas da Represa das Antas, Caldas (MG)**. 2008. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P. 2008.

RONQUI, L. B.; AZEVEDO, H.; NASCIMENTO, M. R. L.; MACACINI, J. F.; ROQUE, C. V.; SELEGHIM, M. H. R. Radioecological evaluation (spatial and temporal variation) of the planktonic microorganisms in the Antas Reservoir, Caldas, Minas Gerais, Brazil. **Atoms for Peace: an International Journal**, v. 3, n. 1, p. 33-49, 2010.

ROSAS, I.; VELASCO, A.; BELMOT, R.; BÁEZ, A.; & MARTINEZ, A. The Algal Community as an Indicator of the Trophic Status of Lake Patzcuaro, Mexico. **Environmental Pollution**, v. 80, p. 255-264, 1993.

RÜMMLER, J.; BEKELE, E.; TOZE, S. J. **Preliminary Hydrogeological Characterisation for Proposed Covered Infiltration Galleries at CSIRO Laboratory, Floreat, Western Australia**. Client Report for Water Corporation, Western Australia. Water for a Healthy Country National Research Flagship report. CSIRO, Canberra, Austrália. 2005. 47 p.

SCHIPPERS, A.; HALLMAN, R.; WENTZIEN, S.; SAND, W. Microbial Diversity in Uranium Mine Waste Heaps. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2930-2935, 1995.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic Studies of Uncultivated Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 479-488, 2005.

SCHMIDTKE, A.; BELL, E. M.; WEITHOFF, G. Potential grazing impact of the mixotrophic flagellate *Ochromonas* sp. (Chrysophyceae) on bacteria in an extremely acidic lake. **Journal of Plankton Research**, v. 28, n. 11, p. 991-1001, 2006.

SCHRENK, M. O.; EDWARDS, K. J.; GOODMAN, R. M.; HAMERS, R. J.; BANFIELD, J. F. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage. **Science**, v. 279, p. 1519-1522, 1998.

SCHWEIZER, A. From littoral to pelagial: comparing the distribution of phytoplankton and ciliated protozoa along a transect. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 7, p. 829-848, 1997.

SEKAR, R.; PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; WARNECKE, F.; POSCH, T.; AMANN, R. An Improved Protocol for Quantification of Freshwater Actinobacteria by Fluorescence in Situ Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2928-2935, 2003.

SHEPPARD, S. C.; SHEPPARD, M. I.; GALLERAND, M. O.; SANIPELLI, B. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 79, p. 55-83, 2005.

SHERR, E. B.; SHERR, B. F. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 5, p. 1225-1227, 1988.

SHERR, E. B.; SHERR, B. F. Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In: KEMP, P. F.; SHERR, E. B.; SHERR, B. F.; COLE, J. J. (Eds.). **Handbook of methods in aquatic microbial ecology**. Flórida, USA: Lewis Publishers, 1993. p. 215-223. 387 p.

SHERR, E.B.; SHERR, B.F. Bacterivory and herbivory: key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. **Microbiol Ecology**, v. 28, p. 223-235, 1994.

SHERR, B. F.; SHERR, E. B. Marine microbes: an overview. In: KIRCKMAN, D. **Microbial ecology of the oceans**. 1. ed. New York, USA: Editora Wiley-Liss. 2000, p. 13-46. 187 p.

SHERR, E. B.; SHERR, B. F. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. **Journal Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 293-308, 2002.

SÍMEK, K.; KOJECKÁ, P.; NEDOMA, J.; HARTMAN, P.; VRBA, J.; DOLAN, J. R. **Changes in bacterial community composition caused by protistan bacterivory: Laboratory and field evidence**. In: Proceedings of the Sixth European Marine Microbiology Symposium. p. 17-21, Abstract. Sitges, Spain. 1998. 41 p.

SOROKIN, Y. I.; KADOTA, H. **Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters**. Oxford: Editora Blackwell, 1972. 112 p.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A manual of seawater analysis. **Bulletin of Fisheries Research Board Canada**, v. 125, p. 1-18, 1960.

SUN, J.; LIU, D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, v. 25, n. 11, p. 1331-1346, 2003.

SOUZA, P. V. **Drenagens ácidas do estéril piritoso da mina de urânio de Poços de Caldas: interpretação e implicações ambientais**. 1995. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Escola de Engenharia. Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P. 1995.

STAHL, D. A.; AMANN, R. I. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, F. **Development and application of nucleic acid probes**. New York, USA: (Ed.). John Wiley & Sons. 1991. p. 205-248.

STAR. STRATEGIC RESEARCH AGENDA. **A draft document produced by a Working Group within the STAR Network of Excellence. European Commision**. Disponível em: <www.star-radioecology.org>. Acessado em: 01 jun. 2012.

STEIN, L. Y.; JONES, G.; ALEXANDER, B.; ELMUND, K.; WRIGHT-JONES, C.; NEALSON, K. H.; Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 431-440, 2002.

SUZUKI, Y.; KELLY, S. D.; KEMMER, K. M.; BANFIELD, J. F. Microbial Populations Stimulated for Hexavalent Uranium Reduction in Uranium Mine Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1337-1346, 2003.

SUZUKI, Y.; KELLY, S. D.; KEMMER, K. M.; BANFIELD, J. F. Direct Microbial Reduction and Subsequent Preservation of Uranium in Natural Near-Surface Sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1790-1797, 2005.

SZPAKOWSKA, B.; KARLIK, B.; KRZESINSKI, W.; GOLINSKI, PIOTR.; SZCZESNA, M.; MLECZEK, M. Oceanological and Hydrobiological Studies. **International Journal of Oceanography and Hydrobiology**, v. 39, n. 2, p. 113-120, 2010.

TAKAI, K.; MOSER, D. P.; DEFLAUN, M.; ONSTOTT, T. C. & FREDRICKSON, J. K. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 5750-5760. 2001.

TAKAMURA, N.; SHEN, Y.; XIE, P. Species richness of Protozoa in Japanese lakes. **Limnology**, v. 1, p. 91-106, 2000.

TEIXEIRA, C.; TUNDISI, J. G.; KUTNER, M. B. Plankton studies in a mangrove II. The standing stock and some ecological factors. **Bolmish Institute Oceanography**, v. 24, p. 23-41, 1965.

TER BRAAK, C. J. F. Canonical correspondence analysis: A new eigenvector thechique for multivariate direct gradient analysis, **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1167-1179, 1986.

TITTEL, J.; BISSINGER, V.; GAEDKE, U.; AND KAMJUNKE, N. Inorganic Carbon Limitation and Mixotrophic Growth in Chlamydomonas from an Acidic Mining Lake. **Protist**, v. 156, p. 63-75, 2005.

TOLEDO JR.; A. P.; TALARICO, N.; CHINEZ, S. J.; AGUDO, E. G. Aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo de eutrofização em lagos e reservatórios tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITARIA E AMBIENTAL, 12., 1983, CETESB, Camboriu - Santa Catarina. **Anais...** Camburiú: Editora CETESB, 1983. p. 1-34.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 632. p.

UHLMANN, D. A Grundriss für Ingenieure und natural sciences chaftler. **Gustav Fischer Verlag Hydrobiology**, v. 73, p. 703-708, 1988.

UHLMANN, D.; HORN, W. Hydrobiology of inland waters. UTB **Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart**, v. 32, p. 23-47, 2001.

UHLMANN, W.; NIXDORF, B. Ökotechnologische Steuerung der water quality in acidic mining lakes, Part 2: Primary production and respiration. **Water, Soil**, v. 54, n. 1-2, p. 22–26, 2002.

VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. **Marc. Chem.**, v. 10, p. 109-122, 1981.

VALENZUELA, L.; CHI, A.; BEARD, S.; ORELL, A.; GUILIANI, N.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D. F.; JEREZ, C. A. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2. p. 197-211, 2006.

XU, M.; CAO, H.; XIE, P.; DENG, D.; FENG, W.; XU, J. The temporal and spatial distribution, composition and abundance of Protozoa in Chaohu Lake, China: Relationship with eutrophication. **European Journal of Protistology**, v. 41, p. 183-192, 2005.

ZARDA, B.; HAHN, D.; CHATZINOTAS, A.; SCHONHUBER, W.; NEEF, A. AMANN, I. R.; ZEYER, J.; Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. **Arch Microbiol.**, v. 168, p. 185-192, 1997.

WEISSE, T.; STADLER, P. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 4, p. 1708-1715, 2006.

WEITHOFF, G. Vertical niche separation of two consumers (Rotatoria) in an extreme habitat. **Oecologia**, v. 139, p. 594–603, 2004.

WEITHOFF, G.; MOSER, M.; KAMJUNKE, N.; GAEDKE, U.; EISSE, T. H. Lake morphometry and wind exposure may shape the plankton community structure in acidic mining lakes. **Limnologia**, v.40, p. 161-166, 2010.

WENDT-POTTHOFF, K.; FRÖMMICHEN R, H. P.; KOSCHORRECK, M. Microbial Fe(III) reduction in acidic mining lake sediments after addition of an organic substrate and lime. **Water Air Soil Pollut Focus**, v. 2, n. 3, p. 81–96, 2002.

WEST, M. J.; MCKINLEY, G. I.; AND VIALT, A.; Microbiological analysis at the Poços de Caldas natural analogue study sites. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 45, p. 439-449, 1992.

WIENER, N. **Cybernetics**. New York: Wiley, 1948. 267 p.

WILHARTITZ, I.; MACH, L. R.; TEIRA, E.; REINTHALER, T.; HERNDL, J. G.; FARNLEITNER, H. A.; Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground-and drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, n. 103, p. 871-881, 2007.

WOELFL, S.; TITTEL, J.; ZIPPEL, B.; KRINGEL, R. Occurrence of an algal mass development in an acidic (pH 2.5), iron and aluminium-rich coal mining pond. **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, v. 28, p. 305–309, 2000.

WOLLMANN, K.; DENEKE, R.; NIXDORF, B.; PACKROFF, G. Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2-4). **Hydrobiologia**, v. 433, p. 3-14, 2000.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The chemical toxicity of uranium**. Disponível em: <http://www.who.int/ionizing_radiation/pub_meet/en/Depluranium4.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2008.

YOKOM, S.; AXLER, R.; MC DONALD, M.; WICOX, D. Recovery of a mine pit lake from aquacultural phosphorus enrichment; model predictions and mechanisms. **Ecological Engineering**, v. 8, p. 195-218, 1997.

ANEXOS

ANEXO A - 1º Etapa de testes FISH "Hibridização Fluorescente In Situ"

Na primeira etapa de testes realizado, utilizando-se a técnica de biologia molecular independente de cultivo "Hibridização Fluorescente "in situ" - FISH" no Laboratório de Radioecologia (LAPOC-CNEN), foram utilizadas as sondas de oligonucleotídeos EUB338 e ARCH915 (Fabricante: Prodimol Biotecnologia, Belo Horizonte, M.G.), marcadas com o corante fluorescente Rodamina (Rhodamine Red-X, Filter Set 40 - Zeiss, comprimento de onda: excitação 551 nm e emissão 573 nm), (Tabela 1).

ANEXO A: Tabela 1 - Sondas de oligonucleotídeos.

Sondas	Corante fluorescente	Grupo microbiano alvo e posição no RNAr	Seqüência (5' – 3')	Posição do sítio de marcação	Referências
EUB338	Rodamina	Domínio <i>Bactéria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S(355-338)	Amann et al. (1992)
ARCH915	Rodamina	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCGCAATTCCT	16S(915-935)	Stahl e Amann (1991)

Foram coletadas amostras de água procedentes do LMA Cava da Mina (ponto CM) e nos reservatórios das Antas (pontos: Cab, P41, P14S, P14M e P14F) e Bortolan (pontos: RB-S, RB-M e RB-F), bem como amostras coletadas de outros ambientes aquáticos (Ex: três pequenos lagos decorativos localizados no LAPOC/CNEN); em culturas puras de *Escherichia coli* (ATCC25992 e ATCC11299) e de bactérias isoladas de amostras de água do ponto CM (bactérias heterotróficas).

A metodologia foi realizada de acordo com protocolos descritos por Cotrell e Kirchman (2003), Kirchman et al. (2005), Montenegro, Araujo e Vazoller (2001), Amann, Krumholz e Stahl (1990), Amann (1995), Amann, Ludwig e Schleifer (1995), Amann et al. (1996), Glöckner, Fuchs e Amann (1999) e, Amann, Fuchs e Behrens (2001).

Tendo como base os protocolos acima, foram realizados testes com as amostras de água citadas (Tabela 2). Foram incluídas algumas modificações sugeridas por outros autores, como: mudanças nas concentrações dos reagentes formamida e NaCl, no tempo e na temperatura de hibridização em estufa, no tempo da amostra em contato com o tampão de lavagem, na temperatura do tampão de lavagem em estufa, filtragem de maiores volumes

de amostra visando maior concentração de células na membrana de polycarbonato de 0,22 µm de poro e 25 mm de diâmetro (ABE, 2003, BOUVIER; GIORGIO 2003, FERRARI, 2002, HAHN et al., 2003, JURGENS et al., 1999, MANZ et al., 1992, NICOMRAT et al., 2006, PERNTHALER et al., 1998 e SCHRENK et al., 1998) como mostra a Tabela 3.

ANEXO A: Tabela 2 - Número de testes realizados e resultados positivos com as sondas EUB338 e ARCH915 marcadas com o corante fluorescente Rodamina.

Amostras	Nº de Testes*	Resultados Positivos	Nº de Testes*	Resultados Positivos
			EUB338	ARCH915
Cava da Mina (CM)	30	0	20	0
Reservatório das Antas (RA)	17	1	17	0
Reservatório Bortolan (RB)	20	2	11	0
Lagos Cnen	20	5	9	0
<i>Escherichia coli</i>	5	2	5	0
Bactérias Heterotróficas (ponto CM)	X	X	5	0

* Valores referentes aos testes para implantação de metodologia FISH, utilizando as sondas EUB338 e ARCH915.

x = não avaliado

ANEXO A: Tabela 3 - 1º ETAPA DE TESTES: Condições de hibridização e lavagem para as sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante Rodamina.

Local de Amostragem	Sondas	Condição de Hibridização	Concentração de FA	Condição de Lavagem	Concentração de NaCl	Referência
RA, RB e CM-UTM/INB Jan - jul/2009	ARCH915	45 °C / 2 h	20%	48 °C / 20 min	225 mM	Hahn et al., 1992; Araújo, 2001
	EUB338	46 °C / 1,5 h	20%	48 °C / 15 min	225 mM	Abe, 1998; Araújo, 2001; Pernthaler et al., 1998
	ARCH915 EUB338	46 °C / 2,5 h	20%	48 °C / 15 min	225 mM	Amann et al., 1990; Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992; Nicomrat et al., 2006
	ARCH915 EUB338	46 °C / 2,5 h	30%	48 °C / 15 min	225 mM	Amann, 1995; Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992
RA, RB e CM-UTM/INB 20/05/2010	ARCH915 EUB338	46 °C / 2,5 h	20%	48 °C / 15 min	225 mM	Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992
	ARCH915 EUB338	46 °C / 2,5 h	30%	48 °C / 15 min	225 mM	Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992
	ARCH915 EUB338	42 °C / 18 h	30%	48 °C / 15 min	225 mM	Amann et al., 1990; Amann, 1995
Lagos de peixes CNEN 12/05/2010	ARCH915 EUB338	46 °C / 2,5 h	20%	48 °C / 15 min	225 mM	Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992
Lagos de peixes CNEN 02/06/2010	EUB338	42 °C / 18 h	30%	48 °C / 15 min	225 mM	Amann et al., 1990; Amann, 1995
	EUB338	46 °C / 2,5 h	30%	48 °C / 15 min	225 mM	Schrenk et al., 1998; Manz et al., 1992

Após a realização das análises descritas acima, foram procedidos testes de funcionalidade das sondas EUB338 e ARCH915.

As sondas foram analisadas sob espectrofotometria de luz visível (Varian Cary 50Conc UV-Visível Spectrophotometer) a fim de detectar dois picos, um em 260 nm confirmando a presença de DNA e outro, a aproximadamente 600 nm, para confirmar a existência do

fluorocromo Rodamina Red-X. Foram preparadas soluções contendo 2 μL de sonda (concentração de 500 ng) diluída em 1,5 mL de água MilliQ estéril, colocada em cubeta vertical e efetuadas as leituras nos comprimentos de onda de 100 nm a 700 nm para a verificação do pico de absorção que representaria a presença da sequência de oligonucleotídeos de DNA e para a verificação de pico de absorção que representaria a presença do marcador fluorescente Rodamina Red-X (551 - 573 nm).

Foi verificada a ausência do pico para o corante fluorescente (Figura 1), sendo um dos fatores limitantes da técnica.

ANEXO A: Figura 1 - Funcionalidade das sondas EUB338 e ARCH915, marcadas com o corante fluorescente Rodamina Red-X.

ANEXO B - Composição Taxonômica e Ocorrência dos Gêneros de Protozoários Planctônicos registrados nos reservatório das Antas, reservatório Bortolan e no ponto CM

Filo	Ordem	Gêneros	Ocorrência		
			CM	RA	RB
Ciliophora	1. Sessilida	<i>Campanella umbellaria</i> LINNAEUS, 1758, GOLDFUSS, 1820	X	X	X
	2. Prorodontida	<i>Urotricha</i> sp. CLAPERÈDE & LACHMANN, 1859	X	X	X
	3. Sessilida	<i>Vorticella</i> sp. LINNAEUS, 1767		X	X
	4. Haptorida	<i>Enchelys</i> sp. MULLER, 1773	X	X	X
	5. Haptorida	<i>Paradileptus elephantinus</i> SVEC, 1897, KHAL, 1931		X	X
	6. Strombidiida	<i>Strombidium</i> sp. FAURÉ-FREMIET, 1970		X	X
	7. Choreotrichida	<i>Strobilidium</i> sp. CHEWIAKOFF, 1893			X
	8. Cyclotrichiida	<i>Askenásia volvox</i> EICHWALD, 1852, KAHL, 1930		X	X
	9. Cyclotrichiida	<i>Mesodinium</i> sp. STEIN, 1863		X	
	10. Haptorida	<i>Monodinium balbiani</i> FABRE-DOMERGUE, 1888		X	X
	11. Prorodontida	<i>Holophrya</i> sp. EHRENBURG, 1831	X	X	X
	12. Tintinnida	<i>Codonella cratera</i> LEIDY, 1877	X	X	X
	13. Tintinnida	<i>Tintinidium</i> sp. KENT, 1881		X	X
	14. Peniculida	<i>Stokésia vernalis</i> WENRICH, 1929			X
	15. Colpodida	<i>Mycterothrix erlangeri</i> LAUTERBORN, 1898	X		
	16. Peniculida	<i>Paramecium</i> sp. MÜLLER, 1773		X	
	17. Prorodontida	<i>Lagynus</i> sp. QUENNERSTEDT, 1867	X	X	
Amoebozoa	18. Arcellinida	<i>Arcella</i> sp. EHRENBURG, 1832			X
	19. Arcellinida	* <i>Tecameba</i> (<i>Diffugia</i> ou <i>Netzelia</i>) LECLERC, 1815/ OGDEN, 1979	X		
	20. Arcellinida	<i>Ameba</i> sp.25	X		
	21. Dermamoebida	* <i>Tecamba</i> sp. CAVALIER-SMITH, 2004	X		
	22. Dermamoebida	* <i>Tecameba</i> sp.33 CAVALIER-SMITH, 2004	X		
Ochrophyta	23. Actinophryida	<i>Actinosphaerum</i> sp. STEIN, 1857	X		
Heliozoa	24. Centrohelida	<i>Sphaerastrum</i> sp. POCHE, 1913	X		

* protozoários sem a confirmação da identificação

ANEXO C - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORAMENTO

- Trabalhos submetidos e aceitos para Congressos em 2013

1. **Ronqui**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana; Borba Júnior, Palvo Joubert. "Microbial Trophic network of Pit Mine Uranium Osamu Utsumi and reservoirs of Hydrographic Basin Antas River receiving radioactive effluents" In. International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2013, Recife - Pernambuco, Brasil.

- Trabalhos Completos Apresentados e Publicados em Anais de Congressos

2. **Ronqui**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana; Borba Júnior, Palvo Joubert. Implantação do FISH em ambientes aquáticos subtropicais oligotróficos e acidificados. In. XV Congresso Latino-americano de Genética, 2012, Rosário - Argentina.

3. **Ronqui**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana; SELEGHIM, Mirna Helena Regali; Macacini, J. F.; Roque, C. V.; Rodgher, Suzelei; Nascimento, Marcos Roberto Lopes; Mourão, G. B. Microbial communities in an oligotrophic reservoir (Antas Reservoir, MG, Brazil) influenced by high levels of ionizing radiation.. In: International Conference on RADIOECOLOGY & ENVIRONMENTAL RADIOACTIVITY, 2011, Hamilton. ICRER - 2011 Environment & Nuclear Renaissance, 2011.

4. Ferrari, C. R.; Azevedo, Heliana; Wisniewski, M. J. dos S.; Roque, C. V.; RONQUI, Leilane Barbosa; CAMPOS, M. B.; Bruschi, A. L.; Nascimento, Marcos Roberto Lopes; Rodgher, Suzelei. ZOOPLANKTON COMMUNITY OCCURRENCE IN AN AREA INFLUENCED BY URANIUM MINE, CALDAS, MG, BRAZIL. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2011, Belo Horizonte. NUCLEAR ENERGY NEW JOBS FOR A BETTER LIFE, 2011.

5. Roque, C. V.; Dellamano-Oliveira, M. J.; Azevedo, Heliana; Bruschi, A. L.; FERRARI, C. R.; RONQUI, Leilane Barbosa; CAMPOS, M. B.; Nascimento, Marcos Roberto Lopes; Rodgher, Suzelei. EFFECT EVALUATION OF URANIUM MINING EFFLUENTS ON THE DENSITY AND COMPOSITION OF THE PHYTOPLANKTON COMMUNITY. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2011, Belo Horizonte. NUCLEAR ENERGY NEW JOBS FOR A BETTER LIFE, 2011.

6. Borba Júnior, P. J.; Azevedo, Heliana; RONQUI, Leilane Barbosa. DEPLOYMENT OF INDEPENDENT METHOD OF CULTURE TO DETECT BACTERIA AND ARCHAEA DOMAINS IN DRAINAGE BASIN UNDER THE INFLUENCE OF URANIUM MINING ORE TREATMENT UNIT,

CALDAS/MG.. In: International Nuclear Atlantic Conference, 2011, Belo Horizonte. NUCLEAR ENERGY NEW JOBS FOR A BETTER LIFE, 2011.

- Apresentação de Trabalho

7. **RONQUI**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana; SELEGHIM, Mirna Helena Regali; FERRARI, C. R.; Rodgher, Suzelei; Macacini, J. F.; Roque, C. V.; Mourão, G. B.; Nascimento, Marcos Roberto Lopes. Microbial communities in an oligotrophic reservoir influenced by high levels of ionizing radiation. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. Borba Júnior, P. J.; **RONQUI**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana. Testes preliminares visando à implantação da metodologia do FISH (Fluorescent Hybridization "in situ") para detecção dos domínios Bacteria e Archaea, em Sub-Bacia Hidrográfica sob influência de mineração de urânio. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
9. Borba Júnior, P. J.; **RONQUI**, Leilane Barbosa; Azevedo, Heliana. Testes preliminares para implantação pioneira da técnica independente de cultivo FISH em ambientes aquáticos subtropicais oligotróficos (reservatórios das Antas e Bortolan) e ácido (Cava da Mina Osamu Utsumi) no Planalto de Poços de Caldas (MG). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. Ferrari, C. R.; Azevedo, Heliana; Wisniewski, M. J. dos S.; Bruschi, A. L.; Roque, C. V.; **RONQUI**, Leilane Barbosa; CAMPOS, M. B.; Nascimento, Marcos Roberto Lopes; Rodgher, Suzelei. Riqueza e densidade de espécies da Comunidade Zooplanctônica em áreas sob influência de mina de urânio e drenagem ácida.. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. Roque, C. V.; Dellamano-Oliveira, M. J.; Azevedo, Heliana; FERRARI, C. R.; Bruschi, A. L.; **RONQUI**, Leilane Barbosa; CAMPOS, M. B.; Nascimento, Marcos Roberto Lopes; Rodgher, Suzelei. Variação temporal na densidade da Comunidade Fitoplanctônica em reservatório sob influência de Mina de Urânio: Unidade de Tratamento de Minérios, Caldas, MG, Brasil. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. Azevedo, Heliana; Rodgher, Suzelei; FERRARI, C. R.; Roque, C. V.; CAMPOS, M. B.; **RONQUI**, Leilane Barbosa; Nascimento, Marcos Roberto Lopes. Avaliação da Qualidade química

- Artigos Publicados

13. Rodgher, Suzelei; Azevedo, Heliana; Ferrari, Carla Rolim; Roque, Cláudio Vítor; **RONQUI, Leilane Barbosa**; Campos, Michelle Burato; Nascimento, Marcos Roberto Lopes. Evaluation of surface water quality in aquatic bodies under the influence of uranium mining (MG, Brazil). *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, n. 3, p. 2395-406, 2013.
14. **Ronqui**, Leilane Barbosa; Azevedo, H.; Selegim, M.H.R.; Ferrari, C.R.; Rodgher, S.; Macacini, J.F.; Roque, C.V.; Mourão, G.B.; Nascimento, M.R.L. Microbial communities in an oligotrophic reservoir influenced by high levels of ionizing radiation. *Radioprotection* (Paris. 1966), v. 46, p. S331-S337, 2011.
15. **Ronqui, L.B.** ; Azevedo, H. ; Nascimento, M.R.L. ; Macacini, J.F. ; Roque, C.V. ; Selegim, M.H.R.. Radioecological evaluation (spatial and temporal variation) of the planktonic microorganisms in the Antas Reservoir, Caldas, Minas Gerais, Brazil. *Atoms for Peace: an International Journal*, v. 3, p. 33-49, 2010.

- Colaboração na orientação de Bolsistas de Iniciação Científica

16. Palvo Joubert Borba Júnior. **Utilização de Técnica Molecular Independente de Cultivo, Técnica Nuclear e Técnicas Convencionais para o estudo de efeitos de efluentes de Mina de Urânio sobre rede trófica microbiana na Bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas e na Cava da Mina Osamu Utsumi..** Período: 2010/2012 - Comissão Nacional de Energia Nuclear - Laboratório de Poços de Caldas (MG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.
17. Larissa Oliveira de Carvalho. **Caracterização Sazonal e Espacial da Comunidade Protozooplanctônica e Bacterioplanctônica no Reservatório das Antas e na Mina de Urânio Osamu Utsumi Caldas, MG: utilização de Técnica Nuclear e Técnicas Convencionais..** Período: 2009/2010. Iniciação Científica - Comissão Nacional de Energia Nuclear - Laboratório de Poços de Caldas (MG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

- Treinamentos para implantação da Metodologia FISH

1. Técnica de Hibridização Fluorescente "In Situ" em amostras de água contendo bactérias nitrificantes. **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Universidade Federal de Minas Gerais. Profa. Dra. Juliana Calábria de Araujo. (Carga horária: 30h).
2. Técnicas de Hibridização Fluorescente "In Situ" em amostras de lodo ativado. **Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Microbiologia Ambiental**. Universidade de São Paulo. Profa. Dra. Vivian Helana Pellizari. (Carga horária: 16h).

- Prêmio

18. **1º Lugar Trabalho de Pesquisa Científica / Poster:** INAC 2011 AWARD for Undergraduate Research Work in Nuclear Science, International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2011. **Deployment of Independent Method of Culture to detect Bacteria and Archaea domains in drainage basin under the influence of Uranium Mining – Ore Treatment Unit, Caldas/MG.**
Autores: Palvo J. Borba Junior, **Leilane Barbosa Ronqui** & Heliana de Azevedo.

- Aprovação em Programa de Doutorado Sanduiche com estágio no exterior pela União Européia

Erasmus Mundus External Cooperation Window (EMECW)

Código do Projeto: 2009-1670/001-001-ECW – Consórcio EMUNDUS 15

Universidade Hospedeira: Universidade de Vigo - Espanha

Orientador: Prof. Dr. Rafael Barrionuevo Gímenez

Período: 23 de agosto de 2010 à 30 de junho de 2011.

Atividade Desenvolvida: "Integração de dados geológicos e de Sistema de Informação Geográfica (SIG) como Ferramenta de bioprospecção visando o gerenciamento sustentável dos Recursos Hídricos da região do planalto de Poços de Caldas, MG."

Área: Engenharia de Minas

Sub-área: Tecnologia do Meio Ambiente

Disciplinas cursadas: Seminários em Tecnología do Meio Ambiente (pós-graduação), Gestão Ambiental (graduação), Geologia Geoambiental (graduação) e Engenharia Geoambiental (graduação).

- Bolsas de Pesquisa

19. - set/2008 - jun/2010: Fundação de Amparo a Pesquisado do Estado de Minas Gérias, Modalidade DTI-III.
20. - set/2010 - mai/2011: UNIÃO EUROPEIA, Processo 2009-1670/001-001-ECW – Consórcio EMUNDUS 15. Nível doutorado.
21. - nov/2011 - jun/2013: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, Modalidade: Doutorado.

ANEXO D - Descrição e discussão de cada etapa testada e/ou adicionada na metodologia do FISH

Dispersão celular

Hoshino et al. (2008) que quantificaram quantas moléculas marcadas de RNAr 16S eram necessárias para a detecção de micro-organismos pela Hibridização Fluorescente "in situ" e pela técnica de Card-FISH, em um mix de culturas bacterianas e em amostras de lodo ativado, utilizaram a etapa de sonicação em suas amostras para a dispersão das células, com o objetivo de melhorar a intensidade do sinal de fluorescência na hibridização, quando observadas em microscopia de epifluorescência, obtendo resultados positivos.

Neste estudo, realizado nos reservatórios das Antas e Bortolan, também foram realizados testes sobre a questão da desaglomeração das células bacterianas das amostras. Foi utilizada a sonicação de volumes das amostras de ambos os reservatórios em banho de ultrassom para que ocorresse a dispersão das células e melhor distribuição das mesmas sobre os filtros de membrana de polycarbonato. Zarda et al. (1997) também utilizaram a sonicação como método para a dispersão das células bacterianas oriundas de amostras de solo, para a análise de tais comunidades com a técnica independente de cultivo FISH.

Além da etapa de sonicação, também foi adicionado o detergente TWEEN90 em alguns testes para a implantação e padronização do FISH, em amostras de água dos reservatórios das Antas e Bortolan e no LMA cava da mina visando aperfeiçoar a dispersão das células antes de sonicá-las. Fazi et al. (2007) estudaram a eficiência de duas técnicas de hibridização (FISH convencional e Card-FISH) para a identificação de células bacterianas em sedimentos de rios temporários na região do Mediterrâneo. Após a etapa de fixação das células com formaldeído, utilizaram o detergente TWEEN20 e o processo de sonicação para a dispersão das células, concordando com o realizado no presente estudo.

Limpeza da amostra

Devido à detecção de baixo número de células retidas nas membranas de polycarbonato quando realizada a filtração de volumes de amostra normalmente sugeridos nos protocolos de FISH (1 a 10 mL), neste estudo, foi testado filtrar-se maiores volumes de amostras de água, utilizando-se filtros de membrana de polycarbonato de 0,22 µm de poro e 47 mm de diâmetro a fim de obter-se maior número de células, bem como maior conteúdo ribossomal.

O maior volume de amostra filtrada foi eficiente, porém trouxe maior conteúdo de partículas interferentes e células sobrepostas na membrana de 25 mm de diâmetro.

Sendo assim, foi introduzida a etapa de pré-limpeza da amostra, utilizando-se filtros de membrana de polycarbonato de 10µm de poro para que detritos orgânicos e partículas maiores fossem eliminados da amostra e organismos maiores, como protozoários e zooplâncton. Após a pré-limpeza, a filtração da amostra foi procedida em filtros de membrana de polycarbonato de 0,22 µm de poro, porém com membranas de 47 mm de diâmetro, em substituição às de 25 mm de diâmetro, para que ocorresse a retenção e melhor distribuição das células bacterianas sobre a superfície da membrana.

A etapa de pré-limpeza da amostra de água, utilizando-se filtros de membrana de poros maiores, auxilia na redução do "background" de fluorescência da amostra sobre a membrana e sob o microscópio de epifluorescência, onde interferentes como partículas laranja ou amarela fluorescem, sendo caracterizados como artefatos de origem orgânica presentes nas amostras de ambientes naturais (MOSTAJIR; DOLAN; RASSOULZADEGAN, 1995).

Alfreider et al. (1996) estudaram um lago oligotrófico, ou seja, um ambiente que provavelmente apresentaria menor número de células bacterianas, devido à limitação de nutrientes interferindo negativamente no conteúdo ribossomal celular e na detecção do FISH. Também utilizaram a etapa de pré-filtragem das amostras de água em membranas de filtro de 20 µm, a fim de reduzir a quantidade de clorofila e de detritos concentrar maior número de células e consequentemente, maior conteúdo ribossomal.

Além disso, testou-se o uso do meio mínimo líquido Mackintosh, descrito por González-Toril et al. (2003). Os autores estudaram a ecologia microbiana de um meio ambiente ácido extremo, o rio Tinto, que é um exemplo de um ecossistema ácido extremo, com valores de pH entre 1,5 e 3,1 e elevadas concentrações de elementos químicos em solução (ferro, cobre e zinco). Segundo os autores, o uso do meio líquido Mackintosh seria uma alternativa para a lavagem da amostra, frente às elevadas concentrações de elementos químicos e metais, e para a retirada de resíduos do formaldeído utilizado na fixação das amostras de ambientes ricos em metais dissolvidos. Neste estudo, foi testada a pré-lavagem das amostras provenientes do ponto CM com o meio Macintosh, a fim de aperfeiçoar a retirada de tais elementos químicos. Entretanto, não foi verificada efetiva diferença entre as amostras lavadas e não lavadas com o meio líquido Mackintosh.

Cápsulas bacterianas

As amostras de água procedentes, principalmente, da CM apresentaram, frequentemente, a presença de uma estrutura envolvendo as células bacterianas. Em algumas amostras, obtiveram-se resultados onde células individuais apresentaram tal envoltório e em outras tais células estavam agrupadas, formando colônias unidas por essa estrutura e, após testes, concluiu-se que se tratava de cápsulas de polissacarídeos.

A cápsula bacteriana é caracterizada por uma camada rígida com fronteira definida formada por uma série de polímeros orgânicos que se depositam no exterior da sua parede celular (MADIGAN et al., 2012). Geralmente, contém glicoproteínas e um grande número de polissacarídeos, incluindo poliálcoois e aminoaçúcares. A cápsula permite às bactérias terem uma camada protetora resistente à fagocitose. Também é utilizada como depósito de alimentos e como lugar de eliminação de substâncias. Protege da desidratação, já que contém uma grande quantidade de água disponível em condições adversas. Evita, também, o ataque dos bacteriófagos e permite a adesão da bactéria às células do hospedeiro (MADIGAN et al., 2012).

Provavelmente, a formação de tais estruturas extracelulares (cápsulas) verificadas nas células bacterianas procedentes das amostras da cava da mina esteja associadas às condições físicas e químicas deste ambiente, devido às elevadas concentrações de elementos químicos potencialmente tóxicos às células, elevada dureza da água associada ao hidróxido de cálcio utilizado no tratamento do efluente e baixos valores de pH, antes do tratamento químico da água.

Konhauser et al. (1994) estudaram a precipitação mineral realizada em biofilmes bacterianos epilíticos, no Rio Speed (Ontário, Canadá), através de análise de EDS (espectroscopia de raio-X por dispersão de energia) e verificaram que os polímeros capsulares, existentes ao redor das células bacterianas, sequestravam significativas quantidades de ferro em solução, juntamente com significativas quantidades de Ca, K, Si e Mn. O acúmulo de metais traço tal como Mn, no qual foi encontrado em concentrações extremamente baixas em solução no estudo de Konhauser et al. (1994), foi indicado que a comunidade bacteriana epilítica dos biofilmes eram potentes sequestradores de íons metálicos dissolvidos. Este comportamento correlaciona-se bem com os resultados anteriores, descritos por Ferris et al. (1989), nos quais mostraram que a transição dos metais procedentes da drenagem ácida de mina que escoava nas águas dos resíduos das rochas e

das pilhas de rejeitos até o Lago Moose (Canadá) foram eficientemente adsorvidos por biofilmes presentes na drenagem ácida de mina. Ainda, segundo os autores, micro-colônias de bactérias encapsuladas eram comumente encontradas no biofilme. Tal material extracelular circundante das células exibia uma estrutura fibrosa e, muitas vezes, continha abundantes concentrações de precipitados ricos em ferro.

Uma vez que a CM é um ambiente rico em ferro dentre outros elementos, pode-se inferir que as células bacterianas presentes neste lago também estariam beneficiando-se dos elementos químicos ali presentes como o ferro, daí um dos fatores que explicaria a massiva presença de cápsulas nas células bacterianas da CM.

Segundo Branda et al. (2005) realizaram uma revisão sobre os recentes avanços no entendimento sobre as matrizes extracelulares (ou seja, cápsulas) produzidas pelas comunidades bacterianas e o seu papel em biofilmes biológicos dada a sua ubiquidade e importância no mundo microbiano, segundo os autores, a formação de biofilmes oferecem inúmeros benefícios aos seus membros, como a proteção frente a agressões vindas do meio ambiente. Inicialmente, a formação de biofilmes era caracterizada pela interação das células bacterianas com uma superfície, bem como a interface com outros organismos ou partículas. Após mais estudos, soube-se que a formação dos biofilmes e sua constituição diferiam entre as comunidades bacterianas e os ambientes por elas habitados, sendo os polissacarídeos extracelulares e as proteínas os principais componentes destas matrizes. No entanto, existem outros componentes conhecidos da matriz extracelular. Segundo os autores, foi indicado que o DNA extracelular desempenha um papel importante na criação da estrutura do biofilme e que as células bacterianas mortas, observadas em alguns biofilmes, poderiam ser consideradas como parte da matriz extracelular. Segundo os autores, estudos sobre o papel desempenhado pelo DNA das células mortas em biofilmes representam excitantes novos rumos para estudos futuros sobre as matrizes de biofilmes.

Quando avaliada, utilizando-se a técnica FISH, tanto as células bacterianas quanto suas cápsulas foram coradas no processo de hibridização pelo corante fluorescente Cy3 neste estudo. Provavelmente, a presença de partículas de DNA das células também fizesse parte da constituição das cápsulas presentes nas células bacterianas da cava da mina, explicando sua coloração com a sonda devido à presença de DNA, bem como com o corante DAPI.

Baldi et al. (2009) que realizaram a caracterização de sítios de ligação de ferro e a produção de polissacarídeos por cepas isoladas de *Klebsiella oxytoca* procedentes de

amostras de drenagem ácida de mina, verificaram que, sob condições de anaerobiose, as cepas de *Klebsiella* produziam Fe(III)-EPS (exopolissacarídeos) como uma estratégia das células para sobreviver em drenagens de mina e em outras condições ácidas. Fortin e Ferris (1998) estudaram o processo de precipitação de ferro, sílica e sulfato sobre a superfície das células bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas aeruginosa*) sob diferentes concentrações de Fe(III) e em pH constante (4,0). Segundo os autores, das três cepas estudadas, *B. licheniformis* pareceu ter a melhor influência sobre a composição química dos precipitados, especialmente na presença de sílica, uma vez que *B. licheniformis* (bactéria gram-positiva com uma ampla cápsula) favoreceu a precipitação de óxidos férricos hidratados contendo menos sílica isto porque a sílica, mais do que os óxidos de ferro, foi a substância preferencialmente utilizada por esta bactéria para a produção de seus polímeros extracelulares, ou seja, para a formação de sua cápsula. Valenzuela et al. (2006) em uma revisão sobre pesquisas desenvolvidas, utilizando comunidades de micro-organismos de drenagem ácida de mina (principalmente *Acidithiobacillus ferrooxidans*) para o estudo de biomineração, relataram, dentre outras informações, que a maioria das bactérias lixiviantes crescem anexadas à superfície de substratos sólidos, tais como enxofre elementar e sulfetos metálicos. Essa ligação é mediada, predominantemente, por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ao redor das células e são ajustadas de acordo com o substrato disponível para o seu crescimento.

Se pode observar, o processo de produção de substâncias extracelulares e a formação de estruturas capsulares ao redor de células bacterianas, vivendo em ambientes ricos em metais ou expostas a tais condições em ensaios laboratoriais, são conhecidos, seja como uma forma de proteção contra as condições adversas do meio, seja como fonte de obtenção e armazenamento de nutrientes ou pela questão de manutenção das células anexadas aos substratos. Sendo assim, a presença de estruturas capsulares nas bactérias procedentes do LMA Cava da Mina Osamu Utsumi é totalmente condizente com os relatos existentes na literatura, bem como com as condições ambientais presentes na cava da mina.

Permeabilização celular

Visando aperfeiçoar a permeabilidade das células bacterianas, neste estudo, para a entrada da sequência de oligonucleotídeos das sondas, a etapa de permeabilização celular com o uso de lisozima foi adicionada à metodologia. A lisozima hidrolisa as ligações

glicosídicas da camada de peptídeoglicano da parede celular das bactérias dos dois gram-tipos é provável que a lisozima desintegre parcialmente as multicamadas de mureína das células gram-positivas (ex: actinobactérias) (SEKAR et al., 2003).

Em sistemas aquáticos meso e oligotróficos, somente uma fração reduzida do total das contagens realizadas com o corante fluorescente DAPI têm sido detectadas com sondas fluorescentes utilizadas para o FISH, necessitando a formulação de procedimentos padrões para tais ambientes (GLOCKNER et al., 1996). Este foi o registrado nos reservatórios avaliados, neste estudo, e, na maior parte do tempo, foram caracterizados como meso e oligotróficos.

Além de precedimentos específicos, foi argumentado que o baixo conteúdo de ribossomos nas células bacterianas e a baixa permeabilidade da parede celular seriam alguns dos fatores que poderiam limitar a sensibilidade da detecção pelas sondas utilizadas no FISH em ambientes oligotróficos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Tais fatores demonstraram ser sérios limitantes para o método de hibridização fluorescente "in situ" com sondas mono-marcadas (ALFREIDER et al., 1996).

Nicomrat, Dick e Tuovinen (2006), já alertavam, em seu estudo, que a contagem por FISH pode resultar em baixos valores de células, devido ao baixo conteúdo de DNAr em estado de dormência e/ou inatividade dos micro-organismos e que a espessura da parede celular bacteriana oferecia resistência à habilidade da sonda de penetrar através da parede. Assim, algumas células no meio ambiente poderiam fornecer um fraco ou um sinal nulo na análise do FISH, pois elas estariam em dormência ou por possuírem um conteúdo de RNAr muito baixo.

Em seus estudos, Fazi et al. (2007); Sekar et al. (2003) utilizaram a lisozima como agente permeabilizante. Fazi et al. (2007) estudaram a eficiência de duas técnicas de hibridização (FISH convencional e Card-FISH) para a identificação de células bacterianas em sedimentos de rios temporários. O protocolo de fixação e permeabilização das células foi otimizado para a melhor visualização de Bactérias dos sedimentos secos com particular foco na detecção de *Actinobacteria* spp. gram-positivas. Sendo assim, os autores fizeram uso da etapa de permeabilização celular com lisozima, verificando que a melhor metodologia para detectar Actinobactérias, tanto por FISH quanto por Card-FISH, seria incluindo o pré-tratamento com lisozima fixada com formaldeído. Segundo os autores, esta combinação pareceu ser o

melhor tratamento para detecção das bactérias de interesse e que o uso da lisozima foi eficiente para aumentar a permeabilidade das células e, assim, os sinais de hibridização.

Sekar et al. (2003) otimizaram o protocolo de hibridização fluorescente "*in situ*" para a quantificação de *Actinobacterias* (gram-positiva) de diferentes lagos de água doce. Os autores relataram que o uso da lisozima, juntamente com a acromopeptidase como permeabilizante, não só aumentou a abundância relativa das células hibridizadas, mas também a intensidade do sinal de fluorescência das células bacterianas hibridizadas. Os resultados do presente estudo também mostraram que a etapa de permeabilização celular com lisozima permitiu o aumento dos sinais de hibridização das células.

ANEXO E - Sugestões para estudos futuros

- ❖ Continuar os estudos de taxonomia de protozoários tanto na Cava da Mina quanto nos reservatórios expandindo os estudos para as comunidades bentônicas e do sedimentos;
- ❖ Realizar coletas do sedimento dos reservatórios e da Cava da Minas para possível detecção de maiores concentrações de elementos químicos estáveis e radionuclídeos depositados no fundo;
- ❖ Desenvolver um novo Índice de Estado Trófico para ambientes ácidos localizados em regiões tropicais como é o caso do lago de mina ácido da Cava da Minas Osamu Utsumi;
- ❖ Continuar os testes utilizando-se a técnica FISH com sondas mais específicas a nível de família e gênero de bactérias da Cava da Minas e dos reservatórios;
- ❖ Isolar amostras da Cava da Mina em meios de cultivo e ambiente apropriado para extremófilos e realizar o posterior sequenciamento genético utilizando técnicas como PCR e DGGE.