UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

FELLIPE HENRIQUE MARTINS MOUTINHO

Fixação de nitrogênio pelo fitoplâncton de água doce: experimentos *in situ* e *in vitro* para análise da influência de fatores ambientais

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos (SP) 2021

FELLIPE HENRIQUE MARTINS MOUTINHO

Fixação de nitrogênio pelo fitoplâncton de água doce: experimentos *in situ* e *in vitro* para análise da influência de fatores ambientais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M934f	Moutinho, Fellipe Henrique Martins Fixação de nitrogênio pelo fitoplâncton de água doce: experimentos in situ e in vitro para análise da influência de fatores ambientais / Fellipe Henrique Martins Moutinho; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha. São Carlos, 2021.
	Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.
	 Fixação biológica de N2. 2. Cianobactérias. Dolichospermum flosaquae. 4. Ciclagem de nutrientes. Reservatórios subtropicais. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel FELLIPE HENRIQUE MARTINS MOUTINHO.

Título da tese: "Fixação de nitrogênio pelo fitoplâncton de água doce: experimentos in situ e in vitro para análise da influência de fatores ambientais".

Data da defesa: 24/09/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

APPONADO

MONADO

APROVINDO

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

Profa. Dra. **Inessa Lacativa Bagatini** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Prof. Dr. Watson Arantes Gama Júnior (Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE)

Profa. Dra. Viviane Moschini Carlos <u>KPRONADO</u> (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Sorocaba)

Profa. Dra. Christina Wyss Castelo Branco (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento: Prof. Dr. Luiz Antonio Daniel

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Aos meus pais, familiares e amigos pelo apoio, carinho e por sempre me estimularem para o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Diante de tantos acontecimentos no mundo moderno, a gratidão deve ser um sentimento presente no ser humano. Isso porque todas as nossas conquistas e evoluções pessoais e profissionais nunca são resultados apenas de um esforço individual, mas sim de uma ação coletiva entre o desempenho do indivíduo e a colaboração de todos aqueles a sua volta. Colaborações estas que vão além de objetos materiais ou ações pontuais que permitiram o desenvolvimento deste trabalho. Também são aquelas que auxiliam na paz de espírito, permitindo assim que a pessoa usufrua de sua potencialidade. Por isso, o agradecimento aos colaboradores é fundamental, que independente do grau, é um singelo ato de reconhecimento.

Nesse sentido, agradeço aos meus familiares, minha mãe Edilaine Martins e meu pai Álvaro Moutinho, por todo o apoio que recebi durante esses quatro anos, mesmo que nos momentos mais difíceis de nossas vidas até então, nos quais superamos a distância e diversos problemas pessoais. Também agradeço à minha tia-avó Ana Maria Filsner, por proporcionar condições para eu me instalar em São Carlos e também para conhecer o exterior.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha, por toda a orientação, por acreditar no meu potencial e pela confiança, que resultou em diversos projetos e ações que desenvolvemos em conjunto nesses quatro anos. Na verdade, aqui não caberia apenas um simples agradecimento. O Prof. Davi é uma inspiração para todos aqueles que o conhecem. Então, o agradecimento também se estende pelo fato dele ter contribuído com a minha formação pessoal e profissional, desde conselhos até oportunidades que recebi deste ilustre ser humano. Agradeço por ter me incentivado a buscar uma experiência no exterior e por todo o suporte durante esse período. Também pela paciência nesse último ano conturbado, que realmente não foi fácil, mas conseguimos superar.

Ao Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira, do Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela parceria, apoio e ensinamentos referentes às análises de quantificação do isótopo ¹⁵N.

Aos alunos e pesquisadores que compõem a equipe do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE), que me auxiliaram em diversas etapas dos experimentos de campo, de laboratório, e que proporcionaram um ambiente de trabalho muito saudável. Meus sinceros agradecimentos aos colegas de trabalho Aline Cossolin, Amanda Koshigoe, Carolina Andrade, Carolina Barbosa, Cristiane Farias, Flávia Bottino, Henrique Sonobe, Ingrid Hinobu, Janaína Fagundes, Karen Zambrano, Lucas Maroubo, Nícolas

Finkler, Murilo Ferreira, Paula Romero, Raphaella Rodrigues, Vinicius Diniz e Wesley Saltarelli. Desejo muito sucesso na carreira de cada um de vocês! Agradeço à especialista Dr.^a Adriana Miwa, por todo o suporte técnico dado no laboratório BIOTACE e os bons momentos de descontração.

Aos funcionários e professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento (SHS), por todo o apoio administrativo e material para o desenvolvimento dessa pesquisa. Agradeço à Maria Auxiliadora Pin (Sá), Priscila Almeida, Rose Jesus, Fernanda Machado, André Garcia, Roberto Bérgamo, Valderes Piccon e Maria Teresa Hoffmann. Em especial, agradeço à Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Calijuri, pelo apoio durante todo esse processo e pelas oportunidades de contribuir em disciplinas sobre fitoplâncton.

À equipe do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), principalmente pela ajuda com os trabalhos desenvolvidos em campo. Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Frederico Fábio Mauad, e seus alunos Mariana Barbosa e Phelipe Anjinho. Não me esquecendo da melhor equipe de campo que a Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) já viu, composta pelo técnico Waldomiro Antonio Filho (Miro) e pelo motorista Benedito Patracon (Benê), muito obrigado!

Às doutoras Lívia Costa e Elaine Bartozek, que conheci no Instituto de Botânica de São Paulo (IBt-SP) e me auxiliaram na identificação de algumas espécies de diatomáceas.

Aos meus amigos Amanda Motta, Allan Ogura, Bianca Queiroz, Alex Kraus e Maiara Oliveira, por acreditarem em mim e me darem todo o apoio necessário para continuar desenvolvendo cada etapa deste trabalho, principalmente no último ano.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Amy Marcarelli, aos doutorandos Kevin Nevorski, Erin Eberhard e Michelle Kelly e todos os funcionários da *Michigan Technological University* (Houghton, MI/EUA), pela excelente recepção, pelo aprendizado e por todo o suporte durante a minha permanência como visitante na minha primeira viagem ao exterior.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) (Processo n. 2014/02088-5), pelo auxílio financeiro que permitiu a realização das pesquisas vinculadas ao estudo do ciclo do nitrogênio em reservatórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/PROEX), pela bolsa de doutorado (Processo n. 1684009, anos 2017-2018) e pelo auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento de parte da pesquisa no exterior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado (Processo n. 141665/2018-1, anos 2018-2020).

"Neste mundo que parece virado pelo avesso, precisamos fazer do fim um recomeço, precisamos fazer o bem brotar também do mal"

Augusto Branco

RESUMO

MOUTINHO, F. H. M. **Fixação de nitrogênio pelo fitoplâncton de água doce**: experimentos *in situ* e *in vitro* para análise da influência de fatores ambientais. 2021. 185 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) é um importante processo que permite o aporte de nitrogênio (N) para os ecossistemas aquáticos, tornando-o disponível para os microrganismos fixadores de N₂ na forma de amônio (NH₄⁺). Estudos referentes aos fatores ambientais que estimulam a ocorrência da fixação de N2 em reservatórios subtropicais são escassos, sendo que este processo pode contribuir para a permanência das florações de cianobactérias nos ecossistemas eutrofizados. O objetivo da presente pesquisa foi determinar in situ as taxas de fixação de N₂ em quatro reservatórios subtropicais (Lobo, Santana, 29 e Teixeira, todos localizados na porção central do estado de São Paulo), com o intuito de verificar quais fatores ambientais estimularam a fixação e seus padrões espaciais e temporais. Além disso, a influência da disponibilidade absoluta e relativa de nitrogênio inorgânico dissolvido (NID) e fósforo solúvel reativo (PSR) sobre a fixação de N2 pela cianobactéria Dolichospermum flosaquae foi investigada, em condições controladas in vitro. Para isso, o método do traçador com o isótopo $^{15}N_2$ foi utilizado em ambos os casos, tanto para as incubações dos experimentos em campo como para as conduzidas em laboratório. Além das baixas densidades de cianobactérias encontradas, não foram observados padrões verticais, horizontais e sazonais bem definidos para fixação de N2 nos reservatórios estudados, provavelmente devido às condições de mistura da coluna d'água, às pequenas dimensões dos reservatórios e à frequência de amostragem, respectivamente. Seis variáveis ambientais apresentaram limiares que favoreceram a fixação de N2 nos reservatórios subtropicais (clorofila- $a \ge 12 \ \mu g \ L^{-1}$; PSR $\ge 3.0 \ \mu g$ -P $\ L^{-1}$; fósforo total, PT $\ge 20.5 \ \mu g$ -P $\ L^{-1}$; razões molares NID:PT \leq 82; NID:PSR \leq 487; e temperatura \geq 22°C). Já nos experimentos *in vitro*, a fixação de N₂ foi favorecida pela menor disponibilidade de NID (190 $\leq \mu$ g-N L⁻¹) seguida pela maior disponibilidade de PSR (120 μ g-P L⁻¹), em razões molares NID:PSR \leq 10. Tanto nos experimentos in situ como nos in vitro, a fixação de N2 também ocorreu quando o N não foi um fator limitante para o crescimento das cianobactérias (razões molares N:P > 60). Isso sugere que os reservatórios com maior grau de trofia (> concentrações de P) possuem maior probabilidade da fixação de N2 acontecer, principalmente por suportarem maiores densidades de cianobactérias fixadoras de N2. Além disso, o baixo limiar para a temperatura sugere que os reservatórios subtropicais possuem, em tese, condições que favorecem a ocorrência da fixação de N_2 ao longo do ano, o que dependeria primordialmentre da disponibilidade de P. Já em condições controladas, a baixa disponibilidade de N ainda pareceu ser o fator regulatório da fixação de N_2 por *D. flosaquae*. Conhecer os fatores influentes sobre a fixação de N_2 é relevante para o manejo dos reservatórios eutrofizados, podendo auxiliar em estratégias capazes de romper o ciclo de florações de cianobactérias, com alternância de dominância entre espécies fixadoras e não fixadoras de N_2 .

Palavras-chave: Fixação biológica de N₂. Cianobactérias. *Dolichospermum flosaquae*. Ciclagem de nutrientes. Reservatórios subtropicais.

ABSTRACT

MOUTINHO, F. H. M. **Nitrogen fixation by freshwater phytoplankton**: *in situ* and *in vitro* experiments to environmental factors influence analysis. 2021. 185 p. Tese (Doutorado) – São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

Biological fixation of atmospheric nitrogen (N_2) is an important process that provides nitrogen (N) to aquatic ecosystems, making it available to the N₂-fixing microorganisms in the form of ammonium (NH_4^+) . While studies on the environmental factors that stimulate the occurrence of N₂ fixation in subtropical reservoirs are scarce, this process can contribute to the permanence of cyanobacterial blooms in eutrophic ecosystems. The aim of the present research was to estimate N₂ fixation rates in situ in four subtropical reservoirs (Lobo, Santana, 29 and Teixeira, all located in central portion of the São Paulo State), to determine which environmental factors stimulated the fixation and well as its spatial and sazonal patterns. Furthermore, the absolute and relative availability of dissolved inorganic nitrogen (DIN) and reactive soluble phosphorus (SRP) were specifically tested as predictors of N₂ fixation by cvanobcteria Dolichospermum flosaquae under in vitro controlled conditions. The tracer method with ${}^{15}N_2$ isotope was used in both cases for the field and the laboratory incubations. In addition to the low densities of cyanobacteria found, no clear vertical, horizontal and seasonal patterns were observed for N₂ fixation in the studied reservoirs, probably due to the mixing conditions of the water column, the small reservoir dimensions and the sampling frequency, respectively. The results showed that six environmental variables had thresholds that triggered N₂ fixation in subtropical reservoirs (chlorophyll- $a \ge 12 \ \mu g \ L^{-1}$; SRP $\ge 3.0 \ \mu g$ -P L^{-1} ; total phosphorus, TP $\geq 20.5 \ \mu$ g-P L^{-1} ; DIN:TP molar ratios ≤ 82 ; DIN:SRP ≤ 487 ; and temperature $\geq 22^{\circ}$ C). Concerning the *in vitro* experiments, N₂ fixation was favored by lower DIN availability (190 $\leq \mu g$ -N L⁻¹) followed by higher SRP availability (120 μg -P L⁻¹), at DIN:SRP molar ratios \leq 10. For both *in situ* and *in vitro* experiments, N₂ fixation also occurred when N was not a limiting factor for cyanobacterial growth (N:P molar ratios > 60). This suggests that reservoirs with a higher trophic status (> P concentrations) are more likely to have N₂ fixation because they support higher densities of N₂-fixing cyanobacteria. Moreover, the low threshold for temperature suggests that subtropical reservoirs have, in theory, conditions that favor the occurrence of N₂ fixation throughout the year, which would depend primarily on the availability of P. Under controlled conditions, the low availability of N still appeared to be the regulatory factor for N₂ fixation by *D. flosaquae*. Understanding the influencing factors on N₂ fixation is relevant to the management of eutrophic reservoirs,

helping the delineation of strategies for interrupting the cyanobacterial blooms cycle, with alternating dominance between N_2 -fixing and non- N_2 fixing species.

Keywords: Biological N₂ fixation. Cyanobacteria. *Dolichospermum flosaquae*. Nutrient cycling. Subtropical reservoirs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5 – Reservatório Santana (municípios de Brotas/SP - margem sul; de São Carlos - margem norte) com seu principal tributário (indicado pela seta) e diferentes áreas de uso e ocupação do solo. (JG – rio Jacaré-Guaçu; M_a – área com bancos de macrófitas; C_a – cultura anual; UC – Unidade de Conservação Estação Ecológica Mata do Jacaré; \blacktriangle - barragem).....52

Figura 7 – Esquema da distribuição dos reservatórios da Alegria, do 29, da Barra e do Teixeira como um sistema de armazenamento de água para geração de energia na PCH Capão Preto, localizada na bacia hidrográfica do rio do Quilombo (UGRHI -09 – Mogi-Guaçu).....55

Figura 16 – Velocidade média (m.s-1) (A) e direção predominante (°) do vento (B) entre junho/2017 e maio/2018. As setas indicam os meses em que as coletas foram realizadas. Legenda da rosa dos ventos (C): N – norte; NE – nordeste; L – leste; SE – sudeste; S – sul. 79

Figura 24 – Concentrações de nitrito $(N-NO_2)$ nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios

Figura 32 – Concentrações de clorofila-*a* nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios

LISTA DE TABELAS

Tabela 5 – Resultados da análise ROC para os casos de detecção da fixação de nitrogênio nos seis reservatórios estudados, considerando as variáveis teste: radiação solar fotossintética ativa (RSFA), temperatura (T), pH, clorofila-*a* (Chl-*a*), fósforo solúvel reativo (PSR), fósforo total (PT), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrogênio total (NT), sólidos suspensos totais (SST), e as razões molares nitrogênio total: fósforo total (NT: PT), nitrogênio inorgânico dissolvido: fósforo solúvel reativo (NID:PSR) e nitrogênio inorgânico dissolvido: fósforo solúvel reativo (NID:PSR) e nitrogênio inorgânico dissolvido: fósforo total (NID: PT). Para cada variável, área sob a curva (ASC), erro padrão (EP) e p-valores são mostrados, bem como os limiares (*thresholds*) identificados considerando o mínimo de sensibilidade de 0,750 e de valores associados (1 – Especificidade), que representa a probabilidade de ocorrer "falso-positivo". Os limiares para as todas as variáveis são para valores maiores ou iguais aos números apresentados, exceto para as razões NID:PSR e NID:PT, para os quais o limiar é válido para valores menores ou iguais ao número apresentados. Apenas limiares significativos foram apresentados (p < 0,05* ou p < 0,01**)......113

Tabela 6 – Resumo das condições nutricionais do Experimento A, com variação das concentrações de N, e do Experimento B, com variação das concentrações de P......122

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	. 27
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	. 29
2.	1 Reservatórios artificiais	. 29
2.2	2 Comunidade fitoplanctônica: ênfase nas cianobactérias	. 32
2.	3 O ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos	. 35
2.4	4 Fixação biológica de nitrogênio (N ₂)	. 38
3	OBJETIVOS	. 43
4	HIPÓTESES	. 45
5	MATERIAL E MÉTODOS	. 47
5.	1 Estudos <i>in situ</i>	. 47
5.	1.1 Área de estudo	. 47
5.	1.2 Variáveis climatológicas	. 57
5.	1.3 Amostragem	. 57
5.	1.4 Variáveis obtidas in situ	. 61
5.	1.5 Nutrientes totais e dissolvidos	. 62
5.	1.6 Sólidos suspensos	. 63
5.	1.7 Clorofila- <i>a</i>	. 64
5.	1.8 Variáveis biológicas da água	. 64
5.	1.9 Taxa de fixação biológica de nitrogênio - Método do traçador ¹⁵ N ₂	. 65
5.	1.10 Análise estatística	. 67
5.	2 Estudos <i>in vitro</i>	. 68
5.	2.1 Espécie utilizada	. 68
5.	2.2 Aclimatação e preparo dos inóculos iniciais	. 70
5.	2.3 Aclimatação ao meio ASM-1 em diferentes razões molares	.71
5.	2.3.1 Situação A - Modificação da concentração de N	.71
5.	2.3.2 Situação B - Modificação da concentração de P	. 71
5.	2.3.3 Aclimatação e aumento de volume em diferentes razões	. 72
5.	2.4 Curvas de crescimento	. 72
5.	2.5 Delineamento experimental: assimilação de PID	. 74
5.	2.6 Delineamento experimental: fixação de N ₂ sob diferentes razões molares	. 74
5.	2.7 Análise estatística	. 75
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 77

6.1 Experimentos in situ	77
6.1.1 Variáveis climatológicas	77
6.1.2 Estrutura física e química da coluna d'água	
6.1.3 Comunidade fitoplanctônica	
6.1.4 Taxas de fixação biológica de N ₂	
6.2 Experimentos in vitro	
6.2.1 Condições experimentais	
6.2.2 Fixação biológica de N ₂	
7 CONCLUSÕES	
REFERÊNCIAS	
ANEXO A – Meio ASM-1	
ANEXO B – Dados das coletas em campo	
ANEXO C – Listas de táxons fitoplanctônicos identificados	
ANEXO D – Calibração de DO x Chl-a	
ANEXO E – Razões molares NID:PID ao longo do experimento	

1 INTRODUÇÃO

A importância que a água possui como elemento fundamental para a manutenção dos ciclos biológicos e das atividades sociais, econômicas e culturais é um consenso mundial. Globalmente, a demanda de água tende a aumentar significativamente nas próximas décadas, principalmente por parte dos setores agrícola e industrial. Esta demanda tem desencadeado medidas ao longo do tempo que potencializam a utilização dos recursos hídricos para atender à produção de energia elétrica e ao abastecimento humano, o que tem estimulado a construção de reservatórios artificiais (Straškraba; Tundisi, 2013).

Apesar do Brasil possuir a maior reserva de água doce do planeta (~12%) (Tundisi, 2014), a disponibilidade desse recurso tem sido prejudicada devido a diversas fontes poluidoras, que afetam negativamente os múltiplos usos da água (*e.g.* abastecimento, geração de energia, irrigação, recreação, pesca de subsistência, esportiva e comercial). O despejo de esgotos domésticos e industriais, combinado com o escoamento superficial proveniente de lavouras agrícolas e de áreas urbanas, são as principais causas de degradação da qualidade da água, aumentando o aporte de nitrogênio (N) e fósforo (P) aos rios e reservatórios. O incremento progressivo desses nutrientes (N e P) é denominado eutrofização, que tem caráter artificial quando desencadeada pelas ações humanas. Uma das consequências desse processo é o florescimento de cianobactérias, que podem produzir toxinas e trazer, entre outros inconvenientes, prejuízos à saúde pública. Uma vez que os reservatórios brasileiros estão sujeitos a diversos tipos de interferências que favorecem a eutrofização, além do possível cenário de aquecimento global que pode estimular a ocorrência de florações de cianobactérias (Elliot, 2012; Visser *et al.*, 2016), o melhor conhecimento sobre esses ambientes se torna relevante para a garantia dos serviços ecossistêmicos.

Um ecossistema eutrofizado pode ter seus ciclos biogeoquímicos alterados. No caso do ciclo do nitrogênio, as principais fontes naturais desse elemento nos ecossistemas aquáticos são a fixação biológica, a deposição atmosférica, a lixiviação e o sedimento (Galloway, 1998). A fixação biológica nos ecossistemas aquáticos, realizada principalmente por cianobactérias, pode atuar como processo de retroalimentação positiva para o aumento da disponibilidade de nitrogênio em reservatórios eutrofizados. Desta forma, mesmo com eventual controle ou interrupção de fontes poluidoras, esses ambientes continuariam sob constante fertilização, o que dificultaria a manutenção do estado trófico.

Atualmente, os estudos de fixação biológica do nitrogênio estão majoritariamente restritos aos ambientes de clima temperado (Présing *et al.*, 2001; Ferber *et al.*, 2004; Forbes *et*

al., 2008; Bryhn; Blenckner, 2007; Scott *et al.*, 2009; Vrede *et al.*, 2009; Zehr; Capone, 2020), ainda raramente sendo realizados em corpos hídricos tropicais e subtropicais (Doyle; Fisher, 1994; Yu *et al.*, 2014; Marafão, 2016). Além disso, poucos são os estudos que se dedicaram a buscar padrões espaciais (horizontais e verticais) na fixação do N_2 nos reservatórios (Présing *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2009), sendo a presente pesquisa, ao nosso conhecimento, a primeira iniciativa nesse sentido a ser realizada em reservatórios neotropicais.

Em estudos utilizando cepas de cianobactérias, vários fatores mostraram ser interferentes sobre o processo da fixação biológica de N_2 , como a temperatura (Breitbart; Oschilies; LaRoche, 2006), a luminosidade (Inomura *et al.*, 2019), as concentrações de cianotoxinas (Chia *et al.*, 2019) e a disponibilidade de macro e micronutrientes (Schoffelen *et al.*, 2019; Fernández-Juárez *et al.*, 2020). Porém, raramente esses estudos avaliaram o potencial da fixação de N_2 sob diferentes condições de razões molares entre N e P inorgânicos dissolvidos (Osburn; Wagner; Scott, 2021), sendo limitados pela comparação entre condições com total abstinência de N ou com enriquecimento de P.

A hipótese de que a fixação de N_2 ocorre preferencialmente em ambientes onde há menor disponilidade de N inorgânico dissolvido também pode ser um ponto de inflexão na comunidade científica. Isso ocorre pelo motivo do P ser um elemento essencial no gasto energético para o processo de fixação (Dodds; Whiles, 2010), o que sugere que mesmo na ausência de N a fixação poderia não ocorrer, caso as concentrações de P inorgânico dissolvido sejam limitantes (Fernández-Juárez *et al.*, 2020). A falta de consenso sobre qual nutriente seria prioritário para controlar as florações de cianobactérias fixadoras de N₂ pode resultar em diversas consequências para gerenciamento dos recursos hídricos. A remoção apenas de P, por exemplo, poderia inibir as florações de espécies diazotróficas (*e.g. Raphidiopsis, Dolichospermum, Aphanizomenon*), mas não necessariamente de espécies não fixadoras e também com grande potencial de produção de toxinas (*e.g. Microcystis* spp.), que possuem baixa sensibilidade à limitação de fósforo (Wan *et al.*, 2019).

Desta forma, o presente estudo pretendeu contribuir para a quantificação das taxas de fixação de nitrogênio atmosférico em reservatórios brasileiros e seus principais fatores intervenientes, principalmente com relação à disponilidade de N e P por meio de experimentos em laboratório. Assim, espera-se fornecer subsídios para possíveis ações de manejo e remediação para o controle de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos de água doce. A partir desse conhecimento, os planos de gerenciamento dos reservatórios podem ser melhor concebidos e monitorados, visando à melhoria contínua da qualidade das águas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Reservatórios artificiais

Nas últimas décadas, a associação entre o incremento na demanda pela água doce devido ao crescimento populacional e a degradação da qualidade da água dos mananciais tem gerado pressões significativas sobre os sistemas aquáticos naturais (Straškraba; Tundisi, 2013). A construção de reservatórios artificiais surgiu inicialmente como uma solução para atender à demanda por energia elétrica e, posteriormente, também possibilitou a utilização de suas águas para o abastecimento público, além de outras finalidades.

Os reservatórios são considerados ecossistemas intermediários entre rios e lagos que podem assumir características próximas aos ambientes lóticos ou lênticos, que são definidas de acordo com os compartimentos desses ecossistemas (Scott *et al.*, 2009; Straškraba; Tundisi, 2013). Possuem gradientes horizontais e verticais, que resultam em diferenças marcantes, por exemplo, nas concentrações de partículas suspensas, de nutrientes, na profundidade de mistura e na disponibilidade de luz para a produção primária (Kimmer; Groeger, 1984).

Thornton, Kimmel e Payne (1990) propuseram um modelo heurístico que descreve a variabilidade espacial (na morfologia, hidrodinâmica, na biota, entre outros) ao longo do eixo longitudinal em reservatórios, com início na região de entrada do rio até a barragem. De acordo com estes autores, neste contínuo podem ser reconhecidos compartimentos teóricos denominados zonas de rio, de transição e lacustre (Figura 1A). Ainda segundo Thornton, Kimmel e Payne (1990), tais compartimentos podem ser caracterizados da seguinte forma:

- i) Zona de rio (ZR) considerado como um ambiente lótico, esse compartimento é caracterizado pelo maior fluxo de água (menor tempo de residência), com maiores concentrações de sólidos suspensos e de nutrientes provenientes do(s) rio(s) tributário(s). Devido à presença de sólidos, que resultam em maior turbidez abiogênica, ocorre um maior coeficiente de extinção da luz, tornando a luminosidade o principal fator limitante para a produtividade primária nessa região;
- ii) Zona de transição (ZT) esta zona possui como característica a diminuição da velocidade do fluxo de água, com o consequente aumento do tempo de retenção hidráulico e maiores taxas de sedimentação de partículas. Em função

da maior penetração de luz, há condições suficientes para maior produtividade e biomassa fitoplanctônica. Devido ao conjunto desses fatores, essa região é comumente a que apresenta maior potencial de produção primária dentro de um reservatório;

iii) Zona lacustre (ZL) – este compartimento está situado mais próximo à barragem. Com características similares aos lagos, o tempo de residência da água nessa região tende a ser maior, também com menores concentrações de nutrientes e sólidos suspensos. Desta forma, a transparência da água é maior quando comparada com as outras zonas, proporcionando uma zona eufótica mais extensa.

Figura 1 – Zoneamento longitudinal e vertical baseados em fatores ambientais que controlam o estado trófico e a produtividade primária em reservatórios. (A) vista superior; (B) vista em corte longitudinal



Fonte: Adaptado de Kimmer e Groeger (1984) (A) e de Tundisi e Tundisi (2008) (B).

A estratificação térmica é um importante processo natural para os ecossistemas aquáticos, que interfere na estrutura física, química e biológica da coluna d'água, resultando em diferentes tipos de gradientes verticais (*e.g.* distribuição da biomassa fitoplanctônica, do oxigênio dissolvido) (Cantin *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015). Este processo físico ocorre devido à alteração da densidade da água que é inversamente proporcional à temperatura, podendo compartimentalizar a coluna d'água em estratos distintos (Figura 1B). As águas com

temperaturas mais elevadas são menos densas, o que resulta na formação de um estrato superficial denominado epilímnio. Por outro lado, as águas mais frias possuem maior densidade e acabam confinadas no fundo da coluna d'água, compondo o estrado conhecido como hipolímnio (Figura 1B) (Thornton; Kimmel; Payne, 1990).

Ambos os modelos de compartimentalização horizontal (ou longitudinal) e vertical são reconhecidos pela comunidade científica e contemplam diversos estudos que envolvem a produtividade primária e a comunidade fitoplanctônica em reservatórios (*e.g.* Henry *et al.*, 1998; Fonseca; Bicudo, 2008; Cunha; Calijuri, 2011; Moreti *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015). Mais recentemente, algumas pesquisas têm objetivado revisar os modelos clássicos de compartimentalização, buscar padrões mais específicos para ambientes tropicais e subtropicais e identificar elementos que causam desvios em relação às zonas espaciais tipicamente esperadas nos reservatórios (Carneiro; Bini, 2020; Guedes *et al.*, 2020).

Fonseca e Bicudo (2008), ao estudarem um reservatório raso no município de São Paulo (Lago das Garças), verificaram que os episódios de estratificação química (perfil de oxigênio dissolvido e de nutrientes) estavam associados com a estratificação térmica, que ocorreu nos meses de primavera e verão. Os autores concluíram que os processos físicos de estratificação e mistura da coluna d'água contribuíam para a variação da comunidade fitoplanctônica, com o surgimento de dinoflagelados, diatomáceas e clorofíceas no inverno, devido à mistura da coluna d'água, e a persistência das cianobactérias nos períodos de estratificação.

Santos *et al.* (2015), ao avaliarem a estrutura vertical do fitoplâncton no reservatório Guarapiranga (São Paulo/SP, Brasil), observaram que a diferença de densidade entre o epilímnio e o hipolíminio pode ser grande ao ponto de impedir a migração e a sedimentação de espécies do fitoplâncton entre elas. Também verificaram que a velocidade dos ventos e a temperatura do ar foram as variáveis cruciais para a manutenção das estratificações durante o período estudado.

Cunha e Calijuri (2011) sugeriram que a menor disponibilidade de luz na zona de rio do reservatório Itupararanga (Sorocaba/SP, Brasil) foi um dos fatores limitantes para o crescimento fitoplanctônico nesse ambiente, uma vez que o fósforo total advindo do rio formador permaneceu em elevadas concentrações na água. Por outro lado, o trabalho mostrou que a relação entre clorofila-*a* (Chl-*a*) e nitrogênio total indicou que esse nutriente é limitante nas zonas de rio e lacustre. A distribuição do fitoplâncton ao longo de um perfil longitudinal foi estudada no trabalho de Moreti *et al.* (2013), no reservatório do Mourão (Campo

Mourão/PR, Brasil). O estudo evidenciou gradiente horizontal para o biovolume fitoplanctônico, com maiores valores nas zonas de transição e lacustre.

Assim, tanto a compartimentalização vertical como a longitudinal são influenciadas por fatores ambientais (*e.g.* tempo de retenção da água, temperatura do ar, velocidade e direção dos ventos). Além destes, as regras operacionais dos reservatórios também podem interferir na estabilidade dessas zonas (Straškraba, 1999). Reservatórios com menor tempo de retenção (10 dias) possuem uma zona de rio mais extensa (até a barragem). Por outro lado, quando o tempo de retenção da água é maior que 200 dias, a compartimentalização pode ser mais evidente, delimitando mais claramente as zonas de rio, transição e lacustre (Straškraba, 1999).

Uma das principais consequências da interferência antrópica no entorno dos reservatórios é o enriquecimento das águas, de forma acelerada, conhecido como eutrofização artificial ou cultural (Rast; Holland, 1988). O processo de eutrofização modifica as comunidades aquáticas e as propriedades físicas e químicas da água, aumentando a produtividade dos corpos hídricos (Esteves; Meirelles-Pereira, 2011), trazendo inconvenientes e limitações para os seus usos múltiplos.

O nitrogênio e o fósforo têm sido considerados como os principais nutrientes responsáveis pela eutrofização, pois são aqueles que tradicionalmente limitam a produtividade primária nos ecossistemas aquáticos (Hall *et al.*, 2005). As principais atividades antrópicas que estão associadas à eutrofização são o lançamento de efluentes domésticos e industriais (poluição pontual), além da agricultura intensiva, que pode possibilitar a lixiviação de fertilizantes para as águas (poluição difusa) (Lima *et al.*, 2016). Em reservatórios e lagos eutrofizados, as florações (*blooms*) fitoplanctônicas na superfície da água são uma das principais consequências desse enriquecimento.

2.2 Comunidade fitoplanctônica: ênfase nas cianobactérias

A comunidade fitoplanctônica é composta por microrganismos fotossintetizantes oxigênicos que vivem em suspensão na coluna d'água, responsáveis pela produção primária, sendo este um dos processos ecológicos mais importantes dentro de reservatórios (Calijuri; Deberdt; Minoti, 2007). Essa comunidade é composta pelos mais variados tipos de microalgas e cianobactérias, que diferem em morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia, o que torna essa comunidade um grupo polifilético.

Antigamente, as microalgas e as cianobactérias eram agrupadas apenas com base em características morfológicas, constituindo sistemas artificiais de classificação. Com o aprimoramento de técnicas genéticas e da tecnologia, maiores informações sobre esses microrganismos foram adquiridas, e subsidiaram a elaboração de sistemas filogenéticos de agrupamento (Bicudo; Menezes, 2017). Como exemplos de classes fitoplanctônicas incluídas Chlamydophyceae, Prasinophyceae, Chlorophyceae, nesses sistemas. temos: Trebouxiophyceae, Zygnemaphyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae, Xantophyceae, diatomáceas (Bacillariophyceae, Coscinodiscophyceae e Mediophyceae), além do filo Cyanobacteria (Bicudo; Menezes, 2017), que são frequentemente encontradas em reservatórios brasileiros (Chellappa; Borba; Rocha, 2008; Moreti et al., 2013; Adloff et al., 2018; Amorim; Dantas; Moura, 2020; Moraes et al., 2021).

Alguns desses grupos destacam-se dos demais devido aos problemas sanitários e de saúde pública que podem causar, como as cianobactérias. Esses microrganismos podem formar extensas florações em ambientes eutrofizados e impedir a passagem de luz, além de serem potenciais produtoras de toxinas (Brandão; Domingos, 2006; Carvalho *et al.*, 2007). No Brasil, o caso mais conhecido que relaciona a floração de cianobactérias produtoras de toxinas com problemas de saúde pública é o de Caruaru/PE, em 1996, quando pacientes utilizaram água contaminada por microcistinas e cilindrospermopsinas (tipos de hepatotoxinas) para o tratamento com hemodiálise, o que ocasionou a morte de 76 pessoas (Carmichael *et al.*, 2001). Esse evento resultou na implantação da Portaria nº 1469, de dezembro de 2000 (BRASIL, 2001), reestruturada e substituída hoje pela Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 (BRASIL, 2021), que em seus anexos 10, 12 e 13 normatiza o monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em águas destinadas ao consumo humano.

Mesmo assim, a presença de cianotoxinas nas águas utilizadas para abastecimento público no Brasil ainda é um problema recorrente. Um estudo mais recente associou a presença de saxitoxina (uma neurotoxina) em águas de abastecimento do Nordeste brasileiro com a má formação cerebral de bebês decorrente da infecção pelo Zika vírus (Pedrosa *et al.*, 2020). Os autores sugeriram que essa toxina colaborou para a intensificação da microcefalia, como demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Pedrosa *et al.*, 2020).

Piccin-Santos e Bittencourt-Oliveira (2012) investigaram a potencial produção de toxinas pelas cianobactérias presentes em quatro reservatórios brasileiros, dois no estado de São Paulo e dois em Pernambuco. As autoras descreveram que em todos eles foram encontradas espécies produtoras, com concentração de microcistina máxima de 223,7 μ g L⁻¹, durante uma floração de *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente denominada

Cylindrospermopsis raciborskii) no reservatório tropical de Mundaú (PE). Moraes *et al.* (2021) relataram a ocorrência de saxitoxinas nas águas do reservatório Itupararanga (SP, Brasil), utilizado para abastecimento público, com maiores concentrações determinadas na zona lacustre desse reservatório ($\leq 0,23 \ \mu g \ L^{-1}$). Os principais gêneros que foram correlacionados às concentrações dessas cianotoxinas foram *Aphanizomenon, Geitlerinema* e *Raphidiopsis*.

As cianobactérias são procariontes gram-negativos capazes de realizar fotossíntese oxigênica e possuem diversas estruturas que as tornam grandes competidoras sobre as microalgas. Como exemplo, apresentam vesículas gasosas (aerótopos), que regulam a flutuabilidade de algumas espécies na coluna d'água (Kosten *et al.*, 2012), e diversos tipos de fotorreceptores (cianobacteriocromos), que ampliam a capacidade de absorção de luz dentro de um espectro, possibilitando sua sobrevivência em locais com baixa luminosidade (Bhaya, 2016). Também podem produzir mucilagem que auxilia na flutuabilidade e dificulta a herbivoria pelo zooplâncton. Outra característica que pode favorecer a dominância de cianobactérias sobre demais grupos fitoplanctônicos em um ambiente eutrofizado é a capacidade de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) (Ferber *et al.*, 2004), que pode ser realizada por meio de mecanismos temporais (*e.g.* durante a noite) ou espaciais (*e.g.* formação de heterócitos ou diazócitos).

Santos *et al.* (2015) observaram que a cianobactéria *Pseudanabaena galeata* foi abundante no reservatório Guarapiranga (São Paulo, SP) (em 5,5 m de profundidade), em comparação com outros grupos fitoplanctônicos encontrados, sugerindo certa resistência à deficiência de luz. Em seus resultados, também foi visível a diferença na distribuição de *Scenedesmus ecornis* (Chlorophyceae) e de *Aphanocapsa delicatissima* (Cyanobacteria), que apresentaram maiores densidades na superfície da coluna d'água, sugerindo certa dependência da luminosidade.

Vanderley *et al.* (2021) verificaram que secas prolongadas e a disponilidade de luz foram fatores chave para a dominância perene de cianobactérias em reservatórios brasileiros rasos. Os gêneros dominantes neste estudo foram *Microcystis* (colonial) e *Raphidiopsis* (filamentosa), sendo que o gênero *Raphidiopsis* (potencial fixador de N₂) foi dominante em condições com maior disponilidade de nutrientes (fósforo total: 39-231 µg-P L⁻¹; nitrogênio total dissolvido: 953-4910 µg-N L⁻¹), quando a temperatura não foi um fator limitante para o ganho de biomassa de cianobactérias (> 25°C) (Paerl, 2018).

Em experimentos laboratoriais, observou-se que as espécies de cianobactérias Anabaena circinalis e A. crassa foram capazes de acumular maior quantidade de aerótopos sob condições de baixas intensidades luminosas e elevada concentração de fósforo (Zapomělová *et al.*, 2008). Essa alteração significa uma vantagem adaptativa para esse grupo, uma vez que em condições de sombreamento estes organismos podem flutuar na coluna d'água para zonas com maior disponibilidade de luz, possibilitando a formação de escumas na superfície.

Não é apenas a presença de estruturas físicas que determina a competitividade das cianobactérias sobre outros grupos do fitoplâncton. A disponibilidade de nutrientes, como N e P, também é um fator crucial para regular o crescimento desses microrganismos nas águas continentais (Muhid; Burford, 2012). Isvánovics *et al.* (2000) estudaram a cinética de assimilação de fósforo pela espécie *Raphidiopsis raciborskii*, e concluíram que essa espécie é oportunista com relação ao P, pois possui elevada capacidade de estocagem desse nutriente. Além disso, essa espécie desenvolve heterócitos (Komárek, 2013) e pode fixar N₂ quando as concentrações de nitrogênio na água são baixas (*e.g.*10 µg-N L⁻¹, Sprőber *et al.*, 2003), fortalecendo seu nível de competitividade.

2.3 O ciclo do nitrogênio em ambientes aquáticos

O nitrogênio é um dos elementos essenciais para a vida, pois compõe as bases da constituição química do genoma de todas as espécies e constitui as cadeias proteicas. São diversos os tipos de compostos que podem ser utilizados pelos organismos como fontes de nitrogênio. Entre eles, destacam-se os grupos dos íons inorgânicos (*e.g.* nitrato - NO_3^- , nitrito - NO_2^- , amônio - NH_4^+) e dos compostos orgânicos (*e.g.* aminoácidos, ureia, bases nitrogenadas) (Herrero; Muro-Pastor; Flores, 2001). O ciclo do nitrogênio envolve diversas reações biogeoquímicas que estão associadas ao ambiente terrestre, aquático e atmosférico, tanto em condições aeróbias como anaeróbias (Figura 2). Entretanto, com a demanda crescente por alimentos e energia, as atividades humanas têm alterado significativamente este ciclo (Galloway, 1998; Downing *et al.*, 1999), em escalas regional e global.

O ciclo do nitrogênio na água é complexo, pois possui muitas vias de conversão entre compostos que ocorrem em diferentes compartimentos e por diferentes vias (aeróbias e anaeróbias), além de sofrer grande influência de fatores externos, como o lançamento de águas residuárias (Figura 2). Devido à grande área superficial, a entrada de N via deposição ou difusão atmosférica é mais significativa em reservatórios e lagos do que em rios, sendo que

em ambos também existe o aporte de N via fluxos subterrâneos, que dependem da geologia da bacia hidrográfica (Durand *et al.*, 2011; Cottingham *et al.*, 2015).

Quando o N₂ é solubilizado na água, apenas os microrganismos diazotróficos podem convertê-lo em formas assimiláveis para outros organismos (*e.g.* aminoácidos, NH₄⁺). A ocorrência de genes para fixação de nitrogênio (genes do grupo *nif*), que possibilita essa conversão, é uma característica parafilética que está restrita às arqueias, bactérias (*e.g. Azobacter* e *Pseudomonas* em condições aeróbias, *Chromatium* e *Clostridium* em condições anaeróbias; Bernhard, 2010), e cianobactérias (Raymond *et al.*, 2004). Após essa transformação, conhecida como fixação biológica, o nitrogênio passa a estar disponível para outros organismos.

Dentro do ciclo do nitrogênio, podem ser destacadas duas principais reações. A primeira é a nitrificação, na qual o NH_4^+ é oxidado a NO_2^- e posteriormente a NO_3^- , por bactérias quimioautotróficas dos gêneros *Nitrosomonas* (oxidam NH_4^+ a NO_2^-) e *Nitrobacter* $(NO_2^-$ a NO_3^-) (Hutzinger, 1982). Esta etapa ocorre apenas na presença de oxigênio dissolvido na água. A segunda reação, a desnitrificação, envolve a conversão de NO_3^- em N_2 , realizada por bactérias dos gêneros *Bacillus, Pseudomonas* e entre outros. Este processo é anaeróbio, uma vez que essas bactérias acabam utilizando o NO_3^- como aceptor de elétrons na ausência de oxigênio, por meio da enzima nitrogenorredutase (Hutzinger, 1982).

Muitas pesquisas têm relatado a importância da reciclagem interna de nutrientes que mantém a condição eutrófica de lagos e reservatórios (Presing *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 2013; Cottingham *et al.*, 2015), além da própria fixação biológica realizada pelas cianobactérias (Galloway, 1998; Ferber *et al.*, 2004) que tem sido amplamente reconhecida como um processo crucial nos ambientes aquáticos (Zehr; Capone, 2020). Tanto a reciclagem interna quanto a fixação biológica podem atuar como um mecanismo de retroalimentação positivo na fertilização dos corpos d'água, o que dificulta o controle do estado trófico uma vez que o ambiente atinge condições eutróficas.

McCarthy *et al.* (2013), ao estudarem um lago eutrófico temperado, concluíram que o sedimento pode ser uma fonte importante de NH_4^+ que mantém a produtividade do ecossistema. Os autores não detectaram taxas de fixação de N_2 significativas durante todo o período estudado e encontraram taxas de regeneração de NH_4^+ elevadas no verão, o que corroborou a importância da ciclagem interna do nitrogênio como mantenedor da condição eutrófica do Lago Champlain (EUA/Canadá).

Por outro lado, Kunza e Hall (2014) verificaram que em ecossistemas oligotróficos, a assimilação de nutrientes dissolvidos (*e.g.* NO_3^- e NH_4^+) pode ser até oito vezes inferior às
taxas de fixação de N₂ atmosférico. Os autores observaram que as taxas de fixação foram maiores (~3,0 mg-N m⁻² h⁻¹) em temperaturas mais elevadas (~23°C) e que os organismos mais abundantes foram as diatomáceas do gênero *Epithemia* (que possui cianobactérias endossimbiontes fixadoras de N₂), seguidas pelas cianobactérias heterocitadas do gênero *Nostoc*.





Fonte: Adaptado de Esteves e Amado (2011).

Ao realizarem experimentos no lago Limmaren (Suécia) utilizando isótopos (¹⁵N), Vrede *et al.* (2009) verificaram que em condições com razões molares N:P entre 14-32 (consideradas baixas pelos autores), a comunidade fitoplanctônica sofreu modificações que resultaram na dominância de cianobactérias fixadoras de N₂. Os autores também estimaram que o N proveniente da fixação biológica representou 60% do suprimento total de nitrogênio. Schindler (1977) e Müller e Mitrovic (2015) também concluíram que elevadas concentrações de P (> 30 μ g L⁻¹ e 200 μ g L⁻¹, respectivamente) e baixas razões N:P (<5) (Schindler, 1977) favorecem as florações de cianobactérias, dominadas muitas vezes pelos gêneros fixadores de N₂. Por outro lado, elevadas razões N:P podem inibir as espécies fixadoras de N₂ (Schindler *et al.*, 2008), mas não necessariamente as florações. Com isso, o conhecimento sobre o processo de fixação acoplado com a disponibilidade de nutrientes na água se torna fundamental para melhor gerenciar os sistemas aquáticos, com o objetivo de prever e/ou controlar o crescimento de cianobactérias (Descy *et al.*, 2016), incluindo gêneros potencialmente produtores de toxinas.

2.4 Fixação biológica de nitrogênio (N₂)

A fixação biológica engloba uma série de reações de conversão do N_2 em NH_4^+ , que posteriormente é incorporado em aminoácidos essenciais para a manutenção das atividades celulares. Contudo, esse processo não ocorre de forma espontânea, pois requer elevado custo energético (16 mol-ATP/mol- N_2 fixado) (Berg; Tymoczko; Stryer, 2002; Dodds; Whiles, 2010). O principal complexo enzimático que catalisa as reações de fixação é denominado nitrogenase (*nif*1 e *nif*2), que atua em meio anóxico, pois é inativado na presença de O_2 (Berman-Frank; Lundgren; Falkowski, 2003; Dodds; Whiles, 2010). Para possibilitar a incorporação de N_2 , as cianobactérias que realizam a fixação dispõem de mecanismos que evitam o contato da nitrogenase com o O_2 proveniente da fotossíntese, contornando essa incompatibilidade. Como exemplo, tem-se a fixação temporal (realizada em períodos diferentes, *e.g.* durante a noite) ou a fixação separada espacialmente (que ocorre em regiões ou células diferenciadas dos filamentos) (Kumar; Mella-Herrera; Golden, 2010).

No primeiro caso, alguns gêneros de cianobactérias unicelulares e filamentosas (*e.g.*, *Crocosphaera*, *Cyanothece*, *Gloeothece*, *Lyngbya*) realizam a fixação somente no período noturno, na ausência da fotossíntese, o que possibilita a diminuição das concentrações de oxigênio dissolvido no meio intracelular (Bergman *et al.*, 1997, Inomura *et al.*, 2019). Nestes casos, os genes *nif*2 são responsáveis por expressar a nitrogenase que atua nas células vegetativas (Thiel, 2006). Toepel *et al.* (2008) observaram que no caso de cepas de

Cyanothece sp., essas células estocam glicogênio durante o dia, para ser utilizado como fonte de energia e possibilitar a fixação de N_2 no período noturno.

Já na fixação que ocorre por uma separação espacial, em outros gêneros, a distribuição da nitrogenase nas células vegetativas pode ser heterogênea evitando o conflito com os picos diários da fotossíntese (*e.g. Trichodesmium, Katagnymene*). Sandh *et al.* (2009) verificaram que a cianobactéria marinha *Trichodesmium erythraeum* é capaz de realizar fotossíntese e fixação de nitrogênio na presença de luz, porém essas duas atividades ocorrem em diferentes regiões do tricoma (fixação no centro e fotossíntese nas extremidades).

Outra opção de setorização da fixação é a ocorrência de células especializadas denominadas heterócitos, de ocorrência em gêneros como *Anabaena*, *Raphidiopsis*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* e *Nostoc*, por exemplo. Os heterócitos são caracterizados por possuírem paredes espessas (camadas de fibras, glicolipídios, polissacarídios e peptidoglicanos) que dificultam a difusão do O₂, por não realizarem fotossíntese completa (ausência do fotossistema II) e por possuírem elevadas taxas respiratórias (Berman-Frank; Lundgren; Falkowski, 2003; Kumar; Mella-Herrera; Golden, 2010; Bergman *et al.*, 2013). Normalmente a formação dos heterócitos é suprimida quando as cianobactérias crescem em ambientes com fontes de N, como NO_3^- e NH_4^+ , pelo fato destes nutrientes inibirem a expressão do gene da nitrogenase que atua nessas células (*nif*1) (Thiel, 2006).

No trabalho de revisão de Kumar, Mella-Herrera e Golden (2010), os autores relatam que a cepa PCC 7120 de *Anabaena* sp. é uma das mais bem estudadas em todo o mundo, e que serve de modelo para trabalhos que investigam o desenvolvimento de heterócitos sob diversas condições. Nesta cepa, foi observado que a expressão do gene responsável por regular a formação dos heterócitos (*ntcA*) pode ocorrer na presença de NO_3^- ou NH_4^+ , mas que sua expressão sempre foi maior nos casos em que havia abstinência de N dissolvido (Herrero; Muro-Pastor; Flores., 2001).

O processo de fixação de nitrogênio realizado pelas cianobactérias também pode ocorrer em simbiose com outros microrganismos, como as diatomáceas. Em estudos laboratoriais, cuturas simbióticas de *Hemiaulus-Richelia* (cianobactéria-diatomácea) foram capazes de crescer mesmo sem a adição de nitrogênio assimilável no meio de cultivo, indicando que as cianobactérias foram capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e favorecer o crescimento das diatomáceas (Pyle; Johnson; Villareal; 2020). Schoffelen *et al.* (2019) verificaram que a transferência de N fixado para outros organismos depende da espécie de cianobactéria e da disponibilidade de fósforo inorgânico dissolvido (PID) no ambiente. Enquanto o gênero *Nodularia* transfere até 14% do N fixado para microrganismos epibiontes,

40

aparentemente o gênero *Aphanizomenon* retém 100% do N fixado para uso intracelular, em condições com limitação de PID (Schoffelen *et al.*, 2019).

Devido ao alto custo energético, a fixação biológica do N₂ tende a ocorrer em ambientes deficientes de nitrogênio ou com baixas razões molares entre nitrogênio e fósforo (N:P) (Ferber *et al.*, 2004). A razão molar N:P considerada equilibrada para o crescimento fitoplanctônico foi descrita pela primeira vez por Redfield (1958), com valor aproximado de 16:1 para os ecossistemas marinhos. Mais recentemente, a razão N:P para lagos foi revisada para aproximadamente 23:1 (Sterner *et al.*, 2008). Desta forma, considera-se que razões N:P < 10 indicam um ambiente deficiente de nitrogênio (limitante), enquanto razões N:P > 20 tornam o fósforo o nutriente limitante para o desenvolvimento do fitoplâncton (Grayson *et al.*, 1997). Contudo, também existem outros critérios disponíveis para identificar os nutrientes limitantes para o crescimento fitoplanctônico (*e.g.* Guildford; Hecky, 2000; Ye; Cai, 2011).

Além da razão N:P e das concentrações de formas nitrogenadas na água (principalmente inorgânicas dissolvidas, como NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^-), existem diversos outros fatores que podem influenciar as taxas de fixação nos ambientes aquáticos como a luminosidade, a temperatura e os aspectos hidrodinâmicos (Doyle; Fisher, 1994; Yu *et al.*, 2014; Visser *et al.*, 2016). Scott *et al.* (2009) estudaram três reservatórios norte-americanos (Texas, EUA) e verificaram que, além da fixação de nitrogênio depender da luz, as taxas de fixação foram longitudinalmente heterogêneas, com os maiores valores estimados nas zonas de transição dos reservatórios (25-60 vezes maiores em comparação às demais zonas). Uma das possíveis explicações que os autores propõem é que ocorreu um gradiente das razões N:P, que favoreceu o crescimento fitoplanctônico na zona de rio (com maiores concentrações de N e P) e a dominância de cianobactérias na zona de transição (com o P disponível via sedimento). A disponibilidade de fósforo (com N limitante), a maior estabilidade da coluna d'água e a maior penetração de luz na zona de transição seriam os principais fatores que estimularam a fixação biológica nessa região.

Forbes *et al.* (2008) investigaram a importância de fatores físicos, do uso do solo e da qualidade da água para predição da produtividade primária e da fixação de N_{2} , longitudinalmente entre a zona de rio e a zona lacustre de oito reservatórios do Texas (EUA). Os autores observaram que as taxas de fixação de N_2 foram elevadas em regiões com menor área de drenagem, pois nesses ambientes ocorreu maior estabilidade hidrodinâmica pelo menor fluxo de escoamento superficial, o que diminui a turbidez e turbulência das águas, favorecendo a dominância de cianobactérias fixadoras de N_2 .

Yu *et al.* (2014), ao estudarem a comunidade de microrganismos diazotróficos de um reservatório subtropical (China), verificaram que a abundância desta comunidade obteve correlação negativa com a temperatura e o oxigênio dissolvido. De acordo com os resultados dos autores, as menores temperaturas (~17°C) e a condição anóxica (<0,5 mg L⁻¹) favoreceram o crescimento das diazotróficas no hipolímnio da coluna d'água. A espécie dominante identificada nesse trabalho foi *Raphidiopsis raciborskii*, cianobactéria filamentosa que desenvolve heterócitos e também é comumente encontrada nos reservatórios brasileiros (Soares *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2021).

De acordo com Doyle e Fisher (1994), a fixação biológica foi fortemente dependente da luminosidade no estudo da comunidade fitoplanctônica e perifítica em um lago de uma planície amazônica. Os autores verificaram que o processo de fixação foi maior (taxas máximas $\leq 4,3 \mu$ mol-N mg chl- a^{-1} h⁻¹) entre intensidades de 500 e 900 μ mol m⁻² s⁻¹, e que as espécies responsáveis pela maior taxa de fixação possuíam heterócitos. Esse resultado é corroborado pelo fato das espécies heterocitadas realizarem fixação na presença de luz (Berman-Frank; Lundgren; Falkowski, 2003).

Marafão (2016) estudou a fixação biológica na zona lacustre de três reservatórios do estado de São Paulo, e verificou que a taxa absoluta de fixação em reservatórios subtropicais pode ser relativamente maior (1,00 µg-N $L^{-1} h^{-1}$) quando comparada aos ambientes temperados (*e.g.* máxima de 0,35 µg-N $L^{-1} h^{-1}$ determinada por Scott *et al.*, 2009). Esses resultados podem ser corroborados por análises que sugerem que as águas doces subtropicais são mais suscetíveis à limitação de N do que as zonas temperadas (Downing *et al.*, 1999), o que favoreceria a maior taxa de fixação.

Ainda é pouco conhecido como a temperatura nos ecossistemas aquáticos subtropicais influencia o processo de fixação biológica de nitrogênio nesses ambientes. Além disso, a maior parte dos estudos laboratoriais de fixação biológica é desenvolvida com espécies de cianobactérias marinhas (Rodriguez; Ho, 2014; Rabouille *et al.*, 2014), sendo escassos trabalhos com espécies frequentemente encontradas nos reservatórios brasileiros. Desta forma, conhecer os fatores que influenciam as taxas de fixação de N₂ de cianobactérias provenientes de reservatórios brasileiros também se faz necessário, uma vez que esses microrganismos já dominam diversos reservatórios (Soares *et al.*, 2013), deteriorando a qualidade da água para o consumo humano e para os demais usos.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a influência de fatores bióticos e abióticos sobre a fixação biológica de nitrogênio por cianobactérias do fitoplâncton *in situ* (em campo) e *in vitro* (em laboratório) como contribuição ao entendimento da importância desse processo para o domínio das cianobactérias em muitos mananciais subtropicais. Para isso, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

i) Analisar a heterogeneidade espacial (*e.g.* em compartimentos longitudinais e verticais) da fixação de N_2 em quatro reservatórios subtropicais e relacioná-la a características físicas, químicas e biológicas da água;

ii) Investigar a variabilidade temporal da fixação de N_2 nos quatro reservatórios em escala de tempo sazonal (*e.g.* em diferentes estações do ano);

iii) Verificar a influência das diferentes razões molares entre nitrogênio e fósforo sobre as taxas de fixação de N_2 de uma espécie de cianobactéria cultivada em meio de cultura em laboratório;

4 HIPÓTESES

Com base nos objetivos definidos, as seguintes hipóteses foram testadas, sendo as duas iniciais relativas aos experimentos *in situ* e as outras três, aos ensaios *in vitro*:

1 - Assim como em reservatórios de regiões temperadas, a taxa de fixação de nitrogênio atmosférico será maior na zona de transição dos reservatórios estudados, pois haverá, neste compartimento, uma combinação de fatores ambientais (*e.g.*maior disponibilidade de luz e nutrientes, tempo de retenção da água) que favorecerá o crescimento das cianobactérias fixadoras de N₂;

2 – A composição da comunidade de cianobactérias será determinante sobre os processos de fixação nas escalas sazonal (nas diferentes estações do ano), horizontal (entre as zonas) e vertical (nas diferentes profundidades da coluna d'água);

3 – As menores razões entre nitrogênio e fósforo (nas formas nitrogênio inorgânico dissolvido: fósforo inorgânico dissolvido, NID:PID) propiciarão o desenvolvimento de heterócitos na cepa de cianobactéria estudada e, consequentemente, estimularão maiores taxas de fixação;

4 - As maiores taxas relativas de fixação de N₂ ocorrerão durante a fase exponencial de crescimento da cianobactéria estudada, quando comparada com a fase estacionária, principalmente pelo fato de necessitarem da maior quantidade de nitrogênio para o ganho de biomassa;

5 – Sob uma mesma razão molar NID:PID, a maior disponibilidade absoluta de fósforo favorecerá o aumento nas taxas de fixação de nitrogênio, quando comparadas com as condições em que a concentração absoluta de nitrogênio é menor.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Estudos in situ

5.1.1 Área de estudo

Foram escolhidos quatro reservatórios localizados na região central do estado de São Paulo, sendo eles: Lobo, Santana, 29 e Teixeira (Figura 3). De acordo com a Lei Estadual n. 9.034 de 27 de dezembro de 1994 (São Paulo, 1994), os reservatórios do Lobo e Santana estão inseridos na Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, que corresponde à 13^{a} Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI-13), enquanto que os reservatórios 29 e Teixeira pertencem à Bacia Hidrográfica Mogi-Guaçu (UGRHI-09). O clima dessas duas UGRHIs se enquadra nas zonas *Cwa* (subtropical de altitude) e *Aw* (tropical chuvoso), segundo a classificação de Köppen-Geiger (CEPAGRI, 2018). No caso dos quatro reservatórios do presente estudo, todos estão inseridos na zona *Cwa*, que apresenta verão quente chuvoso (de dezembro a fevereiro) e um inverno seco (de junho a agosto). As principais características desse tipo climático são a precipitação do mês mais chuvoso (10 vezes maior que a do mês mais seco) e a temperatura média do mês mais quente (sempre superior a 22° C) (Peel; Finlayson; MacMahon, 2007).

Os quatro reservatórios estão localizados próximos à cidade de São Carlos/SP (entre as coordenadas 21°30' - 22°30'S; 47°30' - 48°30'O), dentro de um raio aproximado de 20 km (Figura 3), em áreas limítrofes com outros municípios (Brotas, Descalvado e Itirapina/SP). Com relação ao uso e ocupação do solo, em todos os casos, os reservatórios estão inseridos nas zonas rurais de seus respectivos municípios, com categorias de uso variando desde Áreas de Proteção Ambiental (APA) até Zonas Multifuncionais Rurais (ZMR) (São Paulo, 1983; São Carlos, 2016).

Figura 3 – Reservatórios estudados localizados próximos à cidade de São Carlos/SP. Os reservatórios 1 (Lobo) e 2 (Santana) estão inseridos na bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu (UGRHI-13), enquanto os de número 3 (29) e 4 (Teixeira) integram a bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu (UGRHI-09)



Fonte: Autoria de Thiago Machado do Pinho (ArcMap 10.2/Arcgis[®]).

- Reservatório do Lobo

Também conhecido como Broa ou represa de Itirapina, está localizado entre os municípios de Brotas (margem esquerda) e Itirapina (margem direita) (Figura 4). Ele é integrante da bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu, situado na região centro-leste de SP (em $22^{\circ}10'06"$ S; $47^{\circ}54'11"$ O, a 710 m acima do nível do mar) (Dos Santos, 2003). Com um espelho d'água de aproximadamente 6,8 km², profundidade média de 3,0 m (máxima de 12,0 m), volume de 22 x 10^{6} m³ e tempo médio de residência da água de 20 dias (Calijuri; Tundisi, 1990), o reservatório é considerado o de maiores dimensões entre os incluídos no presente estudo.

Esse reservatório foi construído em 1936 com o objetivo de gerar energia elétrica às indústrias emergentes e comunidades locais por meio da Usina Hidrelétrica (UHE) do Lobo (Periotto; Tundisi, 2013). Atualmente, a UHE do Lobo passou a ser classificada como Central Geradora Hidrelétrica (CGH) e está sob concessão da companhia Aratu Geração S.A., produzindo em média 1,1 MW (ANEEL, 2018) e tendo suas águas também destinadas aos demais usos, como recreação, pesca e lazer (Periotto; Tundisi, 2013).

O Lobo é formado pelo represamento do ribeirão do Lobo e do rio Itaqueri (Figura 4), que contribuem com 80% do volume de água do reservatório (Queiroz, 2000). Além destes, o reservatório também é abastecido pelas águas de outros afluentes de menor porte, como os córregos: Carvão, Estiva, do Geraldo e Perdizes, que juntos compõem seis sub-bacias hidrográficas com aproximadamente 227 km² de área de drenagem (Pereira, 2013; Periotto; Tundisi, 2013). Após as águas passarem pelas turbinas e vertedouros da barragem da CGH, estas contribuem para a formação do rio Jacaré-Guaçu.

Apesar do reservatório do Lobo pertencer à APA Corumbataí-Botucatu-Tejupá, de acordo com o Decreto Estadual n. 20.960, de 08 de junho de 1983 (São Paulo, 1983), sua bacia hidrográfica tem sofrido intenso processo de degradação, principalmente pela urbanização desordenada do seu entorno. A vegetação predominante original era composta por diferentes fisionomias do cerrado (*e.g.* cerrado *strictu sensu*, cerradão, campo sujo) (Pulitano, 1998 *apud* Queiroz, 2000), que sofreu aproximadamente 70% de supressão (Pereira, 2013) devido ao desenvolvimento socioeconômico regional. A bacia do reservatório é caracterizada por apresentar, ainda: loteamentos residenciais e turísticos, incluindo o Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) da USP/São Carlos; áreas agrícolas para monoculturas anuais (*e.g.* cana-de-açúcar) e perenes (*e.g.* laranja); pastagens (para

criação de gado); e áreas reflorestadas com uso dos gêneros exóticos *Eucalyptus* e *Pinus* (Pulitano, 1998 *apud* Queiroz, 2000) (Figura 4).

Figura 4 – Reservatório do Lobo (municípios de Brotas - margem oeste; de Itirapina - margem leste) com seus principais tributários (indicados pelas setas) e diferentes áreas de uso e ocupação do solo. (Lo – ribeirão do Lobo; It – rio Itaqueri; C_a – cultura anual; CE – cerrado; C_p – cultura perene; C_{usp} – Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CHREA/USP); R – reflorestamento; U_r – sob urbanização; \blacktriangle - barragem)



Fonte: Adaptado de GoogleEarth[®] (Imagem acessada em 26 de julho de 2018).

Vale evidenciar que o Lobo é provavelmente o reservatório mais estudado do Brasil, com produção científica datada dos anos 1970, principalmente pela proximidade com o CHREA/USP e a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (Campregher; Martins, 2017). Foram diversas as áreas do conhecimento que tiveram o reservatório como objeto de estudo (*e.g.* ecologia, sociologia, economia, matemática, instrumentação) (Periotto; Tundisi, 2013 Campregher; Martins, 2017).

- Reservatório Santana

O reservatório Santana foi inaugurado em 1951, a partir da retenção das águas do rio Jacaré-Guaçu, com objetivo de produzir energia elétrica (Mioto *et al.*, 2004). O reservatório está localizado dentro do perímetro municipal de São Carlos/SP (22°04'27"S; 48°02'41"O, a 607 m do nível do mar), com sua margem esquerda na divisa com o município de Brotas/SP (São Carlos, 2016) (Figura 5). Tomando-se o rio Jacaré-Guaçu como referência, a Pequena Central Hidrelétrica (PCH) Santana está aproximadamente a 15 km do reservatório do Lobo, e possui produção média assegurada de 2,6 MW (ANEEL, 2018).

De acordo com Feliciano (1999), além do próprio rio Jacaré-Guaçu, o reservatório é alimentado com as águas do córrego da Rasteira/Santa Joana (com 13,6 km de extensão), limítrofe entre os municípios de Ribeirão Bonito e Brotas/SP, e por mais dois corpos d'água que não são denominados nas cartas topográficas. Em conjunto, todos esses tributários totalizam uma área de drenagem de aproximadamente 768 km², referente à bacia hidrográfica do reservatório Santana (ANA, 2018). O reservatório possui uma área superficial de aproximadamente 0,5 km², volume de 16 x 10^5 m³ de água e profundidade média de 3,8 m (dados não publicados).

O perímetro do reservatório apresenta vegetação típica de mata ciliar e parcelas de floresta estacional semidecidual, onde está localizada a Unidade de Conservação (UC) Estação Ecológica Mata do Jacaré (São Paulo, 2012) (Figura 5), criada pelos Decretos n. 38.957, de agosto de 1961 e n. 26.890, de 12 de março de 1987 (Feliciano, 1999). Embora haja uma UC associada ao reservatório, o entorno desta está ocupado pela agropecuária, principalmente por culturas de cana-de-açúcar (ao sul, na Fazenda Santana e ao norte, na Fazenda Santo Antônio), que parecem suprimir a mata ciliar próxima à barragem (Figura 5). A montante do reservatório existe uma área alagada formada pelo rio Jacaré-Guaçu, que é caracterizada por bancos de macrófitas aquáticas (*e.g. Cabomba* sp., *Myriophyllum* sp.).

Figura 5 – Reservatório Santana (municípios de Brotas/SP - margem sul; de São Carlos - margem norte) com seu principal tributário (indicado pela seta) e diferentes áreas de uso e ocupação do solo. (JG – rio Jacaré-Guaçu; M_a – área com bancos de macrófitas; C_a – cultura anual; UC – Unidade de Conservação Estação Ecológica Mata do Jacaré; \blacktriangle - barragem)



Fonte: Adaptado de GoogleEarth[®] (Imagem acessada em 26 de julho de 2018).

- Reservatório do 29

O reservatório 29, localizado no município de São Carlos/SP (21°53'40"S; 47°48'53"O, a 687 m acima do nível do mar), pertence à sub-bacia hidrográfica do Ribeirão dos Negros, que é um afluente da margem esquerda do rio do Quilombo (tributário do rio Mogi Guaçu – UGRHI-09). O Ribeirão dos Negros é o principal formador do reservatório (Figura 6), que também recebe as águas dos córregos da Lagoa (Primavesi *et al.*, 1999), da Jararaca e outro ainda não denominado (São Carlos, 2016).

Não foi encontrada na literatura a data de construção desse reservatório, porém, Mioto *et al.* (2004) descrevem que ele, em conjunto com os reservatórios da Alegria, Barra e do Teixeira, formam um sistema de acúmulo de água para a geração de energia elétrica na PCH Capão Preto, que foi inaugurada em 1911. Segundo os próprios autores, o reservatório 29 serve como um regulador de vazão para essa PCH. Atualmente, o reservatório também é utilizado como balneário turístico e para atividades pesqueiras.

Figura 6 – Reservatório 29 (município de São Carlos/SP) com seus principais tributários (indicados pelas setas) e diferentes áreas de uso e ocupação do solo (Ne – ribeirão dos Negros; La – córrego da Lagoa; C_a – cultura anual; RL – reserva legal; C_p – cultura perene; F_F – fragmento florestal; U_r – sob urbanização; → barragem)



Fonte: Adaptado de GoogleEarth[®] (Imagem acessada em 26 de julho de 2018).

O reservatório possui aproximadamente 0,9 km² de área alagada, 3,0 m de profundidade média e um volume de água aproximado de 20 x 10^5 m³ (dados não publicados). A área de sua bacia hidrográfica é de 168 km², sendo que 75% representam área agropastoril e 20% é referente à vegetação nativa remanescente (dados não publicados).

Ao sudoeste do reservatório se encontra a Reserva Legal da Embrapa Pecuária Sudeste, localizada dentro da Fazenda Canchim. A vegetação original desse fragmento de cerrado é composta por suas fisionomias *strictu sensu* e cerradão, floresta estacional semidecídua, além da mata de galeria que ocorre ao longo do córrego da Lagoa até o seu deságue no reservatório 29 (Primavesi *et al.*, 1999; Manica; Telles; Dias, 2008). Além da reserva, o entorno do reservatório também é ocupado por plantações de cultivos anuais (*e.g.* cana-de-açúcar) (Mioto *et al.*, 2004) e perenes (*e.g.* citros e café) (Figura 6).

- Reservatório do Teixeira

O reservatório do Teixeira, conhecido oficialmente como Bom Retiro, está na divisa dos municípios de São Carlos (margem oeste) e Descalvado (margem leste) (21°53'54"S; 47°46'30"O, a 685 m acima do nível do mar). O reservatório foi construído no rio do Quilombo, em cascata com o reservatório da Barra (a jusante), para produção de energia elétrica na PCH Capão Preto. Como já mencionado, esses dois reservatórios possuem conexões à jusante com as vazões efluentes dos reservatórios 29 e Alegria, que direcionam o fluxo de água até a usina (Figura 7). A junção desses dois sistemas hidráulicos independentes (29-Alegria e Teixeira-Barra) permite com que a PCH gere 2,3 MW de energia assegurada (ANEEL, 2018).

A PCH Capão Preto teve seu início de operação datado em 1911, o que a torna a segunda usina construída em São Carlos. O reservatório é formado pelo represamento do rio do Quilombo e pelo Ribeirão da Capivara, tributário da margem leste. A bacia hidrográfica do Quilombo é ocupada por pastagens e monoculturas de laranja e cana-de-açúcar (Figura 8), sendo estas as principais ações antrópicas da região que podem causar a poluição dos cursos d'água (Apone; Oliveira; Garavello, 2008). É importante destacar que, ao leste e oeste do reservatório existem dois fragmentos do cerrado com características florestais (*e.g.* cerradão, cerrado denso) (Figura 8). Atualmente, as margens arenosas do reservatório também são utilizadas para lazer (Mioto *et al.*, 2004) e outros usos locais, destacando-se a pesca amadora.

A bacia hidrográfica do reservatório do Teixeira é a menor, comparada com as demais estudadas no presente trabalho, com área máxima de 78 km². O reservatório possui aproximadamente 25 x 10^5 m³ de água e 1,0 km² de área superficial. A profundidade média é de 3,0 m (dados não publicados). Esse reservatório é o que apresenta a menor área de vegetação nativa (16%), sendo que a área utilizada para agricultura (73%) é a mais significativa (dados não publicados).

Dentre os quatro reservatórios abordados no presente estudo, o 29 e Teixeira são os que possuem menos informações e estudos disponibilizados para o público, seguidos pelo Santana (Tabela 1). Segundo o Plano Diretor de São Carlos, existe a intenção por parte do município de utilizar esses corpos d'água para a captação de água (São Carlos, 2016), o que aumenta a demanda de estudos ambientais nas bacias hidrográficas desses reservatórios.

Figura 7 – Esquema da distribuição dos reservatórios da Alegria, do 29, da Barra e do Teixeira como um sistema de armazenamento de água para geração de energia na PCH Capão Preto, localizada na bacia hidrográfica do rio do Quilombo (UGRHI -09 – Mogi-Guaçu)



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Reservatório do Teixeira (municípios de São Carlos/SP - margem oeste; de Descalvado - margem leste) com seus principais tributários (indicados pelas setas) e diferentes áreas de uso e ocupação do solo (Legenda: Qu – rio do Quilombo; Ca – ribeirão da Capivara; C_a – cultura anual; F_F – fragmento florestal; BA– reservatório da Barra; \blacktriangle - barragem)



Fonte: Adaptado de GoogleEarth® (Imagem acessada em 26 de julho de 2018).

	UGRHI-13 (Jacaré-Tietê)		UGRHI-09 (Mogi-Guaçu)	
	Lobo ^[1, 2, 5]	Santana ^[3, 4, 5]	29 ^[4, 5]	Teixeira ^[4, 5]
Área de drenagem (km²)	227	768	168	78
Área superficial (km²)	6,8	0,5	0,9	1,0
Profundidade média (m)	3,0	3,8	3,0	3,0
Perímetro (km)	21,0	7,3	6,4	4,9
Volume (x 10 ⁵ m ³)	220	16	20	25
Tempo médio de residência (dias)	20	2	10	25
Altitude (m)	710	607	687	685
Potência nominal (MW)	1,2	4,6		4,3*
Garantia física média (MW)	1,1	2,6		2,3*
Principal curso d'água represado	Rib. do Lobo	Rio Jacaré- Guaçu	Rib. dos Negros	Rio do Quilombo
Ano de inauguração	1936	1951	1911	1911
Município	Brotas/Itirapina	Brotas/São Carlos	São Carlos	São Carlos/Descalvado

Tabela 1 – Tabela síntese de informações dos quatro reservatórios abordados no presente estudo. (Legenda: * usina compartilhada)

Fonte: ^[1]Calijuri e Tundisi (1990); ^[2]Periotto e Tundisi (2013); ^[3]Mioto *et al.* (2004); ^[4]ANA (2018); ^[5]ANEEL (2018).

É de fundamental importância a geração de dados desses ecossistemas, para servirem de referência básica a outros estudos e projetos, uma vez que existe o potencial desses três reservatórios servirem para abastecimento público no futuro, podendo alterar a qualidade ambiental dos mesmos.

- Reservatórios Barra Bonita e Itupararanga

Com o objetivo de obter maior variabilidade entre os estados tróficos dos reservatórios para identificar possíveis correlações e *tresholds* (isto é, limiares) relacionados às taxas de fixação de nitrogênio, o estudo de Marafão (2016) foi utilizado como base de dados adicionais no que se refere às informações dos reservatórios de Barra Bonita e Itupararanga, também localizados no estado de SP. Todas as variáveis físicas, químicas e biológicas da água desses ambientes foram amostradas e analisadas exatamente da mesma forma que no presente trabalho, inclusive a metodologia para determinação das taxas de fixação de nitrogênio.

5.1.2 Variáveis climatológicas

Os dados de pluviometria (mm), temperatura do ar (°C), velocidade (m s⁻¹) e direção dos ventos (°) do período estudado foram obtidos por meio de estações meteorológicas automáticas. Para os reservatórios do Lobo e Santana, foi utilizada como referência a estação climatológica do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA) da USP/São Carlos, localizada às margens do reservatório do Lobo (coordenadas: 22°10'10"S; 47°53'56"O, 730 m de altitude). Já para os reservatórios 29 e Teixeira, os dados foram obtidos por meio da estação automática da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Sudeste (coordenadas: 21°57'42"S; 47°50'28"O, 860 m de altitude), que dista aproximadamente 8 km de ambos os reservatórios.

5.1.3 Amostragem

Foram escolhidos três pontos de amostragem em cada um dos reservatórios do Lobo, Santana e 29 e dois no Teixeira, todos situados na região limnética (Tabela 2, Figura 9). Em teoria, os pontos compreenderam as zonas de rio (ZR), de transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios (Figuras 10 e 11), para verificar a influência desses compartimentos sobre qualidade d'água e os experimentos *in situ*. A justificativa da escolha de dois pontos amostrais no reservatório Teixeira se fez pelo fato deste possui o menor comprimento, quando comparado aos demais. Desta forma, com intuito de abranger maior diferença longitudinal entre os pontos e suas diferentes características, foram apenas escolhidos os pontos extremos, um próximo à barragem e outro próximo ao rio formador principal.

Reservatórios	Zona de Rio (ZR)	Zona de Transição (ZT)	Zona Lacustre (ZL)
Lobo	22°12'53,00"S	22°11'31,00"S	22°10'12"S
	47°52'39,00"O	47°53'03,00"O	47°54'14"O
Santana	22°04'58,00"S	22°04'37,66"S	22°04'29,68"S
	48°01'09,00"O	48°01'34,98"O	48°02'33,66"O
29	21°54'41,56"S	21°54'10,00"S	21°53'43,00"S
	47°48'51,97"O	47°48'44,00"O	47°48'58,00"O
Teixeira	21°54'40,00"S 47°45'53,00"O	-	21°53'57,00"S 47°46'23,00"O

Tabela 2 – Coordenadas geográficas (em graus, minutos e segundos) dos pontos de amostragem em cada reservatório estudado. (Legenda: - ausência de ponto amostral)

Além da distribuição horizontal dos pontos, também foram determinadas duas profundidades na zona eufótica em cada ponto amostral, conforme o perfil de Radiação Solar Fotossinteticamente Ativa (RSFA), determinado com auxílio de um radiômetro (LI-193SA/LI-COR[®], faixa entre 400 e 700 nm) acoplado a um *datalogger* (LI-1400/LI-COR[®]). As duas profundidades representam camadas da coluna d'água em que não ocorre fotoinibição da produtividade primária pelo fitoplâncton (50% da RSFA) e que ainda estejam dentro da zona eufótica, porém com baixa luminosidade (10% da RSFA) (Gianesella-Galvão, 1985; Whittington *et al.*, 2000).

Figura 9 – Reservatórios estudados com os respectivos pontos de amostragem definidos nas zonas de rio (ZR), de transição (ZT) e lacustre (ZL)



Fonte: Autoria própria.

As coletas foram realizadas entre ago/2017 e mai/2018, trimestralmente, a fim de abranger as quatro estações climáticas e suas variações naturais, no período da manhã compreendido entre as 07h00min e 11h00min. Em campo, a temperatura do ar (T_{ar} , °C) foi obtida utilizando um termômetro de mercúrio e a condição meteorológica foi anotada no momento de cada coleta. Destaca-se que em maio/2017 foi realizada uma coleta preliminar em cada reservatório a fim de verificar a ocorrência de cianobactérias potencialmente fixadoras de N₂ nesses ambientes.



Figura 10 - Registros fotográficos das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do Lobo e Santana

Fonte: Autoria própria (fotografias obtidas entre agosto de 2017 e julho de 2018).



Figura 11 - Registros fotográficos das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do 29 e Teixeira

Fonte: Autoria própria (fotografias obtidas entre agosto de 2017 e julho de 2018).

5.1.4 Variáveis obtidas in situ

A profundidade máxima (Z_{max}) da coluna d'água foi mensurada utilizando um cabo graduado preso a uma âncora. A transparência da água foi determinada por meio do disco de Secchi (DS, m), a partir da média entre a profundidade de desaparecimento e aparecimento do disco na coluna d'água. A extensão da zona eufótica (Z_{eu}) foi calculada a partir do coeficiente vertical da atenuação da radiação (Wetzel; Likens, 1990), considerando a intensidade luminosa de 100% até 1%.

Os perfis verticais das variáveis físicas e químicas da água como temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e pH foram determinados *in situ* por meio de sonda multiparamétrica (HI9829/Hanna[®]). As mensurações foram realizadas a cada 0,1 m até o primeiro 1,0 m e a cada 0,5 m até meio metro antes da profundidade máxima, para possibilitar a identificação de estratificações superficiais e evitar o choque da sonda com o sedimento, respectivamente.

O coeficiente de variação (CV) foi utilizado para analisar a variabilidade da temperatura na coluna da água. Como a resolução do perfil vertical da temperatura e o CV podem não permitir a determinação da profundidade da termoclina, para melhor análise da estratificação, a resistência térmica relativa (RTR) (Wetzel; Likens, 1990) também foi calculada (Equação 1). A RTR foi estimada para cada intervalo de medição da temperatura/profundidade. Os valores da densidade da água doce em dada temperatura (com precisão de 0,1 °C) foram retirados de Hodgman *et al.* (1962).

$$RTR = \frac{(\rho_2 - \rho_1) \cdot (10^6)}{8}$$
(1)

Em que:

 ρ_2 = densidade da água (g cm⁻³) em uma dada temperatura na profundidade inferior subsequente a ρ_1 (m);

 ρ_1 = densidade da água (g cm⁻³) em uma dada temperatura na profundidade superior (m); RTR = resistência térmica relativa.

De acordo com Reynolds (1984), a zona de mistura (Z_{mix}) pode ser considerada como a camada superficial da coluna d'água na qual a diferença da densidade entre os estratos é menor que 0,0002 g cm⁻³ m⁻¹ dentro de uma gradiente. Isso significa que quando a diferença for > 0,0002 g cm⁻³ m⁻¹, ocorre estratificação da coluna d'água nesse ponto. Ao transformar essa diferença de 0,0002 g cm⁻³ m⁻¹ para RTR, obtém-se um valor igual a 25,0. Desta forma, foi considerado no presente trabalho que a Z_{mix} se estende até onde a RTR for < 25,0.

Com o auxílio da garrafa de Van Dorn, amostras de água foram coletadas nas duas profundidades (referentes a 50% e 10% da RSFA) para a análise de nutrientes (séries nitrogenada e fosfatada), sólidos suspensos totais e Chl-*a*. As amostras foram armazenadas em bombonas de polietileno (5 L) e acondicionadas em caixas de isopor com gelo durante o transporte até o Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE) da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo (EESC/USP), visando à preservação das amostras. Todas as análises físicas e químicas da água foram realizadas neste mesmo laboratório, imediatamente após a coleta das amostras, utilizando-se de tréplicas analíticas para obtenção de valores médios e desvios padrões.

5.1.5 Nutrientes totais e dissolvidos

Em laboratório, parte das amostras de água foi filtrada (membranas com 0,6 μ m de porosidade, GF-3/M&N[®]) para a análise dos nutrientes dissolvidos, enquanto parte da água bruta foi utilizada para análise de fósforo total (PT) e nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (Tabela 3). Para os métodos espectrofotométricos utilizou-se um espectrofotômetro (DR4000V/Hach[®]), enquanto o método do NTK foi desenvolvido em um digestor (K-438/Büchi[®]) e destilador (K-370/Büchi[®]) automatizados. A referência de todos os métodos utilizados foi o Standard Methods (APHA; AWWA; WEF, 2012), exceto para o NH₄⁺ (Koroleff, 1976) e o NO₂⁻ (Mackereth; Heron; Talling, 1978).

O limite de detecção (L.D.) e o limite de quantificação (L.Q.) foram calculados em laboratório de acordo com as Equações 2 e 3 (Harris, 2011), respectivamente, para cada método utilizado.

$$L.D. = \frac{3 \cdot S_b}{\beta}$$
(2)

$$L.Q. = \frac{10 \cdot S_b}{\beta}$$
(3)

Em que:

 S_b = desvio-padrão analítico da leitura da absorbância de um número *n* de brancos;

 β = coeficiente angular da curva de calibração;

L.D. = limite de detecção (concentração mínima detectável);

L.Q. = limite de quantificação (concentração mínima quantificável com exatidão).

Variável Analisada Unidade		Método		L.Q.
Nitrito (N-NO ₂ ⁻)	μg L ⁻¹	Espectrofotométrico	1,0	3,5
Nitrato (N-NO ₃ ⁻)	$\mu g L^{-1}$	Espectrofotométrico (4500-NO ₃ ⁻ B)	35,0	105,0
Amônio (N-NH4 ⁺)	$\mu g L^{-1}$	Espectrofotométrico	2,0	6,5
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	mg L ⁻¹	Digestão, Destilação e Titulação (4500- $N_{org} C$)	0,5	1,6
Fósforo Solúvel Reativo (PSR)	$\mu g L^{-1}$	Espectrofotométrico (4500-P E)	1,0	3,0
Fósforo Total (PT)	$\mu g L^{-1}$	Espectrofotométrico (4500-P B; 4500-P E)	2,0	6,5

Tabela 3 – Variáveis analisadas com suas respectivas unidades, métodos e limites de detecção (L.D.) e de quantificação (L.Q.) calculados em laboratório

O nitrogênio total (NT) foi estimado pela soma das concentrações de NTK, N-NO₃⁻ e N-NO₂⁻. Uma vez obtidas as concentrações de NT e fósforo total (PT), foi calculada a razão entre o nitrogênio e fósforo (NT:PT), a partir das massas molares dos elementos (N \approx 14 g mol⁻¹; P \approx 31 g mol⁻¹). Além da razão NT:PT, também foram calculadas as razões molares entre o nitrogênio inorgânico dissolvido (N-NO₃⁻ + N-NO₂⁻ + N-NH₄⁺) e o fósforo inorgânico dissolvido (PID) (NID:PID), sendo este último igual ao PSR, e entre o NID e PT (NID:PT).

5.1.6 Sólidos suspensos

Os sólidos suspensos totais (SST), e suas frações fixas (SSF) e voláteis (SSV), foram obtidos por meio de uma adaptação do método Gravimétrico (2540 D) e de Combustão (2540 E) descritos em APHA, AWWA e WEF (2012). O procedimento consistiu na filtração da amostra de água bruta utilizando membranas de fibra de vidro com 1,5 µm de porosidade (934AH/Whatman[®]) seguida por secagem em estufa (a 55°C até peso constante) e calcinação em mufla (a 550° até peso constante). As massas das membranas pré-filtração, após secagem e calcinação foram determinadas em balança analítica (AY220/Shimadzu[®]).

A adaptação consistiu na diminuição da temperatura de secagem original do APHA, AWWA e WEF (2012) (103-105°C) para 55°C. Essa alteração é justificada pelo fato dos reservatórios estudados terem apresentado baixas concentrações de SST, aumentando o erro por perda da fração volátil da matéria em temperaturas superiores a 100°C durante a secagem (APHA; AWWA; WEF, 2012). Deste modo, para evitar a perda de compostos voláteis, foi adotada a temperatura de secagem de 55°C até peso constante, como sugerido por Meyer (1996).

5.1.7 Clorofila-a

As concentrações de Chl-*a* (corrigida da feofitina) foram determinadas a partir da filtração das amostras em membranas de fibra de vidro com 0,6 μ m de porosidade (GF-3/M&N[®]), usando etanol 80% como solvente extrativo com choque térmico. A leitura em espectrofotômetro (DR4000V/Hach[®]) foi realizada nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm e os cálculos foram baseados em Nusch (1980) (modificado por NEN, 2006).

5.1.8 Variáveis biológicas da água

As amostras para análise quantitativa do fitoplâncton, obtidas nas duas profundidades (relativas a 50% e 10% da RSFA) com a garrafa de Van Dorn, foram fixadas em lugol acético a 1% (Sant'Anna *et al.*, 2006), armazenando alíquotas de 100 mL em frascos de vidro âmbar devidamente etiquetados para posterior contagem. Para análise qualitativa do fitoplâncton, foram coletadas amostras utilizando rede de plâncton (com 20 μ m de abertura de malha) mediante arraste vertical da coluna d'água. Parte da amostra foi mantida viva para triagem do material no mesmo dia da coleta, com objetivo de facilitar o reconhecimento de indivíduos livre-natantes e os movimentos celulares (*e.g.* pendular, "metabolia"). O restante foi posteriormente fixado com formaldeído (neutralizado com Na₂B₄O₇) na concentração final de 4% e armazenado em frascos de vidro previamente identificados.

O sistema de classificação basal adotado para as classes foi o de Round (1965), atualizado com base em sistemas mais recentes como o de Krienitz e Bock (2012), para Chlorophyta, e o Medlin (2016) para Bacillariophyta. Para a identificação dos gêneros, o trabalho principal utilizado foi o de Bicudo e Menezes (2017). Para as espécies, bibliografias específicas foram consultadas para cada grupo: Cyanobacteria (Komárek; Anagnostidis, 1998; 2005; Komárek, 2013); Chlorophyta (Komárek; Fott, 1983); Euglenophyceae (Araujo; Bicudo, 2018); Zygnemaphyceae (Bicudo; Azevedo; Castro, 2014; Bicudo; Schetty; Pinto, 2015; Bicudo; Samanez, 2016; Bicudo; Faustino; Godinho, 2018); Cryptophyceae (Castro; Bicudo, 2007); Dinophyceae (Bicudo, 2011; Cavalcante *et al.*, 2017); Coscinodiscophyceae (Bicudo, 2014; Bicudo, 2003; Rocha; Bicudo, 2008; Marquardt; Bicudo, 2014; Costa *et al.*, 2017; Morais *et al.*, 2018); e demais bibliografias especializadas para grupos menos frequentes. A análise taxonômica foi baseada nas características morfométricas de amostras populacionais (mínimo de 20 indivíduos), exceto as espécies raras.

A contagem dos organismos foi realizada segundo o método de Utermöhl (1958) e da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (CETESB, 2012), em microscópio óptico invertido (CK2/Olympus[®]) com aumento de 400x. O limite de campos a serem contados foi determinado por meio da estabilização da curva de espécies, interrompendo-se a contagem de campos quando atingido o número de 100 indivíduos da espécie dominante (precisão de \pm 20%; p < 0,05) ou 400 indivíduos totais (precisão de \pm 10%; p < 0,05) (Sant'Anna *et al.*, 2006), seguida pela ausência de novas espécies por sete campos consecutivos. O tempo de sedimentação das amostras nas câmaras atenderam aos critérios de Lund, Kipling e Le-Cren (1958). Quando espécies heterocitadas estavam presentes nas amostras, também foi observada a presença ou ausência de heterócitos por tricoma.

Com a finalidade de não subestimar a abundância relativa das espécies coloniais e filamentosas, a densidade fitoplanctônica foi convertida em biovolume (mm³ L⁻¹). A densidade (org mL⁻¹) estimada de cada indivíduo foi corrigida pelo biovolume específico correspondente, segundo os critérios de Hillebrand *et al.* (1999) e Fonseca *et al.* (2014), a partir dos biovolumes médios (n = 20) de cada espécie identificada.

As espécies dominantes e abundantes foram determinadas segundo os critérios de Lobo e Leighton (1986). Os autores definem como espécies dominantes aquelas cujo biovolume supere 50% do biovolume total da amostra. Já os abundantes, são aqueles que apresentarem valores de biovolume acima do valor médio, que é calculado a partir do biovolume total dividido pelo número de espécies da amostra.

5.1.9 Taxa de fixação biológica de nitrogênio - Método do traçador ¹⁵N₂

Para determinar a taxa volumétrica de fixação de nitrogênio atmosférico, foi utilizado o método direto com um traçador (isótopo $^{15}N_2$) (Bergersen, 1980). Esse método consiste basicamente em adicionar $^{15}N_2$ nas amostras de água para, depois de determinados períodos de tempo, estimar a quantidade de ^{15}N que passou a compor a biomassa fitoplanctônica (nitrogênio orgânico particulado - NOP), como resultado do processo de fixação biológica.

Para estimar a taxa de fixação de N₂ *in situ*, amostras de água das duas profundidades foram obtidas com a garrafa de Van Dorn para completar os frascos de vidro (Wheaton[®]) com aproximadamente 300 mL, posteriormente selados para evitar contato com a atmosfera. Em seguida, foi injetado 0,5 mL de ¹⁵N₂ (99% at. %¹⁵N, Cambridge Isotopes[®]) em cada frasco (Figura 12) com a simultânea retirada de 0,5 mL de amostra, com uma agulha, para equalizar

a pressão dentro do frasco. Posteriormente, foi realizada a homogeneização para promover a completa e efetiva dissolução do gás na solução.



Figura 12 – Esquema da incubação das amostras nas duas profundidades (A) e os procedimentos para análise da taxa de fixação de N_2 (B). Experimento *in situ*

Fonte: Autoria própria.

Os frascos contendo ¹⁵N₂ foram incubados nas duas profundidades (relativas a 50% e 10% da RSFA) em todos os pontos amostrais de cada reservatório (Figura 12A). As incubações foram feitas com duas réplicas mais o frasco controle ("branco"). Após o período de 24 h incubação (T_{24h}), as amostras foram recolhidas e filtradas a vácuo (pressão de sucção ≤ 25 cmHg) utilizando filtros de fibra de vidro (GF-3/M&N[®] de 25 mm de diâmetro, com 0,6 µm de porosidade) previamente calcinados (550°C por 30 min). Posteriormente, estes foram armazenados em freezer a -20 °C (Figura 12B). Nos frascos controle (T_{0h}), as amostras foram filtradas imediatamente após a injeção de ¹⁵N₂, para estimar a concentração natural de ¹⁵N₂ na água dos quatro reservatórios, evitando que o resultado das taxas fosse superestimado.

No Laboratório BIOTACE, os filtros congelados foram colocados em estufa a 60 °C por 24 h e posteriormente envoltos individualmente em cápsulas de estanho (8 x 5 mm, Elemental Microanalysis[®]), para serem armazenados em local escuro e livre de umidade até serem analisados. A higienização das pinças de inox e do suporte de alumínio para o encapsulamento dos filtros foi feita utilizando etanol (70%) entre as amostras, evitando-se assim a contaminação cruzada.

A quantificação do nitrogênio particulado e a determinação da composição isotópica $({}^{15}N_2/{}^{14}N_2)$ foram realizadas em analisador elementar (CHN-111-/CarloErba[®]) acoplado a um espectrômetro de massa (DeltaPlus/ThermoScientific[®]), por meio de Espectrometria de Massa

de Razão Isotópica de Fluxo Contínuo (*CF-IRMS*) (Figura 12B). As análises foram feitas no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba/SP, em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira. A partir dos dados obtidos, as taxas de fixação absolutas (μ g-N L⁻¹ h⁻¹) e relativas (μ g-N μ g-Chl- a^{-1} h⁻¹) de N₂ foram calculadas de acordo com Montoya *et al.* (1996) (Equação 4).

$$TF = \frac{\binom{NOP}{V} \cdot (\%^{15}N_{A} - \%^{15}N_{B})}{(Cd - \%^{15}N_{B}) \cdot T}$$
(4)

Em que:

NOP = nitrogênio orgânico particulado (μg);

V = volume filtrado de amostra (L);

 $\%^{15}N_A$ = proporção de ¹⁵N em relação ao ¹⁴N no filtro com a amostra (atm %): $^{15}N/(^{15}N + ^{14}N)$;

 $\%^{15}N_B = \text{proporção de}^{15}N \text{ em relação ao}^{14}N \text{ no filtro controle (atm %): }^{15}N/(^{15}N + ^{14}N);$ Cd = relação (atm%) entre o $^{15}N_2$ adicionado (µmol L⁻¹) e o N₂ do ambiente (µmol L⁻¹): ($^{15}N_2 \times 100$)/($^{15}N_2 + N_2$);

T = tempo de incubação até o momento da filtração (h);

 $TF = taxa de fixação de N_2 (\mu g-N L^{-1} h^{-1}).$

5.1.10 Análise estatística

Com o objetivo de descrever os dados de forma qualitativa, foram calculados a média e desvio padrão, além de gráficos que foram elaborados para facilitar a visualização e interpretação dos resultados. Os softwares utilizados foram o Excel (versão 2010/Microsoft[®]) e o Origin (versão 9.5 2018/OriginLab Corporation[®]). A análise de variância (ANOVA) (Statistica, versão 6.0/Statsoft[®]) foi utilizada para verificar diferenças significativas nas variáveis da qualidade da água entre as profundidades amostradas (50% e 10% da RSFA), incluindo as taxas de fixação de N₂. Na ANOVA foram utilizados dados brutos.

O método *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi utilizado para determinação dos limiares (*thresholds*) ambientais que estimulam as taxas de fixação de N_2 nos reservatórios estudados. A análise ROC é frequentemente utilizada para descrever o desempenho de um classificador binário com base na área máxima sob a curva (AUC) para comparar a capacidade explicativa de diferentes características ambientais em relação à sua especificidade e sensibilidade (Morrison *et al.*, 2003). Este método também já foi explorado

em outros estudos relacionados ao fitoplâncton (*e.g.* Brody; Lozier; Dunne, 2013; Cunha; Dodds; Loiselle, 2018). Foram utilizados dados brutos não transformados para a estimativa dos limiares, o que permite a comparação com outros estudos.

No presente estudo, o fator binário utilizado foi a taxa de fixação de N₂, considerando sua presença (= 1) ou ausência (= 0) com base no limite de detecção do método utilizado. Neste caso, uma alta sensibilidade indica a probabilidade da fixação de N₂ ser detectada quando ela está realmente ocorrendo, enquanto que uma elevada especificidade permite descartar a ocorrência da fixação de N₂, quando de fato ela não ocorre, evitando-se assim os resultados falsos-negativos e falsos-positivos, respectivamente. Os limiares foram estimados com base em uma sensibilidade mínima de 0,750 e a maior especificidade. Todos os procedimentos estatísticos para a análise ROC foram realizados com o SPSS Statistics (versão 21/IBM Corp.[®]).

5.2 Estudos in vitro

Para alcançar os demais objetivos e testar as três últimas hipóteses do presente estudo, os experimentos com culturas laboratoriais foram necessários para entendimento da influência da disponibilidade de nutrientes (N e P) sobre as taxas de fixação de N_2 em condições mais controladas do que nos experimentos *in situ*.

O delineamento experimental foi divido em 6 fases (Figura 13), com o objetivo de organizar as etapas experimentais e utilizar das informações obtidas nas primeiras fases para orientar as etapas seguintes. Em suma, as Fases 1, 2, 3 e 4 foram utilizadas para aclimatação da cepa às condições experimentais e aumento do volume cultivado. A Fase 5 foi utilizada para determinar as curvas de crescimento e a assimilação de nutrientes associada. Por fim, na Fase 6 foram estimadas as taxas de fixação de N₂ na cianobactéria estudada.

5.2.1 Espécie utilizada

A cepa de cianobactéria utilizada nos experimentos *in vitro* corresponde à espécie *Dolichospermum flosaquae* (Brébisson *ex* Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Hoffmann & J. Komárek (Nostocaceae) (UTEX-2558) (cadastro no SISGEN: A8DB63A). Essa espécie é pertencente ao gênero *Dolichospermum*, que possui o potencial de fixar o N₂ por meio de heterócitos e é encontrado frequentemente em reservatórios brasileiros (Werner; Laughinghouse IV, 2009; Soares *et al.*, 2013 Oliveira, *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2020). Além disso, a espécie *D. flosaquae* também é amplamente utilizada em experimentos laboratoriais, o que permite e comparação dos dados encontrados com trabalhos que abordaram outros temas relacionados a essa espécie (Devlin *et al.*, 1976; Qian *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Osburn; Wagner; Scott, 2021).

Figura 13 – Esquema dos repiques para o aumento do volume (FASE 1 e FASE 2), aclimatação (FASE 3 e FASE 4), para construção das curvas de crescimento, determinação da fase exponencial (F_{exp}) e assimilação de NID e PID (FASE 5) da cepa de cianobactéria sob diferentes razões molares NID:PID (60, 23, 16, 10, 4 e 0). As razões molares foram obtidas em dois experimentos diferentes: Experimento A: variação de N, com P fixo; e Experimento B: variação de P, com N fixo. Na FASE 6 foi determinada a taxa de fixação de N₂



Fonte: Autoria própria.

- FASE 1

O meio de cultivo utilizado durante todo o experimento foi o ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964 modificado por Zagatto; Aragão, 1992) (Anexo A), comumente empregado para cultivar cianobactérias (Jacinavicius *et al.*, 2012). Como a cepa de *D. flosaquae* estava originalmente em meio de cultivo BG-11, foi necessária a aclimatação desta espécie para a realização dos experimentos. Para isso, alíquotas de 2 mL da cepa já cultivada no Laboratório BIOTACE foram transferidas com ponteiras esterilizadas para tubos de cultura (Pyrex[®]) contendo 18 mL do meio de cultivo ASM-1, com seis réplicas (FASE 1, Figura 13). Estes foram mantidos em incubadora (BOD 411D/Nova Ética[®]) adaptadas com fitas de LED (72 Q, 12 V) recobertas com tela sombrite de poliéster (abertura da malha de 150 x 200 μm), que reduziram a luminosidade original em 75%. Passados 5-7 dias após o inóculo, um novo repique foi feito transferindo alíquotas de 2 mL para seis tubos com 18 mL de meio ASM-1 autoclavado.

Para a aclimatação da espécie, os tubos foram mantidos na incubadora em temperatura de 24 ± 1 °C, com intensidade luminosa de $40 \pm 5 \mu$ mol-fótons m⁻² s⁻¹ e um fotoperíodo 12:12 h (claro-escuro), pelo período de 30 dias. A temperatura do ar e a intensidade luminosa incidente sobre os tubos foram monitoradas durante todas as fases do experimento com um sensor (UA-002-64/Inset-HOBO[®] e OdysseyTM – *Photosynthetic Active Radiation Logger*), com registros em intervalos de 30 min. A temperatura da água foi mensurada duas vezes ao dia (8h00min. e 16h00min.) utilizando um termômetro digital (Incoterm[®]) mergulhado em um tubo posicionado junto aos demais. A intensidade luminosa para a aclimatação e o repique das cepas foi escolhida com base nos valores utilizados no trabalho de Lee e Rhee (1999) com essa espécie, evitando assim uma possível limitação ou supersaturação luminosa (fotoinibição).

- FASE 2

Com o objetivo de aumentar o volume e continuar o processo de aclimatação das cepas, 20 mL de cada tubo de cultivo foram transferidos para seis frascos (Duran[®]) contendo 180 mL de meio esterilizado (FASE 2, Figura 13). Estes frascos foram mantidos na incubadora por mais 20 dias até o novo repique.

5.2.3 Aclimatação ao meio ASM-1 em diferentes razões molares

O meio ASM-1 possui uma razão molar NID:PID \approx 10:1, no qual as principais fontes de nitrogênio e de fósforo são o nitrato de sódio (NaNO₃) e o fosfato de potássio bibásico anidro (K₂HPO₄), respectivamente (Anexo A). De acordo com Redfield (1958) e Sterner *et al.* (2008), essa razão estaria abaixo do valor ideal para o fitoplâncton marinho (NID:PID \approx 16:1) e dulcícola (NID:PID \approx 23:1), respectivamente segundo os autores citados, tornando o nitrogênio o fator limitante para o crescimento das cianobactérias em cultivo. Para simplificação da terminologia utilizada durante o experimento, ao valor do denominador (concentração molar de PID) foi omitido. (*e.g.* razão molar NID:PID 60:1 = razão molar 60).

5.2.3.1 Situação A - Modificação da concentração de N

No experimento envolvendo a disponibilidade de nitrogênio, as massas de NaNO₃ para a preparação dos meios foram alteradas, com o objetivo de produzir meios com razões molares NID:PID ≈ 60 , 23, 16, 10, 4, e 0 (Anexo A). As razões NID:PID ≈ 0 , 4 e 10 são consideradas baixas para o fitoplâncton (Redfield,1958; Grayson *et al.*, 1997; Sterner *et al.*, 2008), presumindo assim que com essa alteração o nitrogênio também se tornaria o nutriente limitante para o crescimento das cianobactérias cultivadas. Por outro lado, a razão NID:PID \approx 60 estaria acima da situação de equilíbrio, tornando o fósforo como nutriente limitante. Desta forma, as concentrações teóricas de NID no meio para cada razão molar foram: (60) = 3.290 µg-N L⁻¹; (23) = 1.260 µg-N L⁻¹; (16) = 870 µg-N L⁻¹; (10) = 550 µg-N L⁻¹; (4) = 220 µg-N L⁻¹; (0) = 6 µg-N L⁻¹.

A concentração de PID foi inicialmente fixada em 120 μ g-P L⁻¹ nestes tratamentos, por representar um valor próximo às concentrações de PSR (~90 μ g-P L⁻¹) e de PT (~130 μ g-P L⁻¹) em lagos e reservatórios hipereutróficos (Qin *et al.*, 2019; Moutinho *et al.* 2021), evitando-se que a concentração de P fosse um fator limitante.

5.2.3.2 Situação B - Modificação da concentração de P

Para avaliar a influência da disponibilidade absoluta de fósforo sobre a fixação de nitrogênio, o volume adicionado da Solução Estoque B foi modificado, com o objetivo de produzir meios com as mesmas razões molares NID:PID \approx 60, 23, 16, 10, 4, e 0 (Anexo A), porém com diferentes concentrações de fósforo. Sendo assim, as concentrações teóricas de

PID no meio para cada razão molar foram: (60) = 20 μ g-P L⁻¹; (23) = 50 μ g-P L⁻¹; (16) = 75 μ g-P L⁻¹; (10) = 120 μ g-P L⁻¹; (4) = 300 μ g-P L⁻¹; (0) = 9.085 μ g-P L⁻¹.

Nestes tratamentos, a concentração de NID foi inicialmente fixada em 550 μ g-N L⁻¹. Esta concentração de NO₃⁻ é comumente encontrada em reservatórios meso-eutróficos (Moutinho *et al.*, 2021) e também não inibe o processo de formação de heterócitos em cianobactérias (Wang *et al.*, 2018), o que possibilitaria a ocorrência da fixação de N₂.

5.2.3.3 Aclimatação e aumento de volume em diferentes razões

- FASE 3

A partir dos frascos Duran[®] da FASE 2, alíquotas de 2 mL das cepas aclimatadas ao meio ASM-1 foram transferidas para tréplicas de tubos de cultivo contendo 18 mL dos meios em diferentes razões molares NID:PID (60, 23, 16, 10, 4 e 0) (FASE 3, Figura 13), na Situação A (modificação do N) e na Situação B (modificação do P). Estes foram mantidos nas mesmas condições anteriores de luminosidade e temperatura por 20 dias.

- FASE 4

Após o período de 20 dias, 20 mL de cada tubo foram transferidos para novos frascos contendo 180 mL de meio modificado para cada razão molar NID:PID, totalizando 200 mL de cultura para cada razão, em réplicas. Estes frascos foram mantidos por mais 20 dias nas mesmas condições anteriores. Após este período, para cada razão molar, um frasco foi utilizado para a construção da curva de crescimento e o outro foi mantido na incubadora para posteriormente servir de inóculo para a determinação das taxas de fixação. O repique do frasco mantido na incubadora foi realizado a cada 20 dias, nas mesmas condições nutricionais, até que estes fossem utilizados para o experimento da fixação de N₂.

5.2.4 Curvas de crescimento

- FASE 5

Com as culturas, não axênicas, aclimatadas em suas respectivas razões, condições de temperatura e luminosidade (FASE 4), inóculos de 2 mL dos frascos Duran[®] foram
transferidos para tubos de cultivo com 18 mL do meio com a respectiva razão molar. A densidade óptica (DO_{683}) (abs, $\lambda = 683$) do inóculo foi padronizada com um valor baixo ($DO_{683} = 0,100$), para que em todas as condições o início das curvas partisse da mesma concentração de cianobactérias ($DO_{683} = 0,010$), evitando-se também o efeito de auto sombreamento por excesso de células (Kovács; Présing; Vörös, 2016).

A partir destes tubos (n = 30, para cada condição), a curva de crescimento foi estabelecida em cada uma das razões molares, nas situações A e B (FASE 5, Figura 13). Para construção da curva, foi utilizado o método com amostras destrutivas, no qual a cada dia amostral as réplicas dos tubos de ensaio com as culturas tinham sua DO₆₈₃ lida e alíquotas utilizadas para determinação das variáveis: densidade de células (cél mL⁻¹) e concentração de Chl-*a* (μ g L⁻¹) (Nusch, 1980, modificado por NEN, 2006). Diariamente os tubos foram trocados de lugar dentro da incubadora (entre prateleiras) a fim de garantir maior equitabilidade na distribuição da luz e da temperatura, e invertidos (entre frente e fundo) para minimizar os efeitos da sobreposição. As amostragens foram feitas nos dias 0, 1, 2, 3, 5, 8, 11 e 14, nas mesmas condições de luz e temperatura dos repiques. As amostras para contagem foram fixadas com lugol acético (1%). A curva de crescimento foi plotada com cada um dos parâmetros normalizados para escala logarítmica de acordo com a Equação 5, em função do tempo de cultivo.

$$y = \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) \tag{5}$$

Em que:

y = dado normalizado em escala logarítmica;

ln = logaritmo natural;

X = parâmetro determinado no dia de interesse de cultivo;

 $X_0 = parâmetro determinado no dia 0 de cultivo.$

Para cada condição, a calibração da curva de crescimento foi feita correlacionando-se a DO₆₈₃ com a concentração de Chl-*a*, a fim de se utilizar desses dados para a posterior normalização das taxas de assimilação de nutrientes e das taxas de assimilação pela biomassa. A calibração individual em cada tratamento foi necessária para evitar a superestimação ou subestimação das concentrações de Chl-*a* no momento da normalização, caso fosse construída uma curva generalista. Isso porque menores concentrações de N podem resultar em menores teores de Chl-*a* por célula de algas (Zhao *et al.*, 2017). A taxa de crescimento (μ , d⁻¹) foi calculada com base na duração da fase exponencial de cada tratamento. A Equação 6 foi utilizada para a determinação de μ (Widdel, 2010).

$$\mu = \frac{\ln (\text{DO.f}) - \ln (\text{DO.i})}{\text{Tf} - \text{Ti}}$$
(6)

Em que:

 μ = taxa de crescimento (d⁻¹);

ln = logaritmo natural;

DO.f = densidade óptica mensurada no final da fase exponencial de crescimento;

DO.i = densidade óptica mensurada no início da fase exponencial de crescimento;

Tf = tempo final da fase exponencial (d);

Ti = tempo inicial da fase exponencial (d).

5.2.5 Delineamento experimental: assimilação de PID

As concentrações de NID e PID no meio de cultivo foram determinadas também durante a FASE 5, para verificar a influência das diferentes razões molares sobre o decaimento destes nutrientes e sua possível correlação com a fixação de nitrogênio. Nos mesmos dias amostrais para construção das curvas de crescimento, alíquotas filtradas foram utilizadas para determinação de NO_3^- (µg-N L⁻¹) e PSR (µg-P L⁻¹).

Os métodos para determinação de NO₃⁻ e PSR foram o 4500-NO₃⁻ B e 4500-P E, respectivamente (APHA; AWWA; WEF, 2012). Os L.D. e L.Q. foram calculados em laboratório para cada um dos nutrientes (NO₃⁻: L.D. = 17,0 µg-N L⁻¹, L.Q. = 55,0 µg-N L⁻¹; PSR: L.D. = 2,5 µg-P L⁻¹, L.Q. = 8,0 µg-P L⁻¹), de acordo com as Equações 2 e 3 (subitem 5.1.5). As taxas de assimilação de PSR foram calculadas com base na diferença entre as concentrações finais e iniciais em um determinado período de tempo, normalizadas pelas respectivas concentrações de Chl-*a* (µg-P µg-Chl-*a*⁻¹ h⁻¹).

5.2.6 Delineamento experimental: fixação de N2 sob diferentes razões molares

- FASE 6

Utilizando os inóculos já aclimatados e reservados na FASE 4, 20 mL de cada frasco foram transferidos para 180 mL de meio com sua respectiva razão e incubados nas mesmas condições de luz e temperatura. O pH foi medido no início e no final do experimento, utilizando um pHmetro de bancada (TEC-2mp/Tecnal[®]). A partir das curvas de crescimento (FASE 5), foi possível identificar o período da fase exponencial (F_{exp}) e da fase estacionária ($F_{plat\delta}$) em cada tratamento. Quando detectado o meio da F_{exp} da curva de crescimento (3° ao 6° dia) das culturas em cada razão molar, aproximadamente 60 mL destas foram transferidos para frascos posteriormente selados com um *crimper* sem a formação de bolhas (em triplicata) (Figura 14). Os frascos Duran[®] com volume de cultivo remanescente foram mantidos nas mesmas condições, para posterior análise da fixação de N₂ na fase estacionária de crescimento.

Após selar os frascos, estes receberam 1,0 mL de isótopo ¹⁵N₂ (traçador) (99% at. $\%^{15}$ N, Cambridge Isotopes[®]) e foram incubados novamente nas respectivas condições de temperatura e luminosidade (Figura 14). Os frascos selados foram retirados das incubadoras após 24 h. Em seguida, alíquotas foram utilizadas para a contagem de células, contagem de heterócitos, determinação de NO₃⁻ e PSR, e para a obtenção da biomassa a ser utilizada na análise do isótopo ¹⁵N, conforme o método descrito anteriormente na Figura 12B do item 5.1.9.

A partir dos frascos Duran[®] mantidos na incubadora com o volume remanescente, alíquotas de 60 mL das culturas foram utilizadas para quantificar a fixação de N₂ e a concentração de nutrientes, entre o 10° e 14° dia, durante a fase estacionária de crescimento. Os procedimentos de injeção de ¹⁵N₂, incubação e análises posteriores foram os mesmos citados anteriormente (Figura, 14). As taxas absolutas e relativas de fixação de N₂ foram calculadas com base na Equação 4, descrita no item 5.1.9.

As contagens para a densidade de células e de heterócitos nas fases exponencial e estacionária do crescimento foram realizadas em câmara de Fuchs-Rosenthal. Como *D. flosaquae* é uma espécie é filamentosa, a densidade de células (cél. mL⁻¹) foi estimada a partir da contagem dos tricomas (n = 400) (tricoma mL⁻¹) multiplicada pelo número médio de células por tricoma (Jacinavicius *et al.*, 2012). As contagens das células e dos heterócitos foram realizadas em microscópio óptico trinocular (BX51/Olympus[®]), com uma câmera fotográfica acoplada (Roper ScientificTM) e auxílio de um software (Image-Pro Plus 2010).

5.2.7 Análise estatística

Preliminarmente, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. A partir da observação de que os dados experimentais não possuem distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis (KW) (Kruskal; Wallis, 1952) foi aplicado para verificar a existência de diferenças significativas ou não nas taxas de fixação de N₂ para os diferentes tratamentos, entre as diferentes e as mesmas razões (*e.g.* razões 60-N e 60-P *versus* 4-N e 4-P; razão 0-N *versus* 0-P, respectivamente) e entre as fases exponencial e estacionária do crescimento. As diferenças significativas foram consideradas com nível de confiança de 95% (p < 0.05).

Os softwares utilizados para a presentação dos gráficos foram o Excel (versão 2010/Microsoft[®]) e o Origin (versão 9.5 2018/OriginLab Corporation[®]). O teste de KW foi aplicado por meio do software Statistica (versão 6.0/Statsoft[®]).

Figura 14 – Esquema da incubação das amostras nos experimentos para análise da influência das diferentes razões molares NID:PID (0, 4, 10, 16, 23 e 60), com modificação na concentração de nitrogênio (Situação A) e na concentração de fósforo (Situação B), sobre a fixação de N₂ (FASE 6) $\binom{60}{23}$ $\binom{(10)}{(10)}$ $\binom{(10)}{(4)}$ $\binom{(0)}{(10)}$



Fonte: Autoria própria.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimentos in situ

6.1.1 Variáveis climatológicas

Com base na série pluviométrica obtida entre os anos de 1980 e 2010 para o município de São Carlos, foi possível observar que os meses mais chuvosos se concentram na primavera e verão (de outubro a março), enquanto que o inverno (de junho a agosto) foi caracterizado pelo período de seca (INMET, 2021). Ao comparar a precipitação da série história com o período estudado, verificou-se que o presente trabalho foi desenvolvido dentro de um ano climático atípico para a região de São Carlos, devido ao menor volume de precipitação registrado.

Tanto a estação do CHREA/USP, que representa a bacia hidrográfica dos reservatórios do Lobo e Santana (Figura 15A), como a estação da Embrapa Pecuária Sudeste, próxima aos reservatórios 29 e Teixeira (Figura 15B), registraram maiores precipitações entre out/17 e mar/18. A principal diferença entre as duas regiões foi que, nos reservatórios do Lobo e Santana, o mês mais chuvoso foi jan/18 (281,5 mm), enquanto que na bacia hidrográfica do rio do Quilombo foi o mês de dez/17 (272,0 mm).

Para ambas as bacias hidrográficas, observou-se que a precipitação acumulada no mês de fev/18 foi menor do que o esperado (150,8 mm para o Lobo/Santana; 106,0 mm para o 29/Teixeira), quando comparada com a média das três últimas décadas (221,5 mm) (INMET, 2021). Além disso, vale destacar que o inverno foi extremamente seco na região que abrange os quatro reservatórios estudados, com a precipitação mínima de 0,0 mm registrada em jul/17 e máxima de 27,8 mm, referente ao mês de ago/17 (Figura 15A).

Com relação aos valores da temperatura do ar, em ambas as bacias hidrográficas as menores médias diárias foram registradas no mês de jul/17, com 12,7°C para os reservatórios do Lobo e Santana (Figura 15A) e 12,1°C para os reservatórios 29 e Teixeira (Figura 15B). As maiores temperaturas médias do ar nos quatro reservatórios ocorreram no mês de out/17, com registros de 27,2°C e 27,7°C nas estações próximas aos reservatórios do Lobo e Santana, e 29 e Teixeira, respectivamente.

Figura 15 – Precipitação acumulada mensal (mm) e temperatura média diária do ar (°C) das estações meteorológicas localizadas no CRHEA (A) e na Embrapa Pecuária Sudeste (B) próximas aos reservatórios do Lobo/Santana e 29/Teixeira, respectivamente. As setas vermelhas indicam os dias em que as coletas foram realizadas



Fonte: (A) CRHEA/USP; (B) Embrapa Pecuária Sudeste.

Entre os meses de jun/17 e mai/18, as velocidades médias dos ventos nos quatro reservatórios apresentaram tendências similares ao longo do tempo, com ventos mais fortes entre ago/17 e nov/17 (média máxima de 2,6 m s⁻¹), e com menores valores entre mar/18 e mai/18 (média mínima de 1,2 m s⁻¹) (Figura 16A). Percebe-se que na região que abrange os reservatórios do Lobo e Santana, os ventos tiveram maiores velocidades em comparação com a região dos reservatórios 29 e Teixeira.

González-Piana *et al.* (2018), ao estudarem um reservatório subtropical de maiores dimensões (área superficial de 1.070 km² e profundidade máxima de 32 m) do que os do presente estudo, observaram que velocidades do vento entre 2,2 e 7,8 m s⁻¹ foram capazes de misturar a coluna d'água e dissipar as cianobactérias que estavam anteriormente concentradas no epilímnio. Para o caso específico do reservatório do Lobo, Tundisi *et al.* (2004) já havia

identificado que velocidades do vento entre 1,4 e 2,8 m s⁻¹ resultantes de uma passagem de frente fria foram capazes de misturar completamente a coluna d'água desse reservatório.

As velocidades médias do vento incidente nas áreas dos reservatórios do Lobo, Santana (1,2-2,0 m s⁻¹), 29 e Teixeira (1,7-2,7 m s⁻¹) foram menores que as reportadas por González-Piana *et al.* (2018). No entanto, o fato dos reservatórios do presente estudo serem muito mais rasos provavelmente favoreceu a menor estabilidade da coluna d'água, o que facilitou a sua mistura completa durante a maior parte do ano, mesmo com intensidades menores de vento. Além disso, a falta de vegetação no entorno dos reservatórios (29 e Teixeira) também favorece a ação dos ventos, uma vez que o relevo da região é constituído por planícies.

Com relação à direção dos ventos, também foi observado um padrão similar entre as duas bacias hidrográficas que abrangem os quatro reservatórios (Figura 16B). Porém, foi observado que a direção predominante dos ventos nos reservatórios do Lobo e Santana foi ao sentido sudoeste (SO, entre 180° e 270°), enquanto que nos reservatórios 29 e Teixeira, o sentido foi predominante ao sudeste (SE, entre 90° e 180°).

Figura 16 – Velocidade média (m.s-1) (A) e direção predominante (°) do vento (B) entre junho/2017 e maio/2018. As setas indicam os meses em que as coletas foram realizadas. Legenda da rosa dos ventos (C): N – norte; NE – nordeste; L – leste; SE – sudeste; S – sul



Fonte: CRHEA/USP (Lobo/Santana); Embrapa Pecuária Sudeste (29/Teixeira).

6.1.2 Estrutura física e química da coluna d'água

Em todos os reservatórios analisados, a Z_{max} aumentou no sentido da ZR para a ZL (Figura 3), como o esperado pelo modelo de Thornton, Kimmel e Payne (1990), sendo que o Santana foi o que apresentou maiores diferenças entre os pontos amostrais, com as profundidades variando de 2,0 m na ZR até 10,5 m na ZL (Figura 17B). O reservatório 29 foi o sistema mais raso estudado, com profundidade mínima de 1,9 m e máxima de 4,9 m nos pontos amostrais (Figura 17C). Essas características permitiram classificar esses ecossistemas como reservatórios rasos (profundidade < 30 m) (Straškraba, 1993 *apud* Tundisi *et al.*, 2004).

As profundidades de incubação representadas por 50% e 10% da RSFA nos reservatórios do Lobo e Santana foram próximas entre si, com valores entre 0,3 e 0,4 m para 50% da RSFA e entre 1,2 e 1,3 m para 10% da RSFA (Figura 17), o que resultou em uma amplitude média de 0,9 m entre as profundidades amostradas. Por outro lado, os reservatórios 29 e Teixeira tiveram as profundidades de 50% e 10% da RSFA definidas, em média, entre 0,5-0,6 m e 1,8-2,2 m, respectivamente, e amplitudes médias entre 1,3-1,6 m.

Essas diferenças de amplitude nas profundidades amostradas foram consequência da menor transparência da água, uma vez que os reservatórios do Lobo/Santana tiveram menores valores do DS (1,2-1,5 m em média), enquanto que o reservatório Teixeira apresentou maior transparência (DS médio de 2,1 m) (Figura 17). Nesse último caso, houve menor atenuação da luz, o que resultou com que 10% da RSFA atingisse maiores profundidades.

Em termos de aproveitamento luminoso para a fotossíntese, todos os pontos amostrais estavam inseridos na zona eufótica (Zeu) da coluna d'água (Figura 17). Com relação aos valores absolutos da RSFA, no geral as profundidades com 50% da RSFA apresentaram entre 65 e 821 μ mol-fótons m⁻² s⁻¹ de intensidade, enquanto que nas profundidades com 10% da RSFA essa faixa oscilou entre 13 e 178 μ mol-fótons m⁻² s⁻¹ (Figura 18).

Yang *et al.* (2020), ao estudarem a produção primária do fitoplâncton com base na intensidade luminosa, verificaram que a intensidade de saturação da fotossíntese variou conforme a espécie fitoplanctônica, sendo que os valores encontrados foram entre 150 µmolfótons m⁻² s⁻¹ (*Platymonas subcordiformis*) e 800 µmol-fótons m⁻² s⁻¹ (*Isochrysis galbana*) para espécies marinhas e em torno de 400 µmol-fótons m⁻² s⁻¹ para espécies dulcícolas (*e.g. Microcystis aeruginosa, Scenedesmus obliquus*). Por outro lado, elevadas intensidades (> 736 µmol-fótons m⁻² s⁻¹) podem inibir a fotossíntese e o crescimento de algumas cianobactérias (*e.g. Dolichospermum flosaqua*e) (Lee; Rhee, 1999), o que pode ter ocorrido no reservatório do Lobo na amostragem da ZT em 50% da RSFA (925 µmol-fótons m⁻² s⁻¹) (Figura 18A).

Figura 17 – Profundidades máximas (Z_{max}), da zona eufótica (Z_{eu}) e do disco de Secchi (DS) da coluna d'água nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano



Figura 18 – Radiação subaquática fotossinteticamente ativa (RSFA) nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do Lobo (A), Santana (B), 29 (C) e Teixeira (D) ao longo das estações do ano



Ao analisar os perfis térmicos associados à RTR, foram observados episódios de estratificação e de mistura completa da coluna d'água (Figura 19). O reservatório do Lobo apresentou típica estratificação térmica apenas no verão (Figura 19A), nos três pontos amostrais (ZR, ZT e ZL). A maior diferença de temperatura entre a camada superficial e o fundo da coluna d'água foi de 3,2°C, mensurada na ZL durante o verão (Tabela 4). No período de estratificação, a Z_{mix} se estendeu até 1,5, 2,5 e 3,5 m nas ZR, ZT e ZL, respectivamente (Tabela 4). Nos demais dias amostrais do reservatório do Lobo, ocorreu a mistura completa da coluna d'água, com a Z_{mix} se igualando à Z_{max} .

No reservatório Santana, foram identificados dois momentos de estratificação térmica da coluna d'água, ambos na ZL, porém um na primavera e outro no verão (Figura 19B). Na primavera, a Z_{mix} na ZL foi de 5,5 m, sendo que a diferença entre a temperatura da superfície e do fundo foi de 6,4 °C (Tabela 4). No caso do segundo período de estratificação, no verão, a coluna d'água apresentou duas possíveis estratificações, sendo a primeira considerada como térmica (devido ao aquecimento da água superficial) e a segunda denominada como hidráulica, causada provavelmente pelo fluxo de correntes profundas geradas pelo rio ou pela operação da barragem (Figura 19B). Em todos os outros períodos, a temperatura da água permaneceu homogênea, indicando circulação completa da coluna d'água.

Como os reservatórios 29 e do Teixeira são mais rasos, a tendência à estratificação térmica da coluna d'água foi menor, resultando em predominância de mistura completa. Na maior parte dos casos, ficou apenas visível o declínio da temperatura com o aumento da profundidade (Figuras 19C e 19D), porém sem alterações significativas na densidade da água ao ponto de criar estratificações. Nos pontos correspondentes a ZR de ambos os reservatórios, os valores de RTR no fundo da coluna d'água e a queda brusca de temperatura indicaram a tendência de formação de termoclinas profundas, causadas provavelmente pela correnteza dos rios afluente aos reservatórios, que trazem águas com maior densidade.

Ao associar as profundidades de 50% e 10% da RSFA com os perfis de temperatura, ficou evidente que todas as amostragens foram realizadas dentro de zonas de mistura, completa até o fundo da coluna d'água ou superficial (o epilímnio), quando ocorreu estratificação. Essa informação é muito relevante, pois com ela definiu-se que as duas profundidades poderiam ser utilizadas como duplicatas amostrais para a estatística aplicada à fixação de nitrogênio, uma vez que não houve diferença significativa (ANOVA, p > 0,05) entre a maior parte das variáveis da qualidade da água (*e.g.* pH, OD, nutrientes), quando comparados os valores entre as duas profundidades.

Figura 19 – Perfis da temperatura (linha) e da resistência térmica relativa (RTR) (barras) nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do Lobo (A), Santana (B), 29 (C) e Teixeira (D) ao longo das estações do ano



Tabela 4 – Coeficiente de variação (CV), diferença da temperatura entre a superfície e o fundo da coluna d'água (ΔT) e a profundidade da zona de mistura (Z_{mix}) nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios estudados ao longo das estações do ano (Legenda: * igual ao valor da profundidade máxima)

Reservatório	Estação	Zona	CV	ΔT(°C)	$\mathbf{Z}_{\mathrm{mix}}\left(\mathbf{m}\right)$
Lobo	Inverno	ZR	0,06	0,0	1,5*
		ZT	0,54	0,3	4,7*
		ZL	0,15	0,1	9,6*
	Primavera	ZR	0,07	0,0	1,8*
		ZT	0,18	0,2	4,0*
		ZL	0,44	0,3	9,4*
	Verão	ZR	1,41	1,1	1,5
		ZT	3,32	1,6	2,5
		ZL	5,48	3,2	3,5
	Outono	ZR	0,09	0,1	2,1*
		ZT	2,24	1,6	4,9*
		ZL	1,59	0,9	9,7*
Santana	Inverno	ZR	0,06	0,0	1,6*
		ZT	0,36	0,2	3,1*
		ZL	6,75	3,2	10,7*
	Primavera	ZR	0,17	0,1	1,7*
		ZT	0,22	0,1	2,8*
		ZL	11,38	6,4	5,5
	Verão	ZR	0,80	0,5	2,4*
		ZT	0,96	0,9	3,0*
		ZL	10,49	7,0	1,0
	Outono	ZR	0,17	0,1	2,2*
		ZT	0,58	0,4	2,8*
		ZL	2,98	1,7	10,1*
29	Inverno	ZR	2,58	1,9	2,1*
		ZT	3,79	2,4	4,3*
		ZL	2,82	1,7	4,2*
	Primavera	ZR	1,96	1,5	1,9*
		ZT	0,94	0,7	4,4*
		ZL	0,94	1,0	4,3*
	Verão	ZR	3,37	2,2	1,0
		ZT	2,21	1,5	4,1*
		ZL	2,94	2,0	4,4*
	Outono	ZR	2,91	2,9	1,5
		ZT	2,35	1,3	4,4*
		ZL	2,56	1,4	5,0*
Teixeira	Inverno	ZR	3,80	2,6	2,9*
		ZL	0,81	0,5	6,4*
	Primavera	ZR	1,74	1,4	1,7*
		ZL	0,61	0,5	5,9*
	Verão	ZR	3,27	2,8	1,5
		ZL	0,90	0,6	6,1*
	Outono	ZR	2,30	0,9	2,0
		ZL	3,67	2,1	6,4*

As concentrações de OD nas profundidades amostradas variaram entre 4,1 e 8,3 mg L⁻¹ no reservatório do Lobo (Figura 20A); entre 3,3 e 7,3 mg L⁻¹ no Santana (Figura 20B); entre 4,6 e 7,0 mg L⁻¹ no reservatório do 29 (Figura 20C); e entre 5,4 e 7,9 mg L⁻¹ no Teixeira (Figura 20D). Em geral, os reservatórios do Lobo e Santana apresentaram maiores concentrações de OD no inverno, enquanto que no Teixeira as maiores concentrações foram observadas durante o outono (Figura 20D). Em todos os reservatórios ocorreu um declínio gradual destas concentrações com o aumento da profundidade, sendo que nos reservatórios do Lobo e Santana foi observada condição anóxica (OD \approx 0 mg L⁻¹) no hipolímnio, nos períodos em que também houve estratificação térmica nesses reservatórios.

Foi observado padrão homogêneo de distribuição dos valores de pH na coluna d'água (Figura 21), que variaram entre 5,5 e 8,0 (Lobo), 6,0 e 8,0 (Santana e 29) e 6,0 e 8,5 (Teixeira), nas profundidades amostradas. Nos perfis avaliados nos reservatórios do Lobo e Santana foram observados valores de pH típicos de ambientes levemente ácidos (< 6,0) na região do hipolímnio, quando a coluna d'água esteve estratificada.

Em reservatórios eutrofizados, a condição de anoxia no hipolímnio e um pH levemente ácido podem favorecer a liberação de P do sedimento para a coluna d'água (Amirbahman, 2003), o que pode resultar em um processo de retroalimentação positiva que possibilita a manutenção da condição eutrófica e da biomassa fitoplanctônica. Desta forma, os resultados observados mostraram que os reservatórios do Lobo e Santana possuem condições que favorecem a eutrofização. Além da condição anóxica, em reservatórios mais rasos o vento também possui forte influência sobre a liberação de P do sedimento, principalmente pela ação de ressupender esse nutriente para a coluna d'água, aumentando as concentrações de PT e PSR nesses ambientes (Cavalcante; Araújo; Becker, 2018).

Os resultados da série fosfatada mostraram que o reservatório do Lobo apresentou a maior concentração média de PSR $(3,7 \pm 1,2 \ \mu\text{g}-\text{P}\ \text{L}^{-1})$, com máxima de 7,3 $\mu\text{g}-\text{P}\ \text{L}^{-1}$ (Figura 22A). Nos demais reservatórios, as menores concentrações de PSR (< L.D.) foram observadas no inverno (Figura 22). No caso do reservatório Santana, a concentração máxima de PSR foi de 5,0 $\mu\text{g}-\text{P}\ \text{L}^{-1}$. As concentrações de PSR nos reservatórios 29 e Teixeira estiveram majoritariamente abaixo de 3 $\mu\text{g}-\text{P}\ \text{L}^{-1}$ (< L.Q.) (Figuras 22C e 22D).

Com relação ao PT, o maior valor médio $(20,4 \pm 6,4 \ \mu\text{g}-\text{P L}^{-1})$ também foi observado no reservatório do Lobo (Figura 23A), enquanto o Teixeira apresentou a menor concentração $(15,9 \pm 2,1 \ \mu\text{g}-\text{P L}^{-1})$ (Figura 23D). As concentrações de PT variaram com similares amplitudes entre as estações do ano nos reservatórios do Lobo (8,2 a 30,5 $\mu\text{g}-\text{P L}^{-1}$), Santana $(5,0 a 26,0 \ \mu\text{g}-\text{P L}^{-1})$ e 29 (9,3 a 31,3 $\mu\text{g}-\text{P L}^{-1}$, com um *outlier* de 45,9 $\mu\text{g}-\text{P L}^{-1}$).

Figura 20 – Concentração de oxigênio dissolvido (OD) nas profundidades de 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do Lobo (A), Santana (B), 29 (C) e Teixeira (D) ao longo das estações do ano



Figura 21 – Valores de pH nas profundidades de 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios do Lobo (A), Santana (B), 29 (C) e Teixeira (D) ao longo das estações do ano



88

Figura 22 – Concentrações de fósforo solúvel reativo (PSR) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-|: as barras de erro representam o desvio padrão analítico; *: valores abaixo do L.D.)



Figura 23 – Concentrações de fósforo total (PT) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-| : as barras de erro representam o desvio padrão analítico)







Nos reservatórios do Lobo e Santana as menores concentrações de NO_2^- coincidiram com os períodos mais secos (inverno e outono) (Figuras 24A e 24B). As concentrações de NO_2^- variaram entre 1,1 e 4,9 µg-N L⁻¹ no reservatório do Lobo; entre 1,3 e 7,0 µg-N L⁻¹ no Santana; e entre 2,0 e 11,7 µg-N L⁻¹ no Teixeira. O reservatório 29 apresentou em todo o seu período concentrações de NO_2^- menores que 3,5 µg-N L⁻¹ (< L.Q.), com tendência de ausência dessa forma de nitrogênio durante o outono (<L.D.) (Figura 24C). Para o NO_3^- (Figura 25), as concentrações oscilaram entre 436 e 920 µg-N L⁻¹ no Teixeira. A maior concentraçõe média de NO_3^- observada no reservatório Teixeira (871 ± 33 µg-N L⁻¹) provavelmente se deu pelo fato de sua bacia hidrográfica possuir a maior área relativa destinada à atividade agrícola (75%) (dados não publicados). O reservatório 29 apresentou padrão de distribuição horizontal das concentrações de NO_3^- , com tendência de aumento da ZR para a ZL (Figura 25C). Esse reservatório também foi o que apresentou a menor concentração média de NO_3^- (364 ± 179 µg-N L⁻¹), com valores entre 190 e 683 µg-N L⁻¹.

Na maior parte do período amostrado não foram detectadas concentrações de NH_4^+ na água (Figura 26), principalmente nos reservatórios 29 e Teixeira. Nos reservatórios do Lobo e Santana, as maiores concentrações ocorreram durante a primavera, sendo que os valores máximos foram de 68,8 e 57,5 µg-N L⁻¹, respectivamente. As maiores concentrações de NH_4^+ nesses reservatórios podem estar relacionadas com a disponilidade de OD coluna na d'água. Isso se dá pelo fato de que condições com pouca disponibilidade de OD na água favorecem a liberação de N-orgânico do sedimento na forma de NH_4^+ (Beutel *et al.*, 2007), o que aumenta a disponibilidade de N assimilável na água. Este fator pode influenciar processos biológicos como a eutrofização, além da própria fixação de N₂.

Os resultados de NT foram similares entre os reservatórios do Lobo e Santana, com concentrações de 516 a 1.220 μ g-N L⁻¹ e de 582 a 1.002 μ g-N L⁻¹, respectivamente (Figura 27). O reservatório 29 apresentou maior amplitude de valores, com o mínimo de 239 e o máximo de 1.570 μ g-N L⁻¹, com os maiores valores determinados no inverno (Figura 27C). No Teixeira, as concentrações de NT variaram entre 825 e 1.256 μ g-N L⁻¹ (Figura 27D).

Como os reservatórios do Santana, 29 e Teixeira não são monitorados pela CETESB e não possuem dados anteriores de qualidade da água disponíveis na literatura, não foi possível compará-los com outros trabalhos para observar mudanças temporais. Contudo, os resultados mostraram que estes ecossistemas possuem características similares aos reservatórios de Igarata/SP e Atibainha/SP (De-Carli *et al.*, 2019), com potencial para abastecimento público, como foi previsto no plano diretor do município de São Carlos (São Carlos, 2016).

Figura 24 – Concentrações de nitrito (N-NO₂⁻) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-| : as barras de erro representam o desvio padrão analítico; *: valores abaixo do L.D.)

92



Figura 25 – Concentrações de nitrato (N-NO₃⁻) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-| : as barras de erro representam o desvio padrão analítico)

(A) Reservatório do Lobo

(B) Reservatório Santana



Figura 26 – Concentrações de amônio (N-NH₄⁺) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-| : as barras de erro representam o desvio padrão analítico; *: valores abaixo do L.D.)



(A) Reservatório do Lobo

(B) Reservatório Santana



Figura 27 – Concentrações de nitrogênio total (NT) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA das zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-|: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)

As maiores razões NT:PT (Figura 28) e NID:PT (Figura 29) foram observadas no período de inverno, nos reservatórios do Lobo, Santana e 29. No reservatório Teixeira, essas razões apresentaram menor variação entre as quatro estações do ano (Figuras 28D e 29D), com valores oscilando entre 110 e 169 (NT:PT) e entre 104 e 166 (NID:PT). Em todos os casos, independente da magnitude, as razões sugeriram que o fósforo foi o principal fator limitante para o crescimento fitoplanctônico (razão molar > 20) (Grayson *et al.*, 1997).

O mesmo ocorreu quando foram analisados os valores das razões das formas dissolvidas de nitrogênio e fósforo (NID:PID) (Figura 30). Porém, nesse caso, o reservatório do Lobo apresentou menor amplitude dessas razões no período estudado, variando de 193 a 691, enquanto foram observados valores acima dos milhares nos demais reservatórios, como o Santana (NID:PID > 14.000) (Figura 30B). Razões NID:PID elevadas (*e.g.* 565, 805) já foram descritas em reservatórios brasileiros oligo-mesotróficos (They; Amado; Cotner, 2017), e são explicadas principalmente pelas baixas concentrações de PID na água (< L.D.), como as encontradas no presente trabalho.

Em média, as concentrações de SST nos reservatórios do Lobo, Santana, 29 e Teixera foram de 2,6 \pm 1,0 mg L⁻¹, 2,7 \pm 0,9 mg L⁻¹, 2,2 \pm 1,1 mg L⁻¹ e 2,4 \pm 0,9 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 31). Os compostos orgânicos/voláteis representaram entre 65-70% da massa total.

No reservatório do Lobo, as concentrações de Chl-*a* variaram entre 3,3 e 14,5 μ g L⁻¹. O inverno e a primavera foram os períodos com as menores concentrações de clorofila-*a* (Figura 32A). No reservatório Santana, na maior parte das coletas, as maiores concentrações foram determinadas no ponto mais próximo à barragem (ZL) (Figura 32B). Nesse reservatório, os valores mínimos e máximos foram de 1,5 e 10,7 μ g L⁻¹, respectivamente. Não foi observado qualquer padrão horizontal ou vertical na distribuição desse pigmento no reservatório do Teixeira, que variou entre 4,1 e 18,9 μ g L⁻¹ (Figura 32D).

As concentrações médias de Chl-*a* determinadas nos reservatórios do Lobo (9,0 ± 3,6 μ g-Chl-*a* L⁻¹), Santana (5,3 ± 2,6 μ g-Chl-*a* L⁻¹), 29 (7,4 ± 5,7 μ g-Chl-*a* L⁻¹) e Teixeira (9,3 ± 4,1 μ g-Chl-*a* L⁻¹), associadas às concentrações de PT permitiram classificá-los como oligomesotróficos (Moutinho *et al.*, 2021). Destaca-se que a condição mesotrófica encontrada no reservatório do Lobo no presente estudo foi muito diferente daquela encontrada na literatura, uma vez que no período de 2013-2015 esse mesmo reservatório possuía classificação eusupereutrófica, com elevadas concentrações de PT (20-68 μ g-P L⁻¹) e Chl-*a* (25-104 μ g-Chl-*a* L⁻¹) (Marafão, 2016), o que resultava em extensas florações de cianobactérias (Tundisi *et al.*, 2015).

Figura 28 – Razão NT:PT nas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios estudados ao longo das estações do ano



ZR

ZT

ZL

97

(A) Reservatório do Lobo (B) Reservatório Santana 50% 50% ZL ZL 109 10% Outono Outono 50% 150% ΖT ΖT 10% 10% 50% 50% ZR ZR 10% 10% |50% |50% ZL ZL Verão 10% 10% Verão |50% |50% ΖT ΖT 10% 10% 50% 50% ZR ZR 10% 10% |50% 50% Primavera Primavera ΖL ZL 10% 10% 50% 50% ΖT ΖT 10% 10% 150% 50% ZR ZR 10% 10% 150% 50% Inverno ZL ΖL Inverno 10% 10% 150% 50% ΖT ΖT 10% 10% ZR | 10% |50% ZR 10% 50 100 150 200 250 300 350 400 100 150 200 250 300 350 400 0 0 50 (C) Reservatório 29 (D) Reservatório Teixeira 50% ΖL 50% 109 ΖL Outono Outono 10% 50% ΖT 10% 509 |50% ZR ZR 10% 10% 150% 50% ΖL 10% ΖL

Figura 29 – Razão NID:PT nas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios estudados ao longo das estações do ano



Figura 30 - Razão NID:PID nas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos reservatórios estudados ao longo das estações do ano



(B) Reservatório Santana



Figura 31 – Concentrações de sólidos suspensos totais (SST) e suas frações fixas (SSF) e voláteis (SSV) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-|: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



(B) Reservatório Santana



6.1.3 Comunidade fitoplanctônica

Os táxons identificados foram enquadrados em 14 classes taxonômicas, entre algas verdes (Chlamydophyceae, Chlorophyceae, Klebsormidiophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae e Zygnemaphyceae), diatomáceas (Bacillariophyceae Coscinodiscophyceae e Mediophyceae), flageladas (Cryptophyceae, Dinophyceae e Euglenophyceae); algas douradas (Chrysophyceae) e o grupo das cianobactérias. A lista completa dos táxons identificados (entre espécies e gêneros) em cada reservatório está disposta no Anexo C.

Foram identificados 77 táxons no reservatório do Lobo durante o período estudado (Quadro 1, Anexo C), com maior número de táxons ocorrendo na ZR (entre 13 e 29 táxons). A classe com maior representatividade em táxons foi Bacillariophyceae (20 táxons, com maior prevalência de *Gomphonema parvulum* var. *lagenula*), seguida pelas cianobactérias (15 táxons), com *Synechocystis aquatilis* presente em 58% das amostras. A espécie *Aulacoseira pusilla* (Coscinodiscophyceae) foi a única que apareceu em 100% das amostras analisadas. Ao considerar o biovolume das espécies, o dinoflagelado *Gymnodinium fuscum* foi o mais representativo em todos os pontos amostrados, o que fez com que a classe dominasse de 57% até 95% em termos relativos durante a primavera de 2017. Exceto no ponto da ZT, quando as espécies de diatomáceas *Aulacoseira granulata* var. *australiensis* (0,363 mm³ L⁻¹) e *Cyclotella meneghiniana* (0,306 mm³ L⁻¹) contribuíram para o grupo alcançar até 78% de biovolume relativo (Figura 33A).

Esses resultados foram muito diferentes do esperado para o reservatório do Lobo, que antes do ano de 2016 era caracterizado por florações de cianobactérias e condições tróficas mais elevadas (Tundisi *et al.*, 2015; Marafão, 2016; Vicentin *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2019). No presente trabalho, as cianobactérias tiveram maior representatividade em termos de biovolume apenas na primavera, e principalmente no ponto mais próximo à barragem (Figura 33A), quando as densidades estiveram entre 12.897 e 24.779 cél. mL⁻¹ (Figura 34A), principalmente devido à presença de *Microcystis protocystis*. Gêneros reconhecidos como potenciais fixadores de N₂ apresentaram maiores densidades durante o inverno e a primavera (Figura 34A), representados pelas espécies *Gloeothece* sp. (186 cél. mL⁻¹ na ZL no inverno), *Aphanizomenon gracile* (887 cél. mL⁻¹ na ZL na primavera) e *Aphanizomenon* sp. (1.397 cél. mL⁻¹ na ZT no inverno), sendo as duas últimas frequentemente associadas ao reservatório do Lobo (Rodrigues *et al.*, 2019).

O reservatório Santana foi o que apresentou maior número de táxons (138) (Quadro 2, Anexo C), no qual as cianobactérias e Chlorophyceae foram os grupos mais relevantes com relação ao número de táxons (28 táxons). Apesar de Gymnodinium fuscum também ser o responsável pela dominância de Dinophyceae em alguns períodos (Figura 33B), as espécies Pinnularia dactvlus (1,104 mm³ L⁻¹) e Cryptomonas marssonii (0,384 mm³ L⁻¹) foram importantes para a dominância de Bacillariophyceae (61%) e Cryptophyceae (64%) na ZT na primavera e ZL no verão, respectivamente. Com relação ao biovolume fitoplanctônico, as cianobactérias tiveram baixa representatividade nesse reservatório durante todo o estudo (entre 1 e 13%) (Figura 33B). Ao considerar o número de células, a densidade máxima de cianobactérias foi observada no verão (12.964 cél. mL⁻¹) (Figura 34B), quando também foram observadas as maiores densidades de gêneros potencialmente fixadores de N₂ (*Planktolyngbya* sp., 1.643 cél. mL⁻¹). Durante a primavera, a espécie Aphanizomenon sp., que também é fixadora de N₂, apresentou suas maiores densidades $(1.118 \text{ cél. mL}^{-1})$. Contudo, apesar do gênero Aphanizomenon formar heterócitos para realizar a fixação de N₂, não foram observados tricomas com a presença dessas células especializadas nos espécimes presentes no reservatório Santana.

Os dados do fitoplâncton para os reservatórios 29 e Teixeira obtidos neste estudo foram os primeiros relatos dessa comunidade para esses ambientes. Foram identificados 61 táxons no reservatório 29, sendo que o maior número de táxons foi do grupo Cyanobacteria (16 táxons) (Quadro 3, Anexo C). Apesar da maior riqueza em termos de número de táxons, as cianobactérias apenas dominaram na ZR durante a primavera, quando o biovolume máximo (0,102 mm³ L⁻¹) representou 95% do biovolume total da comunidade fitoplanctônica naquela ocasião (Figura 33C). Os maiores biovolumes da comunidade fitoplanctônica no reservatório 29 ocorreram durante o inverno (0,418-0,908 mm³ L⁻¹), o que coincidiu com as maiores concentrações de clorofila-*a* e densidades de cianobactérias (máxima de 18.545 cél. mL⁻¹) (Figura 34C). Neste período, a espécie *Epigloeosphaera brasilica* foi dominante (100%). Contudo, ao se considerarem espécies potencialmente fixadoras de N₂, as densidades foram muito baixas (15-621 cél. mL⁻¹), apenas com a contribuição das espécies *Planktolyngbya* spp. e *Pseudanabaena limnetica*. Durante o verão e o outono praticamente, não foram detectadas cianobactérias nas águas do reservatório 29.

Para o reservatório Teixeira, foram identificados 76 táxons fitoplanctônicos (Quadro 4, Anexo C), sendo que a classe Chlorophyceae foi a com maior representatividade (19 táxons). Nos meses de inverno e primavera, a comunidade foi caracterizada pela presença massiva de dinoflagelados (77-96%, em biovolume) (Figura 33D), devido à presença de *Gymnodinium*

fuscum. Já nos meses de verão e outono, foram identificadas alternâncias de dominâncias entre cianobactérias, Coscinodiscophyceae (*e.g. Cyclotella meneghiniana*) e Chlorophyceae (*e.g. Coelastrum reticulatum*). Nesses dois períodos, as cianobactérias dominaram (58-73%, em biovolume) na profundidade de 50% da RSFA no ponto mais próximo à barragem. Por outro lado, a densidade máxima de células foi estimada no outono, 8.542 cél. mL⁻¹ (na profundidade de 10% da RSFA na ZL). Entre todas as amostras deste reservatório, apenas o ponto ZR (em 50% da RSFA) foi observada expressiva densidade de espécies potencialmente fixadoras de N₂ (4.847 cél. mL⁻¹), majoritariamente pela presença de *Synechococcus nidulans* (Figura 34D).

Reservatórios eutrofizados possuem mais nutrientes (N e P) disponíveis que possibilitam a manutenção das florações de cianobactérias, tanto pela reciclagem interna de P como pela fixação de N₂ (Cottingham *et al.*, 2015). Por outro lado, ambientes mais oligotróficos normalmente não suportam grandes biomassas fitoplanctônicas justamente por conta da limitação de nutrientes (Howarth *et al.*, 1988). Essas premissas podem explicar o motivo pela qual as concentrações de Chl-*a* e as densidades máximas de cianobactérias foram, no geral, maiores nos reservatórios do Lobo e Santana. Contudo, as elevadas concentrações de Chl-*a* durante o inverno e outono no reservatório Teixeira podem ter sido resultado dos maiores biovolumes de dinoflagelados e clorofíceas, e não das cianobactérias. De forma geral, a divisão Chlorophyta possui maior concentração de Chl-*a* por célula quando comparadas com outros grupos fitoplanctônicos (Yang *et al.*, 2015). Essa variação de conteúdo intracelular entre as classes do fitoplâncton dificulta a correlação entre biovolume e Chl-*a* em lagos e reservatórios, principalmente na presença de dinoflagelados e diatomáceas (El-Shaarawi; Munawar, 1978).

Além das baixas densidades de cianobactérias encontradas nos reservatórios durante o período estudado, também foi constatada baixa variedade de gêneros potencialmente fixadores de N₂. Espécies formadoras de heterócitos (*e.g. Aphanizomenon* spp., *Raphidiopsis raciborskii*) apenas foram encontradas nos reservatórios do Lobo e Santana, porém, praticamente com ausência dessas estruturas. Já nos reservatórios 29 e Teixeira, foram identificadas espécies pertencentes a gêneros que podem realizar a fixação de N₂ exclusivamente no período noturno (Bergman *et al.*, 1997), como *Planktolyngbya*, *Pseudanabaena*, *Synechocystis* (reservatório 29), *Gloeothece* e *Synechococcus* (reservatório Teixeira).

Figura 33 – Biovolume relativo das classes fitoplanctônicas nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano



Figura 34 – Densidade total de cianobactérias e de gêneros potencialmente fixadores de N₂ (cél.mL⁻¹) nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano



(B) Reservatório Santana

Ao comparar as comunidades fitoplanctônicas dos reservatórios de Barra Bonita (hipereutrófico) e Itupararanga (supereutrófico), que foram utilizados para complementação da análise estatística ROC, foi observado que estas foram muito diferentes dos reservatórios avaliados no presente estudo. O reservatório de Barra Bonita foi caracterizado por extensas florações de *Microcystis* spp. (não fixadoras de N₂), enquanto que Itupararanga possuiu grandes densidades de *Raphidiopsis raciborskii* (citada como *Cylindrospermospsis raciborskii*) (Marafão, 2016).

A diferença trófica entre os períodos estudados no reservatório do Lobo também refletiram em diferenças na comunidade fitoplanctônica. No período no qual as águas foram classificadas como eutróficas (2013-2015), as florações de cianobactérias eram dominadas por *R. raciborskii* (potencial fixadora de N_2) (Marafão, 2016). Condição esta que não foi observada nos anos de 2017 e 2018.

6.1.4 Taxas de fixação biológica de N2

De acordo com Montoya *et al.* (1996), o limite de detecção do método direto para a fixação de N₂ é aproximadamente 1,3 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹, considerando uma alteração mínima de 4‰ de δ^{15} N no nitrogênio particulado retido no filtro. A partir dessa informação, as taxas de fixação absolutas de fixação do N₂ foram consideradas significativas quando acima do > L.D., o que também serviu de premissa para as taxas posteriormente normalizadas pela Chl-*a*.

No reservatório do Lobo, as maiores taxas absolutas de fixação foram observadas nos pontos ZR e ZT durante o verão e o outono (Figura 35A), com valor máximo de 4,6 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹. Esta taxa máxima ocorreu no mesmo momento em que as razões NID:PID foram mais baixas (~234), comparadas com outros períodos no mesmo reservatório (*e.g.* 691, 589). Para o reservatório Santana, a maior taxa encontrada foi de 2,2 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹, determinada na ZT durante o verão (Figura 35B), enquanto que para o Teixeira, o valor máximo registrado foi de 1,6 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹ (Figura 35D), muito próximo ao limite mínimo de detecção.

Conforme o L.D. calculado, foi observado que em todos os reservatórios estudados, no inverno e na primavera, praticamente não foram detectadas taxas de fixação biológica de N_2 pelo fitoplâncton (Figura 35). No reservatório 29 (Figura 35C), a ausência da fixação N_2 no maior período de tempo coincidiu com as menores densidades de cianobactérias diazotróficas.

As taxas absolutas de fixação de N₂ determinadas nos reservatórios do presente estudo foram menores quando comparadas com outros reservatórios subtropicais e de clima temperado. Marafão (2016) estimou taxas de fixação de N₂ de até 158,5 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹ para o reservatório de Itupararanga, e máximas de 14,8 e x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹ para Barra Bonita. Estas taxas foram de 4 a 40 vezes maiores do que a taxa máxima estimada para o reservatório do Lobo, em 2017 e 2018.

Em reservatórios localizados em regiões temperadas, as taxas absolutas de fixação de N₂ podem ser entre 160 e 220 vezes maiores do que determinadas nos reservatórios Santana e Teixeira. Scott *et al.* (2009) mostraram taxas de fixação de N₂ de aproximadamente 350 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ h⁻¹ no reservatório Waco (Texas/EUA), um ecossistema hipereutrófico com elevadas concentrações médias de PT (257 ± 88 µg-P L⁻¹). Por outro lado, no estudo de Romero *et al.* (2013) foram estimadas taxas médias de fixação de N₂ de 625 ± 25 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ no lago eutrófico de Clear (Califórnia/EUA), e de 24 ± 14 x 10^{-3} µg-N L⁻¹ no lago Walker (Nevada/EUA), de características mesotróficas. Curiosamente, os autores também identificaram taxas de fixação de N₂ muito baixas no lago oligotrófico de Tahoe (Nevada-Califórnia/EUA), com média de 0,14 x 10^{-3} µg-N L⁻¹, valores estes até menores que os encontrados nos reservatórios Santana e Teixeira.

Já com relação à sazonalidade, a fixação de N_2 parece ocorrer após bruscas diminuições nas concentrações de NO_3^- na coluna d'água em reservatórios eutróficos, principalmente durante o verão (Scott *et al.*, 2008). Nos reservatórios do Lobo e Santana as maiores taxas de fixação de N_2 foram determinas no outono e verão, respectivamente, sendo que durante o verão os maiores valores (~2,4 x $10^{-3} \mu g$ -N L⁻¹) ocorreram nos pontos ZT de ambos os reservatórios, como também encontrado por Scott *et al.* (2009). Isso porque a zona de transição de um reservatório apresentam condições ambientais favoráveis para a fixação de N_2 , como disponibilidade de P, luminosidade moderada, e menor turbulência das águas (Scott *et al.*, 2009). Por outro lado, como observado no presente estudo, a falta temporalidade com relação às concentrações de NO_3^- (*e.g.*, nos reservatórios do Lobo, Santana e Teixeira) e a menores distâncias entre a zona de rios e a barragem (*e.g.*, dos reservatórios 29 e Teixeira) prejudicaram a identificação de padrões sazonal e horizontal da fixação de N_2 .

Conforme observado no presente estudo e em outros trabalhos, a fixação absoluta de N_2 variou conforme o estado trófico dos reservatórios, principalmente devido à disponibilidade de P na água. De fato, quando o reservatório do Lobo apresentou características mais eutróficas (PT de 41 ± 17 µg-P L⁻¹) a fixação absoluta de N_2 foi estimada em até 513 x 10⁻³ µg-N L⁻¹ (Marafão, 2016), muito próxima daquela relatada por Romero *et al.* (2013) no lago Clear. Isso demonstrou que a mudança do estado trófico do reservatório do Lobo, com a diminuição das concentrações de PT, alterou as taxas de fixação de N_2 .
Ao normalizar as taxas absolutas de fixação de N₂ pela concentração de Chl-*a*, foi observado que o reservatório do Lobo apresentou a mesma tendência entre as taxas máximas absolutas e relativas (Figura 36A). Por outro lado, o reservatório Santana apresentou taxas relativas superestimadas (*e.g.* ZR no verão) devido às menores concentrações de Chl-*a* e densidades de cianobactérias, o que resultou em uma elevada taxa normalizada (5,8 x 10⁻⁴ µg-N µg-Chl-*a*⁻¹ h⁻¹) (Figura 36B), mesmo quando a taxa absoluta não foi maior que o L.D. (Figura 35B). Desta forma, para evitar erros de interpretação, na Figura 36 foram destacadas todas as taxas relativas de fixação de N₂ que foram consideradas significativas.

Considerando as taxas normalizadas de fixação de N₂ para os reservatórios estudados, foi observado que estas foram menores do que as relatadas na literatura. Em um dos poucos estudos em regiões subtropicais, Burford, McNeale e McKenzie-Smith (2006) relataram taxa máxima de fixação de N₂ de 610 x 10^{-4} µg-N µg-Chl- a^{-1} h⁻¹ no reservatório mesotrófico de North Pine (Austrália), que foi aproximadamente 100 vezes maior do que a taxa máxima observada na ZT do reservatório Santana (5,7 x 10^{-4} µg-N µg-Chl- a^{-1} h⁻¹).

Um estudo no lago hipereutrófico de Shelburne (Vermont/EUA) mostrou que as taxas relativas mais baixas detectadas (<15 x $10^{-4} \mu g$ -N μg -Chl- $a^{-1} h^{-1}$) foram correlacionadas com a maior disponibilidade de nutrientes dissolvidos, indicando preferência pela assimilação direta de NH₄⁺ e NO₃⁻ por parte do fitoplâncton (Ferber *et al.*, 2004). Os autores também observaram que, mesmo quando a razão molar NT:PT foi menor que o limiar para o N ser limitante ($\leq 33:1$) e as cianobactérias constituíram mais de 80% da biomassa fitoplanctônica, a fixação de N₂ não contribuiu com mais de 2% no nitrogênio fixado nesse lago (Ferber *et al.*, 2004). Da mesma forma, no reservatório de Itupararanga a assimilação de NID pode alcançar até 2,0 µg-N µg Chl- $a^{-1} h^{-1}$ (Cunha *et al.*, 2017), o que de acordo com as taxas de fixação de N₂ determinadas por Marafão (2016) mostraram que apenas 1% do N adquirido pelo fitoplâcton é por meio da fixação de N₂.

As baixas taxas, absolutas e relativas, de fixação biológica de N₂ encontradas nos reservatórios estudados foram relacionadas com a disponibilidade de nutrientes, como as elevadas razões NT:PT e NID:PID. Como nesses reservatórios as razões molares NT:PT, NID:PT e NID:PID sempre foram maiores que 31:1, 26:1 e 139:1, respectivamente, o N foi muito mais abundante em relação ao P nesses ambientes. Em todos os casos, em teoria, as razões molares observadas não indicaram que o N foi o nutriente limitante (NT:PT < 16:1, Redfield, 1958; NT:PT < 33:1 e NID:PT < 3:1, Morris ;Lewis 1988; DIN:DIP < 23:1, Sterner *et al.*, 2008), o que pode ter inibido a fixação de N₂ nesses reservatórios.

Figura 35 – Taxa de fixação de N₂ nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (|-|: as barras de erro representam o desvio padrão analítico, linha tracejada: limite de detecção)



Figura 36 – Taxa de fixação de N₂ normalizada pela clorofila-*a* nas duas profundidades correspondentes a 50% e 10% da RSFA nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) dos quatro reservatórios estudados ao longo das estações do ano. (Legenda: \bullet – indica a taxa de fixação normalizada com valor significativo, acima do limite de detecção)



Outro fator que foi levado em consideração e que pode ter influenciado na determinação das taxas de fixação do N_2 é o próprio método de adição do ${}^{15}N$ utilizado. Na literatura é discutido que o método da bolha com o uso do traçador ${}^{15}N_2$ pode resultar em taxas de fixação de N_2 subestimadas, devido à solubilização incompleta do gás na água (White, 2012). No entanto, o estudo Wannicke *et al.* (2018) provou que o tempo de 24 h de incubação das amostras com o gás, o mesmo utilizado no presente estudo, garante uma subestimação desprezível das taxas de fixação de N_2 (~ 0,2%).

Como os reservatórios estudados apresentaram baixas taxas de fixação de N_2 , ou nulas, estes foram considerados como controles negativos para a estimativa das taxas de fixação de N_2 na análise ROC. Por isso, para a ROC também foram utilizados os dados dos reservatórios estudados por Marafão (2016) (Barra Bonita, Itupararanga e Lobo em período eutrófico), a fim obter maiores ocorrências de fixação biológica de N_2 .

Entre as 14 variáveis de qualidade da água que foram testadas, a análise ROC resultou em limiares (*tresholds*) significativos para 7 delas (p < 0,05) (Tabela 5). Sendo assim, SST (ASC = 0,783) e Chl-*a* (ASC = 0,770) foram as variáveis com maiores valores de especificidade, com limiares de 4 mg L⁻¹ e 12 µg L⁻¹, respectivamente. Com relação aos nutrientes, apenas as concentrações de PSR (\geq 3,0 µg-P L⁻¹) e de PT (\geq 20,5 µg-P L⁻¹) foram significativas para favorecer a ocorrência da fixação de N₂ nos reservatórios estudados. Nenhuma forma de nitrogênio (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, NT) mostrou limiares significativos para a fixação de N₂. Por outro lado, foram observados que as razões NID:PSR \leq 487 e NID:PT \leq 82 também favoreceram a ocorrência da fixação de N₂ nesses reservatórios, apesar dos valores de falsos positivos para esses parâmetros (0,545 e 0,526, respectivamente) (Tabela 5). A temperatura da água mostrou ter maior sensibilidade (0,784) e o maior valor de falso positivo (0,596) para detectar a fixação de N₂, com limiar de 22°C (Tabela 5).

A Chl-*a* e os SST podem estar diretamente associados à proliferação de cianobactérias, sendo que os SST também podem ser fonte de P orgânico para a água (Uusitalo; Yli-Halla; Turtola, 2000), e que pode ser utilizado por esses microrganismos (Wan *et al.*, 2019). Por isso, ambos os parâmetros são frequentemente utilizados para o monitoramento remoto da qualidade da água de reservatórios (Rodrigues *et al.* 2017, Watanabe *et al.*, 2019). No entanto, embora estes parâmetros indiquem biomassa, a análise da presença de cianobactérias, mais especificamente de espécies fixadoras de N₂, depende exclusivamente da contagem e identificação sob microscopia óptica. A normalização das taxas de fixação absolutas em comunidades fitoplanctônicas dominadas por outros grupos fitoplanctônicos não fixadores de N₂ pode subestimar as taxas de fixação relativas de N₂.

Tabela 5 – Resultados da análise ROC para os casos de detecção da fixação de nitrogênio nos seis reservatórios estudados, considerando as variáveis teste: radiação solar fotossintética ativa (RSFA), temperatura (T), pH, clorofila-*a* (Chl-*a*), fósforo solúvel reativo (PSR), fósforo total (PT), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻), amônio (NH₄⁺), nitrogênio total (NT), sólidos suspensos totais (SST), e as razões molares nitrogênio total: fósforo total (NT: PT), nitrogênio inorgânico dissolvido: fósforo solúvel reativo (NID:PSR) e nitrogênio inorgânico dissolvido:fósforo total (NID: PT). Para cada variável, área sob a curva (ASC), erro padrão (EP) e p-valores são mostrados, bem como os limiares (*thresholds*) identificados considerando o mínimo de sensibilidade de 0,750 e de valores associados (1 – Especificidade), que representa a probabilidade de ocorrer "falso-positivo". Os limiares para as todas as variáveis são para valores maiores ou iguais aos números apresentados, exceto para as razões NID:PSR e NID:PT, para os quais o limiar é válido para valores menores ou iguais ao número apresentados. Apenas limiares significativos foram apresentados (p < 0,05* ou p < 0,01**)

Variável teste para ocorrência de fixação de N_2	ASC (EP)	р	Limiar	Sensibilidade	1 – Especificidade
RSFA (µmol-fótons m ⁻² s ⁻¹)	0,412 (0,057)	0,113	-	-	-
T (°C)	0,628 (0,056)	0,022*	≥22	0,784	0,596
pH	0,472 (0,059)	0,614	-	-	-
Chl- <i>a</i> (µg L ⁻¹)	0,770 (0,043)	0,000**	≥ 12,0	0,757	0,343
$PSR (\mu g-P L^{-1})$	0,660 (0,052)	0,004**	≥ 3,0	0,757	0,404
PT (μg- P L ⁻¹)	0,670 (0,052)	0,002**	≥20,5	0,757	0,374
NO_2^- (µg-N L ⁻¹)	0,408 (0,058)	0,100	-	-	-
NO_3 (µg-N L^{-1})	0,479 (0,056)	0,708	-	-	-
$NH_4^+ (\mu g-N L^{-1})$	0,606 (0,053)	0,057	-	-	-
NT (μg-N L ⁻¹)	0,586 (0,051)	0,122	-	-	-
$SST (mg L^{-1})$	0,783 (0,043)	0,000**	\geq 4	0,757	0,293
NT: PT	0,540 (0,062)	0,474	-	-	-
NID:PSR	0,615 (0,054)	0,040*	\leq 487	0,757	0,545
NID: PT	0,616 (0,058)	0,038*	≤ 82	0,757	0,526

Apesar da Chl-*a* ser um bom parâmetro indicador de florações de cianobactérias, sua concentração não pode ser correlacionada diretamente com as taxas de fixação de N_2 , porém pode ser utilizada como um parâmetro "chave" precursor da detecção da fixação. Scott *et al.* (2009) observaram que as taxas absolutas de fixação de N_2 não coincidiram necessariamente com as máximas concentrações de Chl-*a* nos reservatórios americanos, sendo que enquanto a Chl-*a* foi maior nas zonas de rio, as maiores taxas de fixação ocorreram nas zonas de transição, onde provavelmente ocorreu maior dominância de cianobactérias (principalmente das picocianobactérias). Esse resultado também foi observado no presente trabalho, para o reservatório do Lobo, no qual as taxas absolutas de fixação foram maiores nas zonas de transição, enquanto que a Chl-*a* foi maior nos pontos próximos à barragem e à zona de rios.

A falta de compartimentalização das concentrações de Chl-*a* nos demais reservatórios ocorreu pelo fato desses possuírem um tempo de residência muito pequeno (*e.g.*, < 2 dias, para o Santana) e menores dimensões (*e.g.*, área superficial < 1 km² no 29 e Teixeira). Estes fatores associados com a frequência amostral impossibilitaram a diferenciação das zonas propostas por Thornton, Kimmel e Payne (1990), para todos os parâmetros da qualidade da água analisados. No caso do reservatório 29, as concentrações de NO₃⁻ indicaram tendência de compartimentalização horizontal, porém as baixas concentrações de Chl-*a*, de densidades de cianobactérias, e taxas de fixação de N₂ não seguiram o mesmo padrão de distribuição.

espécies cianobactérias da comunidade fitoplanctônica, sobretudo As as potencialmente fixadoras de N2, são determinantes para o processo de fixação de N2 nos lagos e reservatórios (Burford; McNeale; McKenzie-Smith, 2006; Beversdorf; Miller; McMahon, 2013). Por exemplo, no Lago Mendota (Wisconsin/EUA), as maiores taxas de fixação de N2 (> 1 $\mu g\text{-}N~L^{\text{-1}}~h^{\text{-1}})$ foram associadas com a maior abundância relativa (> 31%) de Aphanizomenon (Beversdorf; Miller; McMahon, 2013). Zhang et al. (2017) observaram que Anabaena sp. foi correlacionada com as maiores taxas de fixação de N₂ e com o aumento no nitrogênio orgânico particulado nas águas de um lago artificial (Beijing/China), o que permitiu a posterior dominância por Microcystis spp. (espécie não heterocitada). Isso mostrou que o aporte de N por meio da fixação favoreceu a alteração de dominância entre cianobactérias, o que possibilitou o estabelecimento de espécies não fixadoras e com potencial de produção de cianotoxinas.

As taxas de fixação de N₂ nos quatro reservatórios do presente estudo e nos avaliados por Marafão (2016) foram influenciadas pela densidade e espécies de cianobactérias presentes. Ferber *et al.* (2004) mostraram que em reservatórios hipereutróficos com baixas taxas, a fixação foi dependente da presença de espécies de cianobactérias fixadoras de N₂ (*e.g.* *R. raciborskii*). Isso corroborou os resultados obtidos por Marafão (2016), uma vez que o reservatório de Barra Bonita apresentou dominância de *Microcystis* (um gênero não fixador de N_2) e o de Itupararanga mostrou maior abundância de *R. raciborskii* (espécie potencialmente fixadora de N_2). No período em que o reservatório do Lobo permaneceu em condições mais eutróficas do que as apresentadas no presente estudo, os gêneros *Raphidiopsis* (citado como *Cylindrospermopsis*), *Apnanizomenon* (fixadores de N_2) e *Microcytis* foram os mais abundantes (Marafão, 2016).

A frequente presença de gêneros potencialmente fixadores de N_2 observada nos reservatórios do Lobo e Santana (*Aphanizomenon, Dolichospermum, Planktolyngbya* e *Raphidiopsis*) contribuiu para a detecção das taxas de fixação de N_2 nesses reservatórios, como também a presença de picocianobactérias, como no outono. Por outro lado, a baixa frequência de ocorrência e densidade de cianobactérias fixadoras de N_2 nos reservatórios 29 (maior frequência de *Aphanocapsa* spp. e *Epigloeosphaera brasilica*, cianobactérias não fixadoras de N_2) e Teixeira (dominância de dinoflagelados, clorofíceas e diatomáceas) corroboraram os resultados para a não detecção de taxas de fixação de N_2 .

Apesar da presença de cianobactérias que fixam o N₂ ser um forte precursor da detecção da fixação, a variação da forma fisiológica com que a fixação de N₂ ocorre em cada espécie também pode influenciar na intensidade desse processo. Berrendero *et al.* (2016) ao estudarem a fixação de N₂ em um rio de montanha (clima temperado), observaram que as taxas relativas de fixação nas cianobactérias heterocitadas (*Rivularia*) foram maiores (6,2 x $10^{-4} \mu \text{g-N} \mu \text{g-Chl-}a^{-1} \text{ h}^{-1}$) quando comparadas com as cianobactérias fixadoras não heterocitadas (*Schizothrix*) (3,8 x $10^{-4} \mu \text{g-N} \mu \text{g-Chl-}a^{-1} \text{ h}^{-1}$). Os resultados de Berrendero *et al.* (2016) evidenciaram que a fixação por meio do heterócito pode ser mais eficiente do que a realizada sem essa célula especializada (no escuro ou em células vegetativas), normalmente de ocorrência em gêneros não heterocitados.

No caso das espécies heterocitadas, a fotossíntese nas células vegetativas vizinhas também pode fornecer ATP para o processo de fixação dentro do heterócito, quando ambos os processos ocorrem simultaneamente, possibilitando assim a fixação do N_2 na presença da luz e do O_2 (Berman-Frank; Lundgren; Falkowski, 2003). Desta forma, a presença de gêneros fixadores não heterocitados observada nos reservatórios do Lobo, Santana e Teixeira pode ter contribuído com as baixas taxas de fixação de N_2 , que ocorreram apenas no período noturno, e utilizaram a energia (ATP) e os recursos (*e.g.* P) obtidos durante o dia.

Como os limiares para PT e PSR, NID:PT e NID:PSR foram significativos, a disponibilidade de P provavelmente foi mais importante do que as baixas concentrações de N

para o processo de fixação de N_2 nos reservatórios. Isso porque todas as taxas de fixação de N_2 foram detectadas mesmo com a disponibilidade de DIN, tanto no presente estudo como no de Marafão (2016). Esta hipótese é plausível, uma vez que o processo de fixação do N_2 requer o gasto de ATP (Berg; Tymoczko; Stryer, 2002), o que torna o P um nutriente indispensável.

De acordo com Schindler *et al.* (2008), a alta disponibilidade de P também favoreceu o crescimento de cianobactérias fixadoras de N₂ e, portanto, influenciou a fixação biológica de N₂, o que já foi visto em diferentes ecossistemas aquáticos (*e.g* riachos subalpinos, Marcarelli; Wurtsbaugh, 2006; 2007; oceano tropical, Moutin *et al.*, 2008). Esse fato corroborou as elevadas densidades de *Raphidiopsis raciborskii* e as taxas de fixação de N₂ detectadas nos reservatório de Itupararanga e no reservatório do Lobo nos anos de 2013-2015, quando as concentrações médias de PT foram maiores que o limiar estimado em 20,5 µg-P L⁻¹ (Marafão, 2016). Não foram encontrados limiares para a fixação de N₂ em relação aos PSR e PT na literatura, porém, Tõnno e Nõges (2003) relataram que concentrações de PSR entre 25-100 µg-P L⁻¹ favoreceram as maiores taxas de fixação de N₂ no lago Võrtsjärv (Estônia).

Burford, McNeale e McKenzie-Smith (2006) e Horváth *et al.* (2013) descreveram que as maiores taxas absolutas de fixação de N₂ em reservatórios e lagos (North Pine/Austrália; Balaton/Hungria) foram correlacionadas com as razões NID:PSR entre 5-61 e 7-26, respectivamente. Apesar das faixas NID:PSR desses trabalhos serem menores do que as observadas no presente estudo, ainda sim as razões molares NID:PSR estiveram abaixo do limiar determinado para os reservatórios subtropicais (NID:PSR \leq 487). Provavelmente as razões molares das diferentes combinações de N:P identificadas nos reservatórios subtropicais, em face das encontradas em ecossistemas temperados, foram maiores devido à influência da temperatura nas regiões próximas aos trópicos.

As altas temperaturas e taxas de aporte de nutrientes (*e.g.* NO_3^- , NH_4^+) em ambientes tropicais (Lewis Jr., 2010) podem favorecer a elevada disponibilidade de N na água e assimilação direta desses nutrientes. Portanto, as cianobactérias não precisariam gastar energia para fixar o N₂, como foi observado nos reservatórios de Barra Bonita e Itupararanga, onde a assimilação de DIN representou > 99% do N retido pelo fitoplâncton (Cunha *et al.*, 2017), o que resultou em as taxas de fixação de N₂ abaixo ou perto do limite de detecção (Marafão, 2016).

Para a temperatura da água, o limiar de 22,0 °C foi menor em comparação ao valor encontrado por Scott *et al.* (2008) para reservatórios norte-americanos (27,5 °C). No entanto, esses autores apontaram que a temperatura por si só não foi um preditor adequado da biomassa de cianobactérias fixadoras de N₂ naqueles sistemas aquáticos, o que corroborou

com os elevados valores de falsos positivos para o limiar de temperatura, estimado no presente estudo (0,596, Tabela 5). Coincidentemente, para o clima subtropical *Cwa*, a temperatura média do mês mais quente é sempre superior aos 22° C (Peel; Finlayson; MacMahon, 2007), o que pode indicar que nesses reservatórios a ocorrência do processo de fixação de N₂ seria favorecida no verão.

Embora os limiares de temperatura para a fixação de N_2 não estejam bem definidos na literatura, supõe-se que o limiar relativamente baixo está relacionado à menor variação da temperatura da água nas regiões subtropicais. Menores amplitudes térmicas podem diminuir o limiar desse processo e promover a ocorrência da fixação de N_2 ao longo de todo o ano, ao contrário de sistemas temperados com forte sazonalidade, que dependem da ocorrência de maiores temperaturas exclusivas do verão.

Em climas mais quentes, a fixação de N_2 pode ser favorecida porque em temperaturas mais altas, as taxas de respiração são maiores do que a capacidade de difusão de O_2 para os heterócitos. Isso facilita a condição anaeróbia exigida pela enzima nitrogenase (Visser *et al.*, 2016) e também fornece o ATP necessário para a fixação (Berg; Tymoczko; Stryer, 2002). Para o gênero *Trichodesmium* (cianobactéria não heterocitadas), a faixa de temperatura de 20-35°C resultou em taxas de respiração mais altas (isto é, maior consumo de O_2) e, portanto, melhorou o desempenho da atividade da nitrogenase (Staal; Meysman; Stal, 2003). Além disso, a estratificação térmica mais frequente da coluna de água nesses períodos mais quentes também pode impulsionar o crescimento inicial de cianobactérias fixadoras de N₂. Como no estudo de Beversdorf, Miller e McMahon (2013), que observaram que a estratificação térmica resultou em mudanças na disponibilidade de N e promoveu a sua limitação ao longo da coluna d'água, o que favoreceu a fixação de N₂.

Além disso, as maiores temperaturas também podem favorecer a dominância de cianobactérias nos ecossistemas aquáticos (Elliot, 2012; Visser *et al.*, 2016). Sendo que temperaturas > 25°C são consideradas um limiar para o crescimento de cianobactérias em reservatórios (Paerl, 2018), o que pode aumentar a probabilidade de ocorrência da fixação de N_2 nesses ecossistemas.

Com base nos vários fatores ambientais e nos resultados da análise ROC que influenciaram para o sucesso da fixação de N_2 em reservatórios subtropicais, entende-se que a fixação de N_2 não é um processo linear, que dependa exclusivamente de um único fator capaz de promovê-la. Desta forma, com base nessas informações, foi proposto um fluxograma com o objetivo de simplificar os resultados obtidos no presente trabalho (Figura 37). Nele foi possível verificar que são vários os fatores que podem estimular a fixação de N_2 nos

reservatórios, sendo que alguns foram mais relevantes do que outros, de forma imprescindível para a ocorrência da fixação de N_2 (*e.g.* presença de cianobactérias fixadoras de N_2).





Fonte: Autoria própria.

O primeiro fator indispensável para a ocorrência da fixação de N₂ nos reservatórios foi a presença de cianobactérias fixadoras de N₂ na comunidade fitoplanctônica (Figura 37). Neste caso, a presença das cianobactérias não deve ser considerada como uma variável, mas sim como uma premissa para a ocorrência da fixação de N₂. A ausência ou as baixas densidades desses microrganismos acabaram naturalmente impossibilitando a ocorrência da fixação, independente do estado trófico do ecossistema estudado, como no caso dos reservatórios 29, Teixeira (oligo-mesotróficos) e de Barra Bonita (hipereutrófico) (Marafão, 2016; Moutinho *et al.*, 2021). A partir da presença dessas cianobactérias, a biomassa (representada pela Chl-*a*) desses microrganismos foi o segundo fator mais relevante para que os métodos analíticos detectassem a fixação de N₂. Desta forma, quando os resultados da ROC indicaram que o valor de Chl-*a* de 12 μ g L⁻¹ foi um limiar, foi considerado que acima dessa concentração a probabilidade da detecção da fixação de N₂ ocorrer é aumentada, com aproximadamente 34% de chance dos resultados serem falsos positivos.

Vale destacar que não é pelo fato das cianobactérias diazotróficas terem a capacidade de realizar a fixação de N_2 , que necessariamente esse processo irá ocorrer. Sabe-se que a diferenciação das células vegetativas em heterócitos e a expressão gênica da enzima nitrogenase (responsáveis pela fixação de N_2) nas espécies potencialmente fixadoras são inibidas, por exemplo, diante de elevadas concentrações de NO₂⁻, NO₃⁻ e NH₄⁻ na água e da pressão parcial de O₂ nas células (Thiel, 2006). Nas espécies heterocitadas, a expressão da nitrogenase depende de fatores internos ao heterócito, após esta célula ser formada (em condições aeróbicas ou anaeróbicas). Já nas células vegetativas de espécies não heterocitadas, a expressão e atividade da nitrogenase é praticamente regulada por fatores externos à célula e requer condições anaeróbias (Thiel *et al.*, 1995). Desta forma, ficou evidente que a presença de cianobactérias diazotróficas em maiores biovolumes (*e.g.* estimado pela Chl-*a* \geq 12 µg L⁻¹) foi fundamental para a ocorrência da fixação nos reservatórios estudados. Porém, também são diversos os fatores a nível molecular que podem regular a fixação de N₂ nas cianobactérias, e que não foram incluídos no presente trabalho.

Na hipótese da presença de cianobactérias em consideráveis densidades (Chl- $a \ge 12$ µg L⁻¹), as concentrações de P (PSR $\ge 3,0$ µg-P L⁻¹; PT $\ge 20,5$ µg-P L⁻¹) devem suprir a necessidade desses microrganismos para realizar a fixação do N₂. Essa explicação pode ser aplicada ao reservatório do Lobo, que no inverno (2017) não demonstrou significativas taxas de fixação de N₂, mesmo com a presença de cianobactérias potencialmente fixadoras e com concentrações de Chl-a > 15 µg L⁻¹. Neste período foi observado que o reservatório apresentou concentrações de PSR e PT majoritariamente abaixo dos limiares determinados para a fixação de N₂, o que diminuiu a probabilidade de ocorrência desse processo.

Sendo assim, os reservatórios eutrofizados tiveram maior probabilidade de ocorrência do processo de fixação do que os reservatórios oligo-mesotróficos (quando a Chl- $a < 12 \ \mu g \ L^{-1}$; PT $\leq 20,5 \ \mu g$ -P L⁻¹). Desta forma, a hipótese literária de que a baixa disponibilidade de nutrientes (N e P) seja o principal fator regulador do processo de fixação de N₂ não foi corroborada para os reservatórios estudados. Principalmente pelo fato de que as maiores taxas de fixação de N₂ estimadas ocorreram em reservatórios eutrofizados (*e.g.* Ituparanga, Lobo) com elevadas concentrações de NT, NID e PSR (Marafão, 2016). Por outro lado, a hipótese de que o P seja um fator mais importante na regulação da fixação e N₂ foi confirmada, pelo menos para os reservatórios eutrofizados pode gerar pressão sobre a assimilação de NID, o que aumentaria a fixação de N₂ por cianobactérias quando o PSR está disponível. Além disso, os reservatórios oligo-mesotróficos não suportam elevada biomassa fitoplanctônica ao ponto de incentivar a competição pelo DIN disponível na água. No entanto, dependendo da composição da comunidade fitoplanctônica desses ambientes (*e.g.* presença ou ausência cianobactérias fixadoras de N₂), outros fatores ambientais além do P também podem ser relevantes para a ocorrência da fixação de N₂, como a disponibilidade de micronutrientes (*e.g.* Mo e V) (Thiel, 2006).

Com relação às razões NID:PSR e NID:PT a interpretação foi realizada de forma mais cautelosa, até pelo fato de que a análise ROC mostrou elevadas taxas de resultados falsos positivos (54%), o que evidenciou que esses parâmetros também não podem ser analisados de forma isolada. Nesta situação, as concentrações de N poderiam ter influência significativa, pois as menores concentrações resultaram em menores razões molares. As baixas razões N:P, definidas tanto pelas menores concentrações de N como pelas maiores concentrações de P nas águas, podem indicar a necessidade de obtenção de N por meio da fixação de N₂. Mesmo quando as razões molares observadas no presente estudo não mostraram o N como nutriente limitante para o crescimento fitoplanctônico (Redfield, 1958; Sterner *et al.*, 2008). Além disso, o balanço de N e P em lagos e reservatórios também depende da reciclagem interna desses nutrientes, que podem atuar como um fator de retroalimentação positiva que favorece o as florações das florações pode estimular a liberação de N e P para a coluna d'água, o que pode influenciar as taxas de fixação de N₂, ainda mais em elevadas temperaturas ($\geq 22^{\circ}$ C) (Figura 37), que podem aumentar a velocidade dos processos biogeoquímicos.

Muitos são os outros fatores que podem interferir diretamente na fixação do N_2 ou indiretamente por meio da manutenção da densidade de cianobactérias (Paerl, 1990; Scott *et al.*, 2009; Unrein *et al.*, 2010; Fernández-Juárez *et al.*, 2020), mas que não mostraram limiares significativos ou não foram avaliados no presente trabalho. Unrein *et al.* (2010), por exemplo, destacaram que a ocorrência de espécies fixadoras de N_2 nos ecossistemas aquáticos não está relacionada apenas com as condições de baixa disponibilidade de N, mas sim com demais fatores como pH, luminosidade e micronutrientes.

Além disso, reservatórios com menores áreas de drenagem podem apresentar maiores taxas de fixação de N_2 , pois teriam menor efeito do escoamento superficial, o que diminuiu a turbidez e turbulência da água, e favoreceu o crescimento das cianobactérias diazotróficas no estudo de Forbes *et al.* (2008). Outro fator também não avaliado foi o baixo tempo de residência das águas associado ao estado trófico dos reservatórios (*e.g.* Santana e o 29), que poderia impossibilitar a permanência das cianobactérias nesses ecossistemas (Richardson *et al.*, 2018), como observado no presente trabalho.

Os estudos dos fatores ambientais que influenciam a fixação de N_2 em reservatórios ainda são escassos, principalmente em ecossistemas tropicais/subtropicais. Reconhecer esses fatores é importante não apenas para o propósito de manejo de florações de

cianobactérias, mas também porque a fixação de N_2 pode favorecer o prolongamento de tais florações e trazer N para outras espécies tóxicas não fixadoras (*e.g., Microcystis*) (Beversdorf; Miller; McMahon, 2013), evitando-se assim o ciclo de *feedback* positivo ou a alternância de dominância entre espécies mais nocivas à saúde humana.

6.2 Experimentos in vitro

6.2.1 Condições experimentais

Por meio do monitoramento dos parâmetros experimentais, foi possível verificar que a curva de crescimento e o experimento da fixação com a cianobactéria *Dolichospermum flosaquae* ocorreram em condições controladas de temperatura do ar $(25,0 \pm 1,1^{\circ}C)$, temperatura da água $(24,0 \pm 0,1^{\circ}C)$ e luminosidade $(45 \pm 6 \mu mol-fótons m^{-2} s^{-2})$, ao longo dos 15 dias de experimento (Figura 38). Com relação às concentrações de nutrientes no meio de cultivo, as concentrações observadas de NO₃⁻ e de PSR foram muito próximas das concentrações teóricas esperadas, que resultaram em razões molares NID:PID também muito similares aos valores teóricos (Tabela 6).

Para o experimento A, no qual a concentração de fósforo foi teoricamente fixada em 120 μ g-P L⁻¹, a concentração inicial média desse nutriente foi de 130 ± 6 μ g-P L⁻¹, resultando nas razões molares NID:PID iniciais: 70, 25, 16, 11, 3 e 0. Já no experimento B, no qual a concentração teórica de NO₃⁻ foi fixada em 550 μ g-N L⁻¹, a concentração inicial média de N foi de 604 ± 17 μ g-N L⁻¹, com razões molares NID:PID iniciais: 65, 23, 16, 11, 4 e 0, as quais foram muito próximas aos valores desejados para o experimento. Não houve relevante alteração do pH do meio de cultivo entre o início e o final do experimento (Tabela 6).

As concentrações de nutrientes utilizadas nos experimentos se assemelham às tipicamente reportadas em reservatórios subtropicais brasileiros, variando desde características mesotróficas até hipereutróficas (Moutinho *et al.*, 2021), exceto na condição 0-P (Razão NID:PID = 0, [PSR] = 8,43 mg-P L⁻¹). A elevada concentração de PSR dessa condição não representou qualquer concentração encontrada em cursos de água naturais, mas foi necessária para que o meio de cultivo utilizado alcançasse a razão molar NID:PID próxima ao valor zero, mesmo com disponibilidade de N (630 µg-N L⁻¹).

Figura 38 – Valores de luminosidade, temperatura do ar (intervalos de 30 min) e da temperatura da água (mensurada diariamente) durante o experimento da fixação de N₂, entre os dias 21/01 (dia 0) e 05/02 (dia 14). As setas indicam o momento no qual foi realizada a injeção de ¹⁵N₂ para determinação da taxa de fixação



Tabela 6 – Resumo das condições nutricionais do Experimento A, com variação das concentrações de N, e do Experimento B, com variação das concentrações de P

Experimento A (-N)						
Razão NID/PID Teórica	Concentração Observada Inicial (µg-N L ⁻¹)	Concentração Observada Inicial (µg-P L ⁻¹)	vada Razão NID/PID) Experimental Inicial		pH Final	Δ pH
0	0,1	120,8	0	7,33	6,95	0,38
4	190,0	134,5	3	7,44	7,10	0,34
10	586,0	123,5	11	7,42	7,35	0,07
16	950,0	135,0	16	7,41	7,25	0,16
23	1514,0	132,5	25	7,35	7,29	0,06
60	4188,0	131,6	70	7,42	7,40	0,02
Experimento B (-P)						
Razão NID/PID Teórica	Concentração Observada Inicial (µg-N L ⁻¹)	Concentração Observada Inicial (µg-P L ⁻¹)	Razão NID/PID Experimental Inicial	pH Inicial	pH Final	ΔpH
0	630,0	8430,0 0		7,44	7,53	0,09
4	617,0	324,0	4	7,33	7,30	0,03
10	586,0	123,5	11	7,42	7,35	0,07

80,9

57,0

20,0

16

23

65

7,46

7.46

7,42

7,34

7.43

7,33

0,12

0,03

0,09

As concentrações de nutrientes utilizadas nos experimentos se assemelham às tipicamente reportadas em reservatórios subtropicais brasileiros, variando desde características mesotróficas até hipereutróficas (Moutinho *et al.*, 2021), exceto na condição 0-P (Razão NID:PID = 0, [PSR] = 8,43 mg-P L⁻¹). A elevada concentração de PSR dessa condição não representou qualquer concentração encontrada em cursos de água naturais, mas foi necessária para que o meio de cultivo utilizado alcançasse a razão molar NID:PID próxima ao valor zero, mesmo com disponibilidade de N (630 µg-N L⁻¹).

16

23

60

602,0

600.0

590,0

De forma geral, as curvas de crescimento apresentaram comportamento similar entre os tratamentos, com a fase exponencial ocorrendo entre o 3° e 8° dia de cultivo, exceto para a condição com ausência de nitrogênio (0-N), na qual a fase exponencial foi mais curta e antecipada (entre o 2° e 4° dia) (Figura 39). Todas as equações utilizadas para a conversão da Abs em Chl-*a* ao longo do experimento tiveram r² > 0,96 (Anexo D).

A razão 60-N foi a que possibilitou o maior incremento de densidade de *D. flosaquae*, principalmente durante a fase estacionária (Figura 39A). Nas razões com maior disponibilidade de N, foram observadas as maiores taxas de crescimento (16-N, $\mu = 0,245 \text{ d}^{-1}$; 23-N, $\mu = 0,128 \text{ d}^{-1}$; 60-N, $\mu = 0,160 \text{ d}^{-1}$). Por outro lado, a razão 0-N não possibilitou um aumento considerável da densidade de células, principalmente durante a fase exponencial, e teve a menor taxa específica de crescimento ($\mu = 0,079 \text{ d}^{-1}$). No experimento com a manipulação do P, o μ não apresentou grandes variações com o aumento das concentrações de P (0,095 – 0,12 d⁻¹). Exceção foi observada na condição com razão NID:PID = 60 e baixa disponibilidade de P (20 μ g-P L⁻¹), na qual a taxa de crescimento foi duas vezes maior (0,21 d⁻¹) do que nos outros tratamentos (Figura 39B).

Liu *et al.* (2020) verificaram que para a espécie *Dolichospermum flosaquae* (citado como *Anabaena flosasquae*) não houve diferença significativa entre as taxas de crescimento (μ) (0,247 – 0,255) quando as concentrações de PSR variaram entre 140 e 770 μ g-P L⁻¹. Porém, o maior valor de μ foi observado na maior concentração de P (1.840 μ g-P L⁻¹). Isso não foi constatado no presente trabalho, provavelmente pelo fato da elevada concentração de P utilizada no experimento (8.430 μ g-P L⁻¹) poder ter prejudicado o crescimento da cepa, devido a potencial toxicidade do P em excesso.

Fernandez-Juarez *et al.* (2020) observaram que na condição de menores concentrações de NO_3^- , a maior disponibilidade de PSR (1.350 µg-P L⁻¹) proporcionou maior µ (0,40 ± 0,02 d⁻¹) em *Halothece* sp. (uma espécie cocóide, não heterocitada), quando comparado o crescimento nas concentrações de PSR médias (30 µg-P L⁻¹) e baixas (3 µg-P L⁻¹). As baixas taxas específicas de crescimento estimadas no presente trabalho e a sua pequena variação nos tratamentos de manipulação do P podem estar relacionadas com uma possível limitação de P ao longo do tempo, apesar da disponibilidade inicial de P ser elevada. Além disso, a menor luminosidade utilizada no experimento poderia interfeir nas taxas de crescimento.

Em experimentos utilizando *Dolichospermum circinalis* e *Fischerella muscicola*, alguns trabalhos identificaram μ máximos de entre 0,30 e 0,45 d⁻¹ (Islam; Beardall, 2017) em condições muito similares (luminosidade entre 25 e 50 μ mol-fótons m⁻² s⁻²; temperatura de 25°C) às consideradas no presente trabalho. Contudo, no caso de *F. muscicola*, a grande

disponibilidade de P (1.350 μ g-P L⁻¹) ainda foi o fator determinante para as maiores taxas de crescimento (Fernandez-Juarez *et al.*, 2020), o que mostrou que a concentração de P teve maior influência sobre o crescimento da cianobactéria, mesmo em baixa luminosidade.

As densidades de células no dia zero do experimento variaram entre 1,34 x 10^5 (0-N) e 1,90 x 10^5 (16-P) cél. mL⁻¹ (Figura 40). Durante a fase exponencial de crescimento, quando foi realizada a primeira quantificação da taxa de fixação de N₂, cada tratamento apresentou diferentes densidades médias de células, entre 4,13 x 10^5 e 6,10 x 10^5 cél. mL⁻¹ (mínimo de 1,20 x 10^5 cél. mL⁻¹ para 0-N; máximo de 6,73 x 10^5 cél. mL⁻¹ para 60-P). Esta variação do número de células esteve intrinsicamente relacionada com as taxas de crescimento (μ), determinadas pelas condições nutricionais de cada tratamento.

Figura 39 – Resultados das curvas de crescimento ao longo do Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), do Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). Os pontos vermelhos indicam o momento no qual foi realizada a quantificação da fixação de nitrogênio



Na fase estacionária a densidade média de células variou entre 4,33 x 10^5 cél. mL⁻¹ (razão 4-N) e 9,48 x 10^5 cél. mL⁻¹ (razão 60-N) (Figura 40). Em todos os tratamentos os valores das densidades celulares não foram considerados elevados (< 10^6 cél. mL⁻¹), evitandos e assim o auto sombreamento e a probabilidade de competição por luminosidade.

Figura 40 – Densidade de células de *Dolichospermum flosaquae* (células mL⁻¹) no dia inicial (Dia 0), na fase exponencial e na fase estacionária (platô) da curva de crescimento nos diferentes tratamentos do Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), do Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP)



De forma geral, a densidade de heterócitos não teve diferença significativa entre a fase exponencial e a fase estacionária (K-W, p > 0,05) dentro de cada tratamento, sendo apenas vizualidada na razão 4-P, quando na fase exponencial houve maior densidade de heterócitos (Figura 41) (K-W, p < 0,05, H = 10,58). Foi possível observar uma tendência de aumento do número de heterócitos produzidos por *Dolichospermum flosaquae* na fase exponencial do crescimento conforme o aumento da disponibilidade de P no meio de cultivo e consequente diminuição da razão NID:PID, quando a concentração de N foi fixada (condições 60-P até 0-P, Figura 41).

O estudo feito por Zulkelfi e Hwang (2020) mostrou que na espécie *Anabaena variabilis* a maior densidade de heterócitos (máximo de $1,3 \times 10^5$ cél. mL⁻¹) também ocorreu na primeira metade da curva de crescimento, e que decaia com o tempo. Essa variação na densidade dos heterócitos ao longo do tempo pode estar relacionada com a disponibilidade de nutrientes essenciais para a formação dessas células, como o N e o P, normalmente em maiores concentrações no início de um cultivo em batelada.

Muitos são os fatores que podem interferir na produção de heterócitos nas cianobactérias. Silverman *et al.* (2018) verificaram que a pressão parcial de N_2 na água pode influenciar na formação e distanciamento de heterócitos em *Anabaena cylindrica*. Dextro, Moutinho e Freire-Nordi (2018) ao estudarem uma cepa de *Nostoc paludosum* constataram que tanto a abstinência de N, como a de P, pode regular a formação de heterócitos nessa espécie, mas que em ambos os casos ocorreu a diminuição dessas células ao longo do tempo até o 10° dia de cultivo.

Ao estudarem uma cepa de *Dolichospermum flosaquae*, Yema, Litchman e Pinto (2016) observaram que a maior densidade de heterócitos ocorreu na condição de ausência de N do que na condição com suplementação de N (14.000 μ g-N L⁻¹), na qual a formação de heterócitos foi inibida. A inibição de formação heterócitos também foi observada no presente estudo, na condição 60-N (4.188 μ g-N L⁻¹) (Figura 41). Ainda no mesmo trabalho, os autores também verificaram que a ausência de N associada com a maior disponibilidade de P (620 μ g-P L⁻¹) favoreceu a maior densidade de heterócitos.

Apesar da formação de heterócitos estar correlacionada com a ausência de N ou suas baixas concentrações no meio, a presença de N em determinadas concentrações não parece ser um inibidor da formação dessas células especializadas. Concentrações de 500 μ g-N L⁻¹ ainda podem permitir a formação de heterócitos (Wang *et al.*, 2018), desde que observada, concomitantemente, a disponibilidade de P.





6.2.2 Fixação biológica de N2

O enriquecimento de ¹⁵N nos frascos de incubação dos experimentos foi de 54,2%, considerando a solubilidade do N₂ no meio de cultivo e na temperatura de 24°C. O limite de detecção (L.D.) mínimo para a taxa de fixação absoluta de N₂ considerando uma alteração de 5‰ do δ^{15} N no nitrogênio orgânico particulado foi calculado em 3,29 x 10⁻⁴ µg-N L⁻¹ h⁻¹, de acordo com Montoya *et al.* (1996).

As taxas absolutas de fixação de N₂ variaram entre não detectável (\leq L.D., fase exponencial da condição 60-N) até o máximo de 22,7 x 10⁻⁴ µg-N L⁻¹ h⁻¹ (fase estacionária da condição 10-NP) (Figura 42). Nos tratamentos em que as concentrações iniciais de fósforo foram fixadas e a disponibilidade de N foi diminuída gradualmente (razões 0-N, 4-N, e 10-NP), foram observadas as maiores taxas absolutas de fixação de N₂ na fase exponencial de crescimento (K-W, p < 0,05, H = 33,37). Por outro lado, quando a disponibilidade de N foi fixada, a variação das concentrações de P não interferiu em termos absolutos sobre fixação de N₂ durante a fase exponencial (K-W, p > 0,05) (Figura 42).

Apesar de não significativo (K-W, p > 0,05), em 75% dos tratamentos foram observadas as maiores taxas absolutas de fixação de N₂ durante a fase estacionária, mesmo tendo menor quantidade de heterócitos nesse período. Willis, Chuang e Burford (2016) também observaram que a cepa de *Raphidiopsis raciborskii* apresentou maiores taxas absolutas de fixação de N₂ na frase estacionária, porém identificaram a maior densidade de heterócitos neste período.

Apesar dos heterócitos serem células especializadas para fixação de N_2 nas cianobactérias Nostocales e Stigonematales, uma relação direta entre taxa de fixação e quantidade de heterócitos nem sempre pode ser encontrada. Isso porque o processo de fixação de N_2 depende de outros fatores a nível bioquímico e molecular, como a disponibilidade intracelular de nutrientes que podem inibir a expressão dos genes responsáveis pela enzima nitrogenase (Wang *et al.*, 2018). Além disso, os heterócitos podem permanecer por 15 dias no tricoma das cianobactérias filamentosas (Thiel, 2006), mesmo em condições com disponibilidade de N extracelular ou intracelular (estocados em grânulos de cianoficina, Kromkamp, 1987), o que inibiria a ocorrência da fixação de N_2 .

He *et al.* (2021) detectaram a fixação de N_2 em células vegetativas de *Anabaena* sp. (PCC7120), em condições de privação de N. Os autores evidenciaram que neste caso as células vegetativas estavam expressando o gene da enzima nitrogenase (*nifH*), normalmente de atuação dentro dos heterócitos. Similar processo pode ter ocorrido nos tratamentos 60-P

No presente estudo, a tendência de maior taxa absoluta de fixação do N_2 durante a fase estacionária dos tratamentos com manipulação de P, quando houve a menor quantidade de heterócitos, pode estar relacionada com a maior densidade de células vegetativas presente nesse período. Isso demandaria mais do processo de fixação de N_2 para nutrir essa quantidade de células vegetativas, fazendo com que as taxas absolutas de fixação fossem maiores, desde que houvesse disponibilidade de P (> 120 µg-P L⁻¹) (razões 0-P, 4-P e 10-NP, Figura 42).

Como cada tratamento possuiu uma quantidade diferente de células de *D. flosaquae* no momento da fixação de N_2 , devido às diferentes taxas específicas de crescimento, a fixação absoluta de N_2 não seria o melhor parâmetro para comparar a influência das concentrações de N e P sobre esse processo biológico. Desta maneira, para a discussão foram utilizadas as taxas relativas de fixação de N_2 , normalizadas pela concentração de Chl-*a* (Figura 43), como também pela densidade de células de *D. flosaquae*.

As maiores taxas relativas de fixação de N₂ foram observadas nas razões 0-N (3,81 x $10^{-5} \mu$ g-N μ g-Chl- $a^{-1} h^{-1}$), 4-N (2,54 x $10^{-5} \mu$ g-N μ g-Chl- $a^{-1} h^{-1}$) e 10-NP (2,42 x $10^{-5} \mu$ g-N μ g-Chl- $a^{-1} h^{-1}$) (K-W, p < 0,05, H = 50,34), respectivamente. Também foi observada uma tendência de diminuição das taxas relativas de fixação com o aumento da razão N:P durante a fase exponencial, em ambos os experimentos (Figura 43). Wang *et al.* (2018) observaram que a abundância do gene responsável pela expressão da nitrogenase (*nifH*) foi correlacionada negativamente com a razão NID:PSR do meio. Essa informação corroborou as maiores taxas de fixação do N₂ encontradas nas menores razões NID:PID, indicando que quando o N se tornou o fator limitante para o crescimento de *D. flosaquae*, ocorreu a intensificação da fixação do N₂ atmosférico.

As cepas de *D. flosaquae* são muito estudadas pelo mundo, principalmente pelo potencial de produção de cianotoxinas (Devlin *et al.*, 1977; Miles; Melanson; Ballot, 2014) e pela capacidade de fixação de N₂, podendo obter entre 58-75% do N por meio da atmosfera (Gu; Alexander, 1993). Contudo, as taxas relativas de fixação de N₂ em *D. flosaquae* determinadas no presente estudo foram menores do que o relatado em outros trabalhos para outras espécies de cianobactérias, heterocitadas ou não. Para a espécie heterocitada *Fischerella muscicola*, a taxa máxima de fixação foi de 2,52 x 10^{-2} µg-N µg-Chl- a^{-1} h⁻¹, quando o N₂ foi a única fonte de N disponível (Fernandez-Juarez *et al.*, 2020). Já para a espécie *Crocosphaera watsonii* (não heterocitada), a taxa máxima de fixação de N₂ foi de 2,4

x 10^{-8} µg-N cél.⁻¹ h⁻¹ (Inomura *et al.*, 2019), praticamente mil vezes maior quando comparada com a máxima do presente trabalho (1,5 x 10^{-11} µg-N cél.⁻¹ h⁻¹).

Figura 42 – Fixação absoluta de N₂ por *Dolichospermum flosaquae* (μ g-N L⁻¹ h⁻¹) na fase exponencial e no platô da curva de crescimento nos diferentes tratamentos: Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). Legenda: * destacada diferenças significativas (p < 0,05)



Figura 43 – Fixação relativa de N₂ por *Dolichospermum flosaquae* (μ g-N μ g-Chl- a^{-1} h⁻¹) na fase exponencial e no platô da curva de crescimento nos diferentes tratamentos: Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). Legenda: * destacada diferenças significativas (p < 0,05)



Muitos são os fatores que podem ter reduzido a capacidade ótima de fixação de N₂ no presente estudo (*e.g.* temperatura, luminosidade, cianotoxinas, disponibilidade de micronutrientes). Inomura *et al.* (2019) observaram que a fixação de N₂ em *C. watsonii* foi favorecida em elevadas temperaturas (~30°C) e maior luminosidade (150 µmol-fótons m⁻² s⁻¹), o triplo da intensidade utilizada no presente estudo. Os autores também concluíram que

temperaturas próximas aos 22°C inibem a fixação de N_2 nessa espécie não heterocitada. Brauer *et al.* (2013) relataram que para *Cyanothece* a fixação de N_2 ocorre em temperaturas acima de 22°C. Os valores de temperatura utilizados nesses experimentos em cultivo citados corroboram com o limiar identificado por Moutinho *et al.* (2021), para ocorrência da fixação em ecossistemas naturais subtropicais.

A luminosidade também é um fator relevante para a fixação de N_2 , no qual as taxas de fixação podem aumentar conforme a maior disponibilidade de luz (Pinto; Litchman, 2010), pois a fotossíntese é a principal fonte de energia para a nitrogenase (Bothe *et al.*, 2010). Contudo, analisar a luminosidade de forma isolada no processo da fixação não é algo trivial. Isso porque a fixação de N_2 ocorre de maneira diferente entre cada grupo de cianobactéria (heterocitadas ou não, filamentosas, coloniais) que dependem de fases de claro ou de escuro, podendo interagir também de forma sinérgica com outros parâmetros ambientais.

Como exemplo, alguns trabalhos mostraram a importância da luminosidade em diferentes espécies de cianobactérias (Fernadez-Juarez *et al.*, 2020; Matsuda *et al.*, 2020). Foi observado que para a espécie heterocitada *Fischerella muscicola* não ocorreu variação das taxas de fixação entre a fase clara e a escura do fotoperíodo (Fernadez-Juarez *et al.*, 2020). Por outro lado, *Crocosphaera watsonii* e *Cyanothece* sp. apresentaram um *hotspot* de fixação de N₂ no período noturno, justamente por não serem heterocitadas e dependerem de maiores taxas líquidas de respiração celular para possibilitar a atuação da enzima nitrogenase (Matsuda *et al.*, 2020). Neste último caso, a elevada luminosidade utilizada no experimento (200 µmol-fótons m⁻² s⁻¹) pode ter sido determinante para a obtenção de energia na fase clara, para ser utilizada no período noturno, o que intensificou a taxa de fixação de N₂.

Outro fator que também é citado como relevante para o processo de fixação de N_2 é a concentração extracelular de cianotoxinas, embora não foi incluído no presente estudo. Chia *et al.* (2019) mostraram que elevadas concentrações de anatoxina-a (25 µg L⁻¹) inibiram a fixação de N_2 em *Anabaena variabilis* (UTEX B377), principalmente devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por meio de enzimas oxidantes. As ERO são capazes de inibir a enzima nitrogenase (Berman-Frank; Lundegren; Falkwiski, 2003), o que prejudica a ocorrência da fixação biológica de N_2 .

Como a espécie *D. flosaquae* também possui o potencial de produção de anatoxina-a (Devlin *et al.*, 1977; Qian *et al.*, 2017), e as elevadas concentrações de P (3 mg-P L⁻¹) estimulam a produção dessa cianotoxina (Heath *et al.*, 2014), as condições do tratamento 0-P poderiam ter resultado nas baixas taxas de fixação de N₂, quando comparada com o

tratamento de mesma razão (0-N). Contudo, apenas uma análise molecular para observar a expressão gênica ou a análise de toxinas poderia corroborar essa hipótese.

Por outro lado, provavelmente a limitação por micronutrientes foi o principal fator que resultou nas baixas taxas de fixação de N_2 quantificadas no presente estudo. Isso porque a nitrogenase é uma enzima dependente de molibdênio (Mo) para a sua atuação, sendo que na ausência desse elemento o vanádio (V) também pode ser utilizado, no caso da nitrogenase V-dependente (Thiel, 2006). Como o meio de cultivo (ASM-1) utilizado no experimento é livre de Mo e de V, a fixação de N_2 pode ter sido limitada pela ausência desses micronutrientes. Nesse caso, a utilização do meio de cultivo BG-11 poderia ser uma alternativa para ter eliminado esse fator limitante.

Notadamente quando se trata sobre os gatilhos da fixação de N_2 , as primeiras hipóteses a serem estabelecidas estão relacionadas diretamente com a disponibilidade de N, de P e consequentemente a razão molar entre esses dois macronutrientes (N:P). Normalmente as razões NID:PID menores que 23:1 indicam que o N é o nutriente limitante para o crescimento do fitoplâncton de água doce (Sterner *et al.*, 2008). Apesar da razão N:P ótima para o crescimento do fitoplâncton variar conforme o gênero e espécie, principalmente devido às diferenças fisiológicas e adaptativas de cada um (Klausmeier *et al.*, 2004).

De qualquer forma, a ocorrência do processo de fixação de N_2 seria estimulada em baixas razões molares NID:PID, principalmente quando o N está indisponível para assimilação, como observado no presente trabalho (0-N, Figura 43) e também em outros estudos (Yema; Litchman; Pinto, 2016; He *et al.*, 2021; Osburn; Wagner; Scott, 2021).

Em um estudo recente, Osburn, Wagner e Scott (2021) também mostraram que em uma faixa de razões molares NID:PID entre 0,01 e 100, a fixação de N_2 foi favorecida nas menores razões (<10) em *D. flosaquae*. Contudo, os autores ressaltaram que a fixação de N_2 para essa espécie de cianobactéria provavelmente tem um elevado custo energético, a ponto de prejudicar as taxas de crescimento. Isso porque *D. flosaque* não atingiu o crescimento máximo em condições sem N, pois nessas condições as células tiveram que escolher entre manter a homeostase fisiológica (por meio da fixação de N_2) ou investir energia para o crescimento (Osburn; Wagner; Scott, 2021). Muito provavelmente as informações discutidas por Osburn, Wagner e Scott (2021) podem explicar o motivo pela qual as taxas de fixação de N_2 e as taxas de crescimento estimadas em *D. flosaquae* no presente estudo foram menores, quando comparadas com outras espécies.

Além das razões molares N:P, a concentração absoluta de P também tem mostrado ser um fator importante para possibilitar a fixação de N₂, devido a utilização de P no alto custo energético durante o processo de conversão do N₂ para NH₄⁺. Fernandez-Juarez *et al.* (2020) observaram que em *Halothece* sp. a fixação de N₂ foi indetectável sob baixas concentrações de PSR (3 μ g-P L⁻¹). No presente trabalho, quando as concentrações de PSR foram próximas a zero durante a fase estacionária (60-P, 23-P e 16-P, Figura 44), as taxas de fixação de N₂ também foram menores (p < 0,05), quando comparadas com as condições que ainda tiveram disponibilidade de P (10-NP, 4-P e 0-P, Figura 44). Wan *et al.* (2019), ao estudarem a espécie *D. flosaque*, mostraram que menores concentrações de PSR no meio de cultivo resultaram em maior gasto energético (em ATP). Este gasto energético seria necessário para a produção e atuação da enzima fosfatase alcalina extracelular (PAE), utilizada para obter P orgânico do meio externo, e assim manter as funções celulares. Nesse caso, o gasto de ATP para a manutenção da PAE prejudicaria a fixação de N₂.

Schoffelen *et al.* (2019) verificaram que a maior disponibilidade de P interfere diretamente na exsudação de N fixado pelas cianobactérias, o que impede o aumento das concentrações extracelulares de NH_4^+ . Isso se dá pelo fato das maiores concentrações de P favorecerem o ganho de biomassa das cianobactérias, fazendo com que o N seja utilizado para a composição estrutural das células (*e.g.* proteínas). Assim, o N fixado permanece dentro da célula. Nessa condição, as maiores concentrações de P também proporcionariam maiores taxas de fixação de N₂, justamente por meio desse processo de *feedback* positivo.

Em todos os tratamentos considerados no presente estudo, foi possível observar o decaimento das concentrações de PSR no meio de cultivo, principalmente nos quatro primeiros dias (diminuição de 50-90% da concentração inicial), antes da fase exponencial de crescimento (Figura 44). O mesmo não foi observado apenas para a condição de razão 0-P (PSR = 8,4 mg L⁻¹).

Na extrema razão 0-P não foi detectada a assimilação de P durante os 15 dias de experimento (Tabela 7, Figura 44), provavelmente devido à concentração utilizada (PSR = 8,4 mg L⁻¹). Como as taxas máximas de assimilação de P foram de até 107 x $10^{-4} \mu$ g-P μ g-Chl- a^{-1} h⁻¹, a diferença no decaimento das concentrações de P na magnitude de mg foi indetectável. Por outro lado, alguns trabalhos destacaram que o excesso de P pode ser tóxico para as algas. Elevadas concentrações de P (*e.g.* 15.000 μ g L⁻¹) resultaram em toxicidade fisiológica em alguns grupos fitoplanctônicos, incluindo a cianobactéria do gênero *Anabaena* (Fairchild; Lowe; Richardson, 1985). Lehman (1976) relatou que a inibição do crescimento de crisofíceas foi observada quando K₂HPO₄ foi utilizado como fonde de P no meio de cultivo (como no presente trabalho), quando comparado com a utilização de Na₂HPO₄. Neste caso, os autores discutiram que a toxicidade foi decorrente do excesso dos íons K⁺, e não

necessariamente do P. Esse efeito de toxicidade poderia prejudicar outros processos fisiológicos, além do crescimento desses microrganismos, como a própria assimilação de P e a fixação de N₂.

Desta forma, quando em concentrações não tóxicas, a disponibilidade de P e a menor disponibilidade de N favoreceram a fixação de N₂. Isso foi corroborado pelas maiores taxas de assimilação de P associadas às maiores taxas de fixação de N₂, quando a concentração inicial de P foi fixada (Experimento A, Tabela 7). Por outro lado, essa observação refutou a hipótese de que as maiores concentrações absolutas de P resultariam em maiores taxas de fixação de N₂, quando comparadas com as mesmas razões nas quais havia menor concentração de PSR.

Quando a concentração de N foi fixada (Experimento B), as médias das taxas de assimilação de P foram mais baixas durante a fase exponencial. Isso provavelmente ocorreu devido à maior assimilação de PSR nos dias iniciais do cultivo, nas condições com menor disponibilidade desse nutriente (razões 60-P, 23-P e 16-P, Figura 44).

As cianobactérias que assimilam rapidamente o P podem armazená-lo na forma de grânulos de polifosfato (Schoffelen *et al.*, 2018), que podem ser utilizados posteriormente como uma fonte de P quando as condições extracelulares tiverem escassez desse nutriente. Isso explicaria a rápida assimilação inicial de P antes da fase exponencial (Figura 44) nas condições com baixa concentração desse nutriente, que resultou em baixas taxas de assimilação de P durante a fase exponencial (Tabela 7). Contudo, o P assimilado ao longo dos primeiros dias de experimento possibilitou a ocorrência da fixação de N₂ durante a fase exponencial e até mesmo durante a fase estacionária do crescimento, provavelmente por essas cianobactérias utilizarem reservas similares aos grânulos de fosfato.

Apesar dessa provável correlação entre assimilação de P e fixação de N_2 , não são todas as espécies de cianobactérias que apresentam tal comportamento fisiológico. No gênero *Nodularia*, por exemplo, a fixação de N_2 é mais nitidamente correlacionada com as maiores taxas de assimilação de PID, enquanto que para *Dolichospermum* essa relação não foi tão evidente (Schoffelen *et al.*, 2018). Por outro lado, o gênero *Aphanizomenon* não demonstrou relações entre taxas de fixação de N_2 e assimilação de PID (Schoffelen *et al.*, 2018). Essa falta de correlação entre a assimilação de PID e a fixação de N_2 pode sugerir que esses gêneros obtêm P de outras fontes que não as inorgânicas dissolvidas, por exemplo, por meio das fosfatases (Štrojsová *et al.*, 2003).

Experimento A Fixação de N₂ Taxa de crescimento Assimilação de PSR Razão NID/PID $(x \ 10^{-4} \ \mu g - N \ \mu g - Chl - a^{-1} \ h^{-1})$ $(x \ 10^{-4} \ \mu g - P \ \mu g - Chl - a^{-1} \ h^{-1})$ (d^{-1}) 0 0,0788 18,02 47,9 4 0,1266 14,91 107,38 10 0,1248 17,38 65,3 16 0,2452 5,23 53,01 23 0,1283 4,92 25,9 0,1602 60 3,61 36,1 **Experimento B** Fixação de N₂ Assimilação de PSR Taxa de crescimento Razão NID/PID $(x \ 10^{-4} \ \mu g - N \ \mu g - Chla - a^{-1} \ h^{-1})$ $(x \ 10^{-4} \ \mu g - P \ \mu g - Chla - a^{-1} \ h^{-1})$ (**d**⁻¹) 0 0,0951 7,23 0 4 0,0974 7,77 66,6 10 17,38 65,3 0,1248 16 0,1149 7,74 3,0 23 0,0951 5,74 7,6 60 7,99 0 0,2138

Tabela 7 – Valores das taxas de crescimento de *Dolichospermum flosaquae*, das taxas relativas de fixação de N_2 e da taxa de assimilação de fósforo solúvel reativo (PSR) na fase exponencial do Experimento A, com variação das concentrações de N, e do Experimento B, com variação das concentrações de P

Para *D. flosaquae*, as menores razões molares NID:PID em ambos os tratamentos foram as que resultaram em maiores taxas de fixação de N₂ (p < 0,05). Porém, mesmo em razões molares maiores que 16:1 a fixação de N₂ também foi detectada, uma vez que a disponibilidade de PID foi elevada (> 20 μ g-P L⁻¹). Ao comparar as mesmas razões molares, mas com diferentes concentrações de NID e PID, as menores concentrações de NID proporcionaram a maior fixação de N₂. Desta forma, tanto a disponibilidade de N como a de P foram fatores fundamentais para o processo de fixação de N₂.

Estudar o comportamento de *D. flosaquae* sob diferentes condições nutricionais pode ter grande valor científico a ser aplicado na gestão de reservatórios, principalmente pelo fato de ser uma espécie comum nas florações de cianobactérias. Além disso, investigar os padrões da fixação de N_2 nessa espécie também pode contribuir para a compreensão desse processo dentro das florações de cianobactérias, em termos de frequência e intensidade, pois é um tema ainda não muito bem estabelecido na literatura (Osburn; Wagner; Scott, 2021). 136

Figura 44 – Resultados das concentrações de nitrato (NO_3^-, Δ) e fósforo solúvel reativo (PSR, •) ao longo do Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), do Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). As setas vermelhas indicam o momento no qual foi realizada a quantificação da fixação de nitrogênio



7 CONCLUSÕES

Nos experimentos *in situ* desenvolvidos nos reservatórios subtropicais, as taxas relativamente baixas de fixação de N₂ indicaram que esse processo não foi o principal mecanismo de obtenção de N pelo fitoplâncton nesses ambientes. Por outro lado, os limiares observados (temperatura $\geq 22^{\circ}$ C; PSR 3,0 $\geq \mu$ g-P L⁻¹; PT $\geq 20,5 \mu$ g-P L⁻¹; Chl- $a \geq 12,0 \mu$ g-Chl- $a L^{-1}$) não foram considerados atípicos ou incomuns de se encontrar em reservatórios subtropicais. Isso sugere que as condições físicas e químicas em tais reservatórios permitem a ocorrência da fixação de N₂ durante todo o ano, independente da sazonalidade. Além disso, a compartimentalização clássica entre ZR, ZT e ZL não foi observada para a fixação biológica do N₂, ou para qualquer outra variável da qualidade da água considerada como um limiar para esse processo. Isso porque os reservatórios estudados possuem dimensões e tempo de residência que não favoreceram a setorização horizontal, o que também facilitou a mistura completa da coluna d'água durante a maior parte do período amostrado.

A presença de cianobactérias potencialmente fixadoras de N_2 em considerável biovolume/densidade, incluindo as picocianobactérias, foi a principal condição para se detectar o processo de fixação nos reservatórios, podendo ser considerada uma premissa para a posterior análise das variáveis ambientais. Desta forma, as elevadas concentrações de P, de Chl-*a* e as menores razões molares N:P não foram, por si só, capazes de sustentar a ocorrência da fixação de N₂, caso a comunidade fitoplanctônica não fosse composta por microrganismos diazotróficos. Desta forma, como a ocorrência da fixação de N₂ depende necessariamente da presença de microrganismos diazotróficos na comunidade fitoplanctônica, a disponibilidade absoluta de P que beneficia as cianobactérias acaba por aumentar a probabilidade de ocorrência da fixação.

A partir dos experimentos laboratoriais com *Dolichospermum flosaquae*, verificou-se que as menores razões NID:PID favoreceram a fixação de N₂, sendo que a abstinência de N conjuntamente com a disponibilidade de P (> 20 µg-P L⁻¹) atuaram de forma sinérgica. Mesmo quando o N não foi um fator limitante para o crescimento (razões molares NID:PID \geq 23:1), a fixação de N₂ também foi viabilizada, devido à disponibilidade de PSR (> 20 µg-P L⁻¹). No entando, a menor disponibilidade de N ainda foi mais importante para aumentar as taxas de fixação de N₂ do que as maiores concentrações absolutas de P.

A associação das menores razões NID:PID e com o maior número de heterócitos somente foi observada na fase exponencial de crescimento nas razões molares com gradual aumento da concentração de PSR. Isso evidenciou que a formação do heterócito pode estar

diretamente relacionada com a disponibilidade de P, quando a disponibilidade de N foi fixada. Ao longo do processo de fixação de N_2 realizada por *D. flosaquae*, concluiu-se que a fase exponencial de crescimento foi o momento no qual ocorrem as maiores taxas relativas de fixação de N_2 , apenas no tratamento com menores concentrações absolutas de N (razão 0-N e 4N). Esse fato reforça que, em situações naturais, as taxas de fixação pelas cianobactérias em um lago ou reservatório podem ser subestimadas, dependendo da fase de crescimento em que elas se encontram.

O processo biológico da fixação de N_2 não deve ser estudado observando-se parâmetros isolados ou de forma linear, devido principalmente à sua elevada complexidade e a gama de fatores intervenientes associados. Há muito ainda o que investigar sobre o complexo processo da fixação de N_2 pelo fitoplâncton de água doce. Futuros estudos devem abordar linhas alternativas que também possuem relevância para a fixação de N_2 , como: bioquímica, análise molecular, estudos de competição interespecífica e vantagens simbióticas (*e.g.* no caso de diatomáceas que fixam N_2).

Desta forma, a identificação dos multifatores (*e.g.* fatores hidrodinâmicos, químicos, biológicos) responsáveis por estimular e controlar esse processo pode contribuir para a inibição e a remediação das extensas e frequentes florações de cianobactérias nos reservatórios tropicais e subtropicais. Nestes casos, a supressão do aporte de P nos ecossistemas aquáticos parece ter maior importância do que as fontes poluidoras contendo majoritariamente N, objetivando-se controlar as florações de cianobactérias e romper o processo de *feedback* positivo daquelas que fixam o N₂ atmosférico.

REFERÊNCIAS

ADLOFF, C. T. et al. Analysis of the phytoplankton community emphasizing cyanobacteria in four cascade reservoirs system of the Iguazu River, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 23, e6, 2018.

AMIRBAHMAN, A. et al. Relationship between hypolimnetic phosphorus and iron release from eleven lakes in Maine, USA. **Biogeochemistry**, v. 65, p. 369-386, 2003.

AMORIM, C. A.; DANTAS, E. W.; MOURA, A. N. Modeling cyanobacterial blooms in tropical reservoirs: The role of physicochemical variables and trophic interactions. **Science of the Total Environment**, v. 744, 2020.

ANA – Agência Nacional das Águas (Brasil). **HidroWeb:** sistemas de informações hidrológicas. Disponível em: http://www.snirh.gov.br/hidroweb/publico/apresentacao.jsf>. Acesso em: 29 jul. 2018.

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica. Banco de Informações de Geração (BIG). Disponível em: <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/energiaassegurada.asp>. Acesso em 28 jul. 2018.

APHA – American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WEF – Water Environment Federation. **Standard Methods for Examination of Water and Waste Water.** 22nd ed. Washington: American Public Health Association, 2012.

APONE, F.; OLIVEIRA, A. K.; GARAVELLO, J. C. Composição da ictiofauna do rio Quilombo, tributário do rio Mogi-Guaçu, bacia do alto rio Paraná, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 93-107, 2008.

ARAUJO, G. J. M.; BICUDO, C. E. M. **Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 6 – Euglenophyceae.** São Paulo: RiMa Editgora : FAPESP, 2018. 240 p.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Section 24.1. Nitrogenfixation: Microorganisms use ATP and a powerful reductant to reduce atmospheric nitrogen to ammonia, Biochemistry (5th ed.). W.H. Freeman. 2002.

BERGERSEN, F. J. Measurement of nitrogen fixation by direct means. **Methods for** evaluating biological nitrogen fixation. John-Willey & Sons: New York, p. 65-110, 1980.

BERGMAN, B. et al. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 139-185, 1997.

BERGMAN, B. et al. *Trichodesmium* – a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, p. 286-302, 2013.

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 157-164, 2003.

BERNHARD, A. The nitrogen cycle: processes, players, and human impact. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, 2010. Disponível em: < https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>. Acesso em: 27 set. 2021.

BERRENDERO, E. et al. Nitrogen fixation in a non-heterocystous Cyanobacterial mat from a mountain river. **Nature:** Scientific Reports, v. 6, 2016.

BEUTEL, M.W. et al. Hypolimnetic oxygenation pre-design study for a large eutrophic raw water reservoir, San Vicente Reservoir, CA. **Journal of Environmental Engineering**, v. 133, n. 2, p. 130-138. 2007.

BEVERSDORF, L. J.; MILLER, T. R.; McMAHON, K. D. The role of nitrogen fixation in cyanobacterial bloom toxicity in a temperate, eutrophic lake. **PLOS One**, v. 8, n. 2, e56103, 2013.

BHAYA, D. In the limelight: photoreceptors in cyanobacteria. **mBio**, v. 7, n. 3, e00741-16, 2016.

BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 32: Dinophyceae (famílias Dinococcaceae, Gymnodiniaceae e Hemidiniaceae). **Hoehnea**, v. 31, n. 1, p. 97-108, 2011.

BICUDO, C. E. M.; AZEVEDO, M. T. P.; CASTRO, A. A. J. **Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 4, parte 1 – Zygnemaphyceae.** São Paulo: RiMa Editora : FAPESP, 2014. 248 p.

BICUDO, C. E. M.; FAUSTINO, S.M.M.; GODINHO, L.R. **Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 4, parte 4 – Zygnemaphyceae.** São Paulo: RiMa Editora : FAPESP, 2018. 329 p.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil:** chave para identificação e descrições. 3. ed. São Carlos: RiMa, 2017. 552 p.

BICUDO, C. E. M.; SAMANEZ, I. M. **Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 4, parte 5 – Zygnemaphyceae.** São Paulo: RiMa Editora : FAPESP, 2016. 76 p.

BICUDO, C. E. M.; SCHETTY, S. P.; PINTO, L. S. C. **Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 4, parte 2 – Zygnemaphyceae.** São Paulo: RiMa Editora : FAPESP, 2015. 174 p.

BICUDO, D. C. et al. Ecology and distribution of Aulacoseira species (Bacillariophyta) in tropical reservoirs from Brazil. **Diatom Research**, v. 31, n 3, 2016. p. 199-215.

BOTHE, H. et al. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, p. 529-551, 2010.

BRANDÃO, L. H.; DOMINGOS, P. Fatores ambientais para a floração de cianobactérias tóxicas. **Saúde e ambiente em revista**, v. 1, n. 2, p. 40-50, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021: Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União: Brasília, n. 85 – Seção 1, 2021. 127 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000: Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF, 2001. 18 p.

BRASSAC, N. M.; LUDWIG, T. A. V. Fragilariaceae (Bacillariophyceae) de rios da bacia do Iguaçu, Estado do Paraná, Brasil. **Resvista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 3, p. 311-318, 2003.

BRAUER, V. S. et al. Low temperature delays timing and enhances the cost of nitrogen fixation in the unicellular cyanobacterium *Cyanothece*. **The ISME Journal**, v. 7, p. 2105-2115, 2013.

BREITBARTH, E.; OSCHLIES, A.; LAROCHE, J. Physiological constraints on the global distribution of *Trichodesmium* – effect of temperature on diazotrophy. **Biogeosciences Discussions**, v. 3, p. 779-801, 2006.

BRODY, S. R.; LOZIER, M. S.; DUNNE, J. P. A comparison of methods to determine phytoplankton bloom initiation. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 118, p. 2345-2357, 2013.

BRYHN, A. C.; BLENCKNER, T. Can nitrogen gas be deficient for nitrogen fixation in lakes? **Ecological Modelling**, v. 202, p. 362-372, 2007.

BURFORD, M. A.; McNEALE, K. L.; McKENZIE-SMITH, F. J. The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. **Freshwater Biology**, v. 51, p. 2143-2153, 2006.

CALIJURI, M. C.; DEBERDT, G. L. B.; MINOTI, R. T. A produtividade primária pelo fitoplâncton na Represa de Salto Alto (Americana-SP). In: HENRY, R. (ed). **Ecologia de reservatórios:** estrutura, função e aspectos sociais. Botucatu: FUNDIBIO, 2007. p. 109-148.

CALIJURI, M. C.; TUNDISI, J. G. Limnologia comparada das represas do Lobo (Broa) e Barra Bonita – Estado de São Paulo: mecanismos de fundamentos e bases para o gerenciamento. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 4, p. 893-913, 1990.

CAMPREGHER, R.; MARTINS, R. C. O "Modelo Broa" e a produção de conhecimento científico sobre o meio ambiente. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 40, p. 329-344, 2017.

CANTIN, A. et al. Effects of thermocline deepening on lake plankton communities. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 68, n. 2, p. 260-276, 2011.

CARMICHAEL, W. W. et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CARNEIRO, F. M.; BINI, L. M. Revisiting the concept of longitudinal gradients in reservoirs. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 32, e8, 2020.

CARVALHO, L. R. et al. Cyanobacterial occurence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga reservoirs, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 30, n. 1, p. 141-148, 2007.

CASTRO, A. A. J.; BICUDO, C. E. M. Flora ficológica do Estado de São Paulo – vol. 11 – Cryptophyceae. São Carlos: RiMa Editora, 2007. 136 p.

CAVALCANTE, H.; ARAÚJO, F.; BECKER, V. Phosphorus dynamics in the water of tropical semiarid reservoirs in a prolonged drought period. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 30, e105, 2018.

CAVALCANTE, K. P. et al. Diversity of freshwater dinoflagellates in the State o Paraná, Southern Brazil, with taxonomic and distributional notes. **Fottea, Olomouc**, v. 17, n. 2, p. 240-263, 2017.

CEPAGRI. A classificação climática de Köppen para ao Estado de São Paulo. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura [online]. Disponível em: < https://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html> Acesso em: 26 jul. 2018.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Norma Técnica L5.303 Fitoplâncton de água doce:** métodos qualitativo e quantitativo. São Paulo, 2012. 24 p.

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

CHIA, M. A. et al. The individual and combined effects of the cyanotoxins, anatoxin-a and microcystin-LR, on the growth, toxin production, and nitrogen fixation of prokaryotic and eukaryotic algae. **Toxins**, v. 11, n. 43, 2019.

COSTA, L. F. et al. **Taxonomy and ecology of** *Eunotia* **species** (Bacillariophyta) in **southeastern Brazilian reservoirs**. Verlag: Gebrüder Borntraeger Verlag, 2017. 302 p.

COTTINGHAM, K. L. et al. Cyanobacteria as biological drivers of lake nitrogen and phosphorus cycling. **Ecosphere**, v. 6, n. 1, 2015. doi: 10.1890/ES14-00174.1.

CUNHA, D. G. F. et al. Uptake rates of ammonium and nitrate by phytoplankton communities in two eutrophic tropical reservoirs. **International Review of Hydrobiology**, v. 102, n. 5-6, p. 125-134, 2017.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. Limiting factors for phytoplankton growth in subtropical reservoirs: the effect of light and nutrient availability in different longitudinal compartments. **Lake and Reservoir Management**, v. 27, p. 162-172, 2011.

CUNHA, D. G. F.; DODDS, W. K.; LOISELLE, S. A. Factors related to water quality and thresholds for microcystin concentrations in subtropical Brazilian reservoirs. **Inland Waters**, v. 8, n. 3, p. 368-380, 2018.

DE-CARLI, B. P. et al. Development of a zooplankton biotic index for trophic state prediction in tropical reservoirs. **Limnetica**, v. 38, n. 1, p. 303-316, 2019.

DESCY, J. –P. et al. Identifying the factors determining blooms of cyanobacteria in a set of shallow lakes. **Ecological Informatics**, 2016, doi:10.1016/j.ecoinf.2016.05.003.

DEVLIN, J. P. et al. Anatoxin-*a*, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h¹. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1367-1371, 1977.

DEXTRO, R. B.; MOUTINHO, F. H. M.; FREIRE-NORDI, C. S. Growth and special structure production of *Notsoc paludosum* (Nostocaceae, Cyanobacteria) under nutrient starvation and different light intensities. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 6, e2191, 2018.

DODDS, W. K.; WHILES, M. **Freshwater Ecology: Concepts & Environmental Applications of Limnology**. Chapter 14: Nitrogen, Sulfur, Phosphorus and Other Nutrients. 2nd ed. Academic Press, 2010. p. 345-373.

DOS SANTOS, A. C. A. **Heterogeneidade espacial e variabilidade temporal de dois reservatórios com diferentes graus de trofia no estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC USP), São Carlos. 225 f, 2003.

DOWNING, J. A. et al. The impact of accelerating land-use change on the N-cycle of tropical aquatic ecosystems: Current conditions and projected changes. **Biogeochemistry**, v. 46, p. 109-148, 1999.

DOYLE, R. D.; FISHER, T. R. Nitrogen fixation by periphyton and plankton on the amazon floodplain at Lake Calado. **Biogeochemistry**, v. 26, n. 1, p. 41-66, 1994.

DURAN, P. et al. Nitrogen processes in aquatic ecosystems. In: Sutton, M. A. et al. (eds.). **The European Nitrogen Assessment**. 2011. p. 126-146.

ELLIOTT, J. A. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change coul affect pelagic freshwater cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, p. 1364-1371, 2012.
EL-SHAARAWI, A.; MUNAWAR, M. Statistical evaluation of the relationships between phytoplankton biomass, chlorophyll *a*, and primary production in Lake Superior. **International Association of Great Lakes Research**, v. 4, n. 3-4, p. 433-455, 1978.

ESTEVES, F. A.; MEIRELLES-PEREIRA F. Eutrofização artificial. In: ESTEVES, F. A. (org). **Fundamentos de limnologia.** 3^a ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. p. 625-655.

FAIRCHILD, G. W.; LOWE, R. L.; RICHARDSON, W. B. Algal periphyton growth on nutrient-diffusing substrates: an in situ bioassay. **Ecology**, v. 66, n. 2, p. 465-472, 1985.

FELICIANO, A. L. P. **Caracterização ambiental, florística e fitossociológica de uma unidade de conservação. Caso de estudo: Estação Ecológica de São Carlos, Brotas SP.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos. 160 f, 1999.

FERBER, L.R. et al. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? **Freshwater Biology**, v. 49, 2004. p. 690-708.

FERNÁNDEZ-JUÁREZ, V. et al. Differential effects of varying concentrations of phosphorus, iron, and nitrogen in N_2 -fixing cyanobacteria. Frontiers in Microbiology, v. 11, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.541558.

FONSECA, B. M. et al. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 9-30, 2014.

FONSECA, B. M.; BICUDO, C. E. M. Phytoplankton seasonal variation in a shallow stratified eutrophic reservoir (Garças Pond, Brazil). **Hydrobiologia**, v. 600, p. 267-282, 2008.

FORBES, M. G. et al. Physical factors control phytoplankton production and nitrogen fixation in eight Texas reservoirs. **Ecosystems**, v. 11, p. 1181-1197, 2008.

GALLOWAY, J. N. The global nitrogen cycle: changes and consequences. **Environmental Pollution**, v. 102, n. 51, p. 15-24, 1998.

GIANESELLA-GALVÃO, S. M. F. Primary production in ten reservoirs in southern Brazil. **Hydrobiologia**, v. 122, p. 81-88, 1985.

GONZÁLEZ-PIANA, M. et al. Effects of wind mixing in a stratified water column on toxic cyanobacteria and microcystin-LR distribution in a subtropical reservoir. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 101, n. 5, p. 611-616, 2018.

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyng) de Bréb. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v. 15, p. 796-804, 1964.

GRAYSON, R. B. et al. Catchment-wide impacts on water quality: the use of 'snapshot' sampling during stable flow. **Journal of Hydrology**, v. 199, p. 121-134, 1997.

GU, B.; ALEXANDER, V. Estimation of N_2 fixation based on differences in the natural abundance of ¹⁵N among freshwater N_2 - fixing and non- N_2 -fixing algae. **Oecologia**, v. 96, p. 43-48, 1993.

GUEDES, G. H. S. et al. Artificial flow regime promotes abiotic and biotic gradients: Testing the concept of longitudinal zonation in an off-river reservoir. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 20, p. 256-264, 2020.

GUILDFORD, S. J.; HECKY, R. E. Total nitrogen, total phosphorus, and nutrient limitation in lakes and oceans: Is there a common relationship? **Limnology and Oceanography**, v. 45, n. 6, p. 1213-1223, 2000.

HALL, S. R. et al. Constraints on primary producer N:P stoichiometry along N:P supply ratio gradients. **Ecology**, v. 86, n. 7, p. 1894-1904, 2005.

HARRIS, D. C. Explorando a química analítica. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 550 p.

HE, H. et al. Vegetative cells may perform nitrogen fixation function under nitrogen deprivation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 based on genome-wide differential expression analysis. **PLOS One**, v. 16, n. 3, e0248155, 2021.

HEATH, M. W. et al. Effects of nitrogen and phosphorus on anatoxin-a, homoanatoxin-a, dihydroanatoxin-a and dihydrohomoanatoxin-a production by *Phormidium autumnale*. **Toxicon**, v. 92, p. 179-185, 2014.

HENRY, R. et al. Variação espacial e temporal da produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Jurumirim (rio Paranapanema, SP). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 571-590, 1998.

HERRERO, A; MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 411-425, 2001.

HILLEBRAND, H. et al. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. **Journal** of Phycology, v. 35, p. 403-424, 1999.

HODGMAN, C. D. et al. (eds). Handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data. 44. ed. Cleveland: CRP CO., 1962. 3604 p.

HORVÁTH, H. et al. Contribution of nitrogen fixation to the external nitrogen load of a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). **Hydrobiologia**, v. 702, n. 1, p. 255-265, 2013.

HOWARTH, R. W. et al. Nitrogen fixationin freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 1. Rates and importance. **Limnology and Oceanography**, v. 33, n. 4/2, p. 669-687, 1988.

HUTZINGER, O. **The Handbook of Environmental Chemistry** – The Natural Environmental and the Biogeo-chemical Cycles. Berlin: Springer-Verlag; New York: Heidelbert, 1982, v.1, part B.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia, Disponível em:< https://portal.inmet.gov.br/>. Acesso em 10 fev. 2021.

INOMURA, K. et al. Quantifying oxygen management and temperature and ligh dependencies of nitrogen fixation by *Crocosphaera watsonii*. American Society for Microbiology Journals, v. 4, n. 6, mSphere 4:e00531-19, 2019.

ISLAM, M. A.; BEARDALL, J. Growth and photosynthetic characteristics of toxic and nontoxic strains of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena circinalis* in relation to light. **Microorganisms**, v. 5, n. 45, 2017. doi:10.3390/microorganisms5030045

ISVÁNOVICS, V. et al. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in through flow cultures. **Freshwater Biology**, v. 43, p. 257-275, 2000.

JACINAVICIUS, F. R. et al. **Manual de cultivo de cianobactérias.** Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica – Núcleo de Ficologia, Manual Virtual, 2012. 32 p.

KIMMER, B. L.; GROEGER, A. W. Factors controlling primary production in lakes and reservoirs: a perspective. Lake and Reservoir Management, v.1, n. 1, p. 277-281, 1984.

KLAUSMEIER, C. A. et al. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. NATURE, v. 429, n. 6988, p.171-174, 2004.

KOMÁREK, J. Cyanoprokaryota 3. Heterocytous genera. In: BÜDEL, B.; GÄRTNER, G; KRIENITZ, L.; SCHAGERL, M. (Ed.). Süßwasserflora von Mitteleuropa/Freshwater flora for Central Europe 19/3. Heidelberg: Springer Spektrum Berlin, 2013. 1130 p.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. In: ETTL H.; GÄRTNER, G.; HEYNIG, H.; MOLLENHAUER, D. (Ed.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1.** Jena: Gustav Fischer; Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 1998. 548 p.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales. In: BÜDEL, B.; KRIENITZ, L.; GÄRTNER, G.; SCHAGERL, M. (Ed.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Heidelberg: Elsevier/Speltrum, 2005. 759 p.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. (Grünalgen). Ordiniung: Chlorococcales. In: HUBER-PESTALOZZI, G. **Das phytoplankton des süsswasers: systematic und biologie**, v. 7(1), E. Schwiezerbat'sche Verlagsbuch – handlung: Stuttgat, 1983. 1044 p.

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

KOSTEN, S. et al. Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. **Global Change Biology**, v. 18, p. 118-126, 2012.

KOVÁCS, A. W.; PRÉSING, M.; VÖRÖS, L. Thermal-dependent growth characteristics for *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanoprokaryota) at different light availabilities: methodological considerations. **Aquatic Ecology**, v. 50, n. 4, p. 623-638, 2016.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295-326, 2012.

KROMKAMP, J. Formation and functional significance of storage products in cyanobacteria. **N.Z. J. Marine and Freshwater Research**, v. 21, n. 3, p. 457-465, 1987.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. Journal of the American Statistical Association, v. 47, p. 583-621, 1952.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A.; GOLDEN, W. Cyanobacterial Heterocysts. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, a000315, 2009.

KUNZA, L. A.; HALL, R. O. Nitrogen fixation can exceed inorganic nitrogen uptake fluxes in oligotrophic streams. **Biogeochemistry**, v. 121, p. 537-549, 2014.

LEE, D-Y; RHEE, G-Y. Kinetics of growth and death in *Anabaena flos-aquae* (Cyanobacteria) under light limitation and supersaturation. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 700-709, 1999.

LEHMAN, J. T. Ecological and nutritional studies on *Dinobryon* Ehrenb.: Seasonal periodicity and the phosphate toxicity problem. **Limnology and Oceanography**, v. 21, p. 646-658, 1976.

LEHMKUHL, E. A. et al. Thalassiosirales (Diatomeae) da baía de Guaratuba, Estado do Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 2, p. 314-324, 2010.

LEWIS Jr, W. M. Biogeochemistry of tropical lakes. Verhandlungendes Internationalen Verein Limnologie, v. 30, p. 1595-1603, 2010.

LIMA, R. N. S. et al. Study of point and diffuse pollution in the Funil reservoir hydropower plant contribution basin using spatially distributed Geographic Information System modeling. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 139-150, 2016.

LIU, J. et al. Effect of iron and phosphorus on the microalgae growth in co-culture. **Archives of Microbiology**, 2020. doi.org/10.1007/s00203-020-02074-9.

LOBO, E.; LEIGHTON, G. Estructuras comunitárias de las fitocenosis planctónicas de los sistemas desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. **Revista de Biología Marina**, v. 22, n. 1, p. 1-29, 1986.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE-CREN, D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 143-170, 1958.

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water analysis: some revised methods for limnologists.** Freshwater Biological Association Scientific Publication n. 36, Kendal: Titus Wilson & Son Ltd., 1978. 120 p. MANICA, L. T.; TELLES, M.; DIAS, M.M. Bird richness and composition in a Cerrado fragment in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 2, p. 243-254, 2008.

MARAFÃO, G. A. F. **Estudo** *in situ* da fixação biológica de nitrogênio pelo fitoplâncton em reservatórios subtropicais (SP). Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos. 137 f, 2016.

MARCARELLI, A. M.; WURTSBAUGH, W. A. Effects of upstream lakes and nutrient limitation on periphytic biomass and nitrogen fixation in oligotrophic, subalpine streams. **Freshwater Biology**, v. 52, n. 11, p. 2211-2225, 2007.

MARCARELLI, A. M.; WURTSBAUGH, W. A. Temperature and nutrient supply interact to control nitrogen fixation in oligotrophic streams: An experimental examination. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 5, p. 2278-2289, 2006.

MARQUARDT, G. C.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 36: Bacillariophyceae (Cymbellales). **Hoehnea**, v. 41, n. 2, p. 209-246, 2014.

MASUDA, T. et al. Heterogeneous nitrogen fixation rates confer energetic advantage and expanded ecological niche of unicellular diazotroph populations. **Communications Biology**, v. 3, n. 172, 2020. doi.org/10.1038/s42003-020-0894-4.

McCARTHY, M. J. et al. Implications of water column ammonium uptake and regeneration for the nitrogen budget in temperate, eutrophic Missisquoi Bay, Lake Champlain (Canada/USA). **Hydrobiologia**, v. 718, p. 173-188, 2013.

MEDLIN, L. Evolution of diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. **Phycologia**, v. 55, n. 1, p. 79-103, 2016.

MEYER, M. Avaliação da biomassa de *Paspalum repens* Bergius submetida à flutuação do nível da água na represa Barra Bonita (zona de desembocadura do rio Capivara – SP). Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos. 123f, 1996.

MILES, C. O.; MELANSON, J. E.; BALLOT, A. Sulfide oxidations for LC-MS analysis of methionine-containing microcystins in *Dolichospermum flos-aquae* NIVA-CYA 656. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 13307-13315, 2014.

MIOTO, J. A. et al. Caracterização das Pequenas Centrais Hidrelétricas. In: CSPE – Comissão de Serviços Públicos de Energia (org). **Pequenas Centrais Hidrelétricas no estado de São Paulo.** 2. ed. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica, 2004. p. 1-229.

MONTOYA, J. P. et al. A Simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 986-993, 1996.

MORAES, M. A. B. et al. Influence of environmental factors on occurrence of cyanobacteria and abundance of saxitoxin-producing cyanobacteria in a subtropical drinking water reservoir in Brazil. **Water**, v. 13, n. 1716, 2021. doi: 10.3390/w13121716.

MORAIS, K. S. et al. Taxonomy and ecology of order Surirellales (Bacillariophyceae) in tropical reservoirs in Southeastern of Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 30, e204, 2018.

MORETI, L. O. R. et al. Spatial and temporal fluctuation of phytoplankton functional groups in a tropical reservoir. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 359-366, 2013.

MORRIS D. P.; LEWIS, W. M. Jr. Phytoplankton nutrient limitation in Colorado mountain lakes. **Freshwater Biology**, v. 19, p. 315-327, 1988.

MORRISON, A. M. et al. Receiver operating characteristic curve analysis of beach water quality indicator variables. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6405-6411, 2003.

MOUTIN, T. et al. Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. **Biogeosciences**, v. 5, n. 1, p. 95-109, 2008.

MOUTINHO, F. H. M. et al. Environmental factors and thresholds for nitrogen fixation by phytoplankton in tropical reservoirs. **International Review of Hydrobiology**, v. 106, p. 5-17, 2021.

MUHID, P.; BURFORD, M. A. Assessing nutrient limitation in a subtropical reservoir. **Inland Waters**, v. 2, p. 185-192, 2012.

MÜLLER, S.; MITROVIC, S. M. Phytoplankton co-limitation by nitrogen and phosphorus in a shallow reservoir: progressing from the phosphorus limitation paradigm. **Hydrobiologia**, v. 744, n. 1, p. 255-269, 2015.

NEN. **Nederlandse Norm 6520** – Water – Spectrophotometric determination of chlorophyll-a content. Netherlands, 2006.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. Archiv für Hydrobiologie (BeiheftErgebnisse der Limnologie), v. 14, p. 14-36, 1980.

OLIVEIRA, C. Y. B. et al. Phytoplankton responses to an extreme drought season: A case study at two reservoirs from a semiarid region, Northeastern Brazil. **Journal of Limnology**, v. 78, n. 2, p. 176-184, 2019.

OSBURN, F. S.; WAGNER, N. D.; SCOTT; J. T. Biological stoichiometry and growth dynamics of a diazotrophic cyanobacteria in nitrogen sufficient and deficient conditions. **Harmful Algae**, v. 103, 102011, 2021.

PAERL, H. W. Mitigating toxic planktonic cyanobacterial blooms in aquatic ecosystems facing increasing anthropogenic and climatic pressures. **Toxins**, v. 10, p. 1-16, 2018.

PAERL, H. W. Physiological ecology and regulation of N_2 fixation in natural waters. In: Atlas, R. M.; Jones, J. G.; Jørgensen, B. B. (eds.). Advances in microbial ecology (11th ed.). Plenum Press, 1990. pp. 305-344.

PEDROSA, C. S. G. et al. The cyanobacterial saxitoxin exacerbates neural cell death and brain malformations induced by Zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, e0008060, 2020.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

PEREIRA, J. P. F. A. **Caracterização morfométrica da bacia do reservatório do Lobo** (**Broa**) **Itirapina-SP/Brotas-SP e análise temporal dos usos da terra em sua área.** Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos. 46 f, 2013.

PERIOTTO, N. A.; TUNDISI, J. G. Ecosystem Services of UHE Carlos Botelho (Lobo/Broa): a new approach for management and planning of dams multiple-uses. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 3, p. 471-482, 2013.

PICCIN-SANTOS, V.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Toxic cyanobacteria in four Brazilian water supply reservoirs. **Journal of Environmental Protection**, v. 3, p. 68-73, 2012.

PINTO, P. D. T.; LITCHMAN, E. Interactive effects of N:P ratios and light on nitrogen-fixer abundance. **Oikos**, v. 119, p. 567-575, 2010.

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

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

PRIMAVESI, O. et al. **Microbacia hidrográfica do ribeirão Canchim: um modelo real de laboratório ambiental.** Boletim de Pesquisa, 5. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. 133 p.

PYLE, A. E.; JOHNSON, A. M.; VILLAREAL, T. A. Isolation, growth, and nitrogen fixation rates of the *Hemiaulus-Richelia* (diatom-cyanobacterium) symbiosis in culture. **PeerJ**, v. 8, e10115, 2020.

QIAN, Z-Y. et al. Using stable isotope labeling to study the nitrogen metabolism in *Anabaena flos-aquae* growth and anatoxin biosynthesis. **Water Research**, v. 127, p. 223-229, 2017.

QIN, B. et al. Why Lake Taihu continues to be plagued with cyanobacterial blooms through 10 years. **Science Bulletin**, v. 64, n. 6, p 354-356, 2019.

QUEIROZ, O. T. M. M. Impactos das atividades turísticas em área de reservatório: uma avaliação sócio-ambiental do uso e ocupação na área da Represa do Lobo, município de Itirapina, SP. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos. 290 f, 2000.

RABOUILLE, S. et al. Nitrogen fixation and respiratory electron transport in the cyanobacterium *Cyanothece* under different light/dark cycles. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, p. 630-638, 2014.

RAST, W.; HOLLAND, M. Eutrophication of lakes and reservoirs: a framework for making management decisions. **Ambio**, v. 17, n. 1, p. 2-12, 1988.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REDFIELD, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. **American Scientist**, v. 46, p. 205-222, 1958.

REYNOLDS, C. S. Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. **Freshwater Biology**, v. 14, n. 2, p. 111-142, 1984. RIBEIRO, M. S. F. et al. Detection of Cyanotoxin-Producing Genes in a Eutrophic Reservoir (Billings Reservoir, São Paulo, Brazil). **Water**, v. 12, n. 903, 2020. doi:10.3390/w12030903

RICHARDSON, J. et al. Effects of multiple stressors on cyanobacteria abundance vary with lake type. **Global Change Biology**, v. 24, p. 5044-5055, 2018.

ROCHA, A. C. R.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 25: Bacillariophyceae (Naviculales: Pinnulariaceae). **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 597-618, 2008.

RODRIGUES, E. H. C. et al. Phytoplankton, trophic state and ecological potential in reservoirs in the State of São Paulo, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 14, n. 5, e2428, 2019.

RODRIGUES, T. et al. Retrieving total suspended matter in tropical reservoirs within a cascade system with widely differing optical properties. **IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing**, v. 10, n. 12, p. 5495-5512, 2017.

RODRIGUEZ, I. B.; HO, T-Y. Diel nitrogen fixation pattern of *Trichodesmium*: the interactive control of light and Ni. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4445, p. 1-5, 2014.

ROMERO, I. C. et al. Potential trace metal co-limitation controls on N_2 fixation and NO_3^- uptake in lakes with varying trophic status. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00054.

ROUND, F. E. The biology of the algae. London: Edward Arnold (Publishers), 1965. 269 p.

SANDH, G. et al. Temporal separation of cell division and diazotrophy in the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* IMS101. **FEMS Microbiology** Letters, v. 295, p. 281-288, 2009.

SANT'ANNA, C. L. et al. **Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras.** Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia (SBFic), 2006. 58 p.

SANTOS, R. M. et al. Short-term thermal stratification and partial overturning events in a warm polymictic reservoir: effects on distribution of phytoplankton community. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 1, p. 19-29, 2015.

SÃO CARLOS (Município), Lei n. 18.053, de 19 de dezembro de 2016. Estabelece o Plano Diretor do Município de São Carlos, e dá outras providências. Diário Oficial de São Carlos, 28 de dezembro de 2016, São Carlos, Ano 8, n. 1003, 32p. Disponível em: <https://www.saocarlosoficial.com.br/diariooficial/001/DO_28122016_HNGB66.pdf>. Acesso em 26 jul. 2018.

SÃO PAULO (Estado), Decreto n. 20.960, de 8 de junho de 1983. Declara área de proteção ambiental regiões situadas em diversos municípios, dentre os quais Corumbataí, Botucatu e Tejupá. Diário Oficial do estado de São Paulo, 9 de junho de 1983, São Paulo, Secão 1, p. 1-2. Disponível em: < https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/1983/decreto-20960-08.06.1983.html>. Acesso em 27 jul. 2018.

SÃO PAULO (Estado), Decreto n. 58.237, de 20 de julho de 2012. Altera a denominação da unidade de conservação Estação Ecológica de São Carlos para Estação Ecológica Mata do Jacaré e dá providências correlatas. Disponível em: < https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2012/decreto-58237-20.07.2012.html>. Acesso em 20 jan. 2021.

SÃO PAULO (Estado), Lei n. 9.034, de 27 de dezembro de 1994. Dispõe sobre o Plano Estadual de Recursos Hídricos – PERH, a ser implantado no período 1994 e 1995, em conformidade com a Lei n. 7.663, de 30 de dezembro de 1991, que instituiu normas de orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos. Diário Oficial do estado de São Paulo, 28 de dezembro de 1994, São Paulo, Seção 1, p. 3-4. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/1994/lei-9034-27.12.1994.html>. Acesso em 27 jul. 2018.

SCHINDLER, D. W. et al. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. **PNAS**, v. 105, n. 32, p. 11254-11258, 2008.

SCHINDLER, D. W. Evolution of phosphorus limitation in lakes: Natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophied lakes. **Science**, v. 195, n. 4275, p. 260-262, 1977.

SCHOFFELEN, N. J. et al. Phosphate availability affects fixed nitrogen transfer from diazotrophs to their epibionts. **The ISME Journal**, v. 13, p. 2701-2713, 2019.

SCHOFFELEN, N. J. et al. Single-cell imaging of phosphorus uptake shows that key harmful algae rely on different phosphorus sources for growth. **Nature**: Scientific Reports, v. 8, n. 17182, 2018. doi:10.1038/s41598-018-35310-w.

SCOTT, J. T. et al. Are watershed and lacustrine controls on planktonic N_2 fixation hierarchically structured. **Ecological Applications**, v. 18, n. 3, p. 805-819, 2008.

SCOTT, J. T. et al. River-reservoir transition zones are nitrogen fixation hot spots regardless of ecosystem trophic state. **Hydrobiologia**, v. 625, p. 61-68, 2009.

SILVERMAN, S. N. et al. Morphological and isotopic changes of heterocystous cyanobacteria in response to N_2 partial pressure. **Geobiology**, p. 1-16, 2018.

SOARES, M. C. S. et al. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. **Hydrobiologia**, v. 717, p. 1-12, 2013.

SPRŐBER, P. et al. Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis* raciborskii under different nitrogen conditions. **Hydrobiologia**, v. 506-509, p. 160-174, 2003.

STAAL, M.; MEYSMAN, F. J. R.; STAL, L. J. Temperature excludes N₂-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 504-507, 2003.

STERNER, R. W. et al. Scale-dependent carbon: nitrogen: phosphorous seston stoichiometry in marine and freshwaters. **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 3, p. 1169-1180, 2008.

STRAŠKRABA, M. Retention time as a key variable of reservoir limnology. In: TUNDISI, J. G.; STRAŠKRABA, M. (eds). **Theoretical reservoir ecology and its applications.** Internacional Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers. 1999, p. 385-410.

STRAŠKRABA, M.; TUNDISI, J. G. **Gerenciamento da qualidade da água de represas**. 3^a ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2013. 300 p.

ŠTROJSOVÁ, A. et al. Seasonal study on expression of extracellular phosphatases in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 4, p. 295-306, 2003.

THEY, N. H.; AMADO, A. M.; COTNER, J. B. Redfield ratios in inland waters: higher biological control of C:N:P ratios in tropical semi-arid high water residence time lakes, **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01505.

THIEL, T. et al. A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 92, p. 9358-9362, 1995.

THIEL, T. Nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. In: Klipp, W.; Masepohl, B.; Gallon, J. R.; Newton, W. E. (eds.). Genetics and Regulation of Nitrogen Fixing Bacteria. 2006. p. 73-110.

THORNTON, K. W.; KIMMEL, B. L.; PAYNE, F. E. (eds). **Reservoir limnology:** ecological perspectives. New York: Wiley, 1990. 251 p.

TOEPEL, J. et al. Differential transcriptional analysis of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 during light-dark and continuous-light growth. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3904-3913, 2008.

TÕNNO, I.; NÕGES, T. Nitrogen fixation in a large shallow lake: Rates and initiation conditions. **Hydrobiologia**, v. 490, p. 23-30, 2003.

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

TUNDISI, J. G. et al. The response of Carlos Botelho (Lobo, Broa) reservoir to the passage of cold fronts as reflected by physical, chemical, and biological variables. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 1, p. 177-186, 2004.

TUNDISI, J. G. **Recursos hídricos no Brasil: problemas, desafios e estratégias para o futuro.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2014. 92 p.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. Limnologia. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 631 p.

UNREIN, F. et al. Phytoplankton response to pH rise in a N-limited floodplain lake: Relevance of N_2 -fixing heterocystous cyanobacteria. Aquatic Sciences, v. 72, n. 2, p. 179-190, 2010. UTERMÖHL, H. Zur vervollkomnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol., v. 9, p. 1-38, 1958.

UUSITALO, R.; YLI-HALLA, M.; TURTOLA, E. Suspended soil as a source of potentially bioavailable phosphorus in surface runoff waters from clay soils. **Water Research**, v. 34, n. 9, p. 2477-2482, 2000.

VANDERLEY, R. F. et al. Abiotic factors driving cyanobacterial biomass and composition under perennial bloom conditions in tropical latitudes. **Hydrobiologia**, v. 848, n. 8, p. 943-960, 2021.

VICENTIN, A. M. Is it possible to evaluate the ecological status of a reservoir? Acta Limnologica Brasiliensia, v. 30, e306, 2018.

VISSER, P. M. et al. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. **Harmful Algae**, v. 54, p. 145-159, 2016.

VREDE, T. et al. Effects of N:P loading rations on phytoplankton community composition, primary production and N fixation in a eutrophic lake. **Freshwater Biology**, v. 54, p. 331-344, 2009.

WAN, L. et al. Phosphorus strategy in bloom-forming cyanobacteria (*Dolichospermum* and *Microcystis*) and its role in their succession. **Harmful Algae**, v. 84, p. 46-55, 2019.

WANG, S. et al. Mutual dependence of nitrogen and phosphorus as key nutrient elements: one facilitates *Dolichospermum flos-aquae* to overcome limitation by the other. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 10, p. 5653-5661, 2018.

WANNICKE, N. et al. New perspectives on nitrogen fixation measurements using ${}^{15}N_2$ gas. Frontiers in Marine Science, v. 5, n. 120, p. 1-10, 2018.

WATANABE, F. et al. Mapping the chlorophyll-*a* horizontal gradient in a cascading reservoirs system using MSI Sentinel-2A images. **Advances in Space Research**, v. 64, n. 3, p. 581-590, 2019.

WERNER, V. R.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bloom-forming and other planktonic *Anabaena* (Cyanobacteria) morphospecies with twisted trichomes from Rio Grande do Sul State, Brazil. **Nova Hedwigia**, v. 89, n. 1-2, p. 17-47, 2009.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. Limnological analyses. New York: Springer Verlag, 1990. 391 p.

WHITE, A. E. The trouble with the bubble. Nature, v. 488, n. 7411, p. 290-291, 2012.

WHITTINGTON, J. et al. Growth of *Ceratium hirundinella* in a subtropical Australian reservoir: the role of vertical migration. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 6, p. 1025-1045, 2000.

WIDDEL, F. **Theory and measurement of bacterial growth**. Bremen: University Bremen. 2010.

WILLIS, A.; CHUANG, A. W.; BURFORD, M. A. Nitrogen fixation by the diazotroph Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanophyceae). **Journal of Phycology**, v. 52, n. 5, p. 854-862, 2016.

YANG, S. et al. Chlorophyll ratio analysis of the responses of algae communities to light intensity in spring and summer in Lake Erhai. **Environmental Earth Sciences**, 2015. doi: 10.1007/s12665-015-4140-1.

YANG, X. et al. Quantifying photosynthetic performance of phytoplankton based on photosynthesis–irradiance response models. **Environmental Sciences Europe**, v. 32, n. 24, 2020. doi.org/10.1186/s12302-020-00306-9.

YE, L.; CAI, Q. Spring phytoplankton blooms in Xiangxi Bay of Three-Gorges Reservoir: spatiotemporal dynamics across sharp nutrient gradients. **Journal of Freshwater Ecology**, v. 26, n. 1, p 11-18, 2011.

YEMA, L.; LITCHMAN, E.; PINTO, P. T. The role of heterocytes in the physiology and ecology of bloom-forming harmful cyanobacteria. **Harmful Algae**, v. 60, p. 131-138, 2016.

YU, Z. et al. Vertical distribution of diazotrophic bacterial community associated with temperature and oxygen gradients in a subtropical reservoir. **Hydrobiologia**, v. 741, n. 1, p. 69-77, 2014.

ZAGATTO, P. A.; ARAGÃO, M. A. **Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas.** São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Relatório Técnico. 1992. 23p.

160

ZAPOMĚLOVÁ, E. et al. Experimental comparison of phenotypical plasticity and growth demands of two strains from the *Anabaena circinalis/A. crassa* complex (cyanobacteria). **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 11, p. 1257-1269, 2008.

ZEHR, J. P.; CAPONE, D. G. Changing perspectives in marine nitrogen fixation. **Science**, v. 368, n. 729, eaay9514, 2020.

ZHANG, X. et al. Cyanobacterial nitrogen fixation influences the nitrogen removal efficiency in a constructed wetland. **Water**, v. 9, n. 865, 2017. doi:10.3390/w9110865.

ZHAO, L-S. et al. Nitrogen starvation impacts the photosynthetic performance of *Porphyridium cruentum* as revealed by chlorophyll a fluorescence. **Nature**: Scientific Reports, v. 7, n. 8542, 2017. doi:10.1038/s41598-017-08428-6.

ZULKELFI, N. S.; HWANG, S-J. Heterocyst development and diazotrophic growth of *Anabaena variabilis* under different nitrogen availability. **Life**, v. 10, n. 11, 2020. doi:10.3390/life10110279.

ANEXO A – Meio ASM-1

(Modificado de Gorham et al., 1964; Zagatto; Aragão, 1992)

1. Preparo do Meio ASM-1 (Concenttrado e Diluído 2,0%)

- Foram adicionados os volumes específicos das Soluções Estoque (A, B, C e D) da Tabela 1 em 900 mL de H₂O deionizada;
- O volume do meio concentrado foi completado com H₂O deionizada em balão volumétrico de 1 L;
- O pH foi corrigido para 7,4 com gotas de HCl (1M) ou NaOH (1M) (Jacinavicius *et al.*, 2012);
- O meio concentrado foi armazenado em freezer (-20°C);
- Para os experimentos, os meios foram descongelados e diluídos em água deionizada na proporção 1:50 v/v (2,0%), com o pH novamente corrigido para pH = 7,4 com gotas de HCl (0,001M) ou NaOH (0,001M);
- Os meios diluídos foram autoclavados em suas respectivas vidrarias por 30 min a 120°C;
- Após chegar à temperatura ambiente os meios diluídos foram utilizados para o inóculo das cianobactérias e realização dos experimentos.

rabela r	componentes pura eraboraça		
Soluções Estoque	Componente	Concentração na Solução Estoque (g L ⁻¹)	Volume adicionado para 1 L de meio
	NaNO ₃	8,500	
Saluaão A	MgSO ₄ .7H ₂ O	2,450	20.0 ml
Solução A	MgCl ₂ .6H ₂ O	2,050	20,0 IIIL
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,450	
Solução P	K ₂ HPO ₄	8,700	2.0 mI
Solução D	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	17,800	2,0 IIIL
	H ₃ BO ₃	28,400	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	13,900	
Solução C	FeCl ₂ .6H ₂ O	10,800	0.1 mI
Solução C	$ZnCl_2$	3,350	0,1 IIIL
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,190	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,014	
Solução D	$Na_2C_{10}H_{14}N_2O_8.2H_2O$ (EDTA)	18,600	0,4 mL

Tabela 1 – Componentes para elaboração do meio ASM-1 concentrado (volume final de 1 L)

2. Experimento A – Concentração fixa de P (Solução Estoque A modificada)

Para o Experimento A, foram preparadas 6 diferentes Soluções Estoque A, com alteração apenas nas massas de NaNO₃ para alcançar as razões NIP:PID desejadas (Tabela 2). Os volumes das soluções para cada 1 L de meio preparado foram os mesmos descritos na Tabela 1 (20 mL da Solução Estoque A para 1 L de meio concentrado).

	-		
Soluções Estoque A modificadas (g-NaNO ₃ L ⁻¹)	Razão Molar (NID:PID)	μ g-N L ⁻¹	μ g-P L ⁻¹
51,0	60	3.290	120
19,5	23 ⁽¹⁾	1.260	120
13,5	16 ⁽²⁾	870	120
8,5	$10^{(3)}$	550	120
3,4	4	220	120
0.1	0	6	120

Tabela 2 – Concentrações de NaNO₃ (g L⁻¹) nas diferentes Soluções Estoque A para atingir as diferentes razões molares modificadas para o experimento (A) com suas respectivas concentrações de N e P (μ g L⁻¹) no meio de cultivo final diluído a 2,0%

⁽¹⁾ Razão molar de Sterner et al. (2008); ⁽²⁾ Razão molar de Redfield (1958); ⁽³⁾ Razão molar original do meio ASM-1

3. Experimento B - Concentração fixa de N

Para o Experimento B, foram adicionados diferentes volumes da Solução Estoque B (Tabela 3) para 1 L do meio de cultivo concentrado, conforme as respectivas razões alvo.

Tabela 3 – Volumes da Solução Estoque B (para 1 L de meio concentrado) para atingir as diferentes razões molares para o experimento (B) com suas respectivas concentrações teóricas de N e P (μ g L⁻¹) no meio de cultivo final diluído a 2,0%

Solução Estoque B (mL L ⁻¹)	Razão Molar (NID:PID)	μ g-N L ⁻¹	μ g-Ρ L ⁻¹
0,335	60	550	20
0,870	23	550	50
1,250	16	550	75
2,000	10	550	120
5,000	4	550	300
150,000	0	550	9.085

ANEXO B – Dados das coletas em campo

Tabela 1 – Data, horário, temperatura do ar (T_{ar}) , radiação solar incidente (RSI) e condição climática no momento da coleta em cada ponto amostral distribuídos nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) de cada reservatório ao longo das estações do ano

Estação	Reservatório	Zona	Data e Horário	Horário	$T_{ar}(^{\circ}C)$	RSI (µmol-fótons m ⁻² s ⁻¹)	Condição climática
		ZR	22/08/17	09:30	13,5	3054	
	Lobo	ZT	22/08/17	10:05	16,0	3227	
		ZL	22/08/17	08:35	15,5	2690	
		ZR	24/08/17	09:05	18,5	2657	
	Santana	ZT	24/08/17	09:40	19,0	2921	
Inverno		ZL	24/08/17	10:15	21,0	2832	
		ZR	30/08/17	09:30	23,0	3053	
	29	ZT	30/08/17	08:55	21,0	2537	
		ZL	30/08/17	08:20	20,0	2677	
	Toixoino	ZR	04/09/17	08:35	20,0	3057	
	Terxeira	ZL	04/09/17	09:20	20,0	3066	
		ZR	23/10/17	08:15	17,5	276	
	Lobo	ZT	23/10/17	09:00	19,0	460	
		ZL	23/10/17	09:40	20,0	672	
		ZR	25/10/17	08:20	20,5	1135	
	Santana	ZT	25/10/17	08:50	22,0	2888	
Primavera		ZL	25/10/17	09:35	29,0	3200	
		ZR	30/10/17	09:10	24,0	1822	
	29	ZT	30/10/17	08:50	23,0	1535	
		ZL	30/10/17	08:15	22,0	1299	
	Teixeira	ZR	30/10/17	10:50	26,5	2629	
	теглена	ZL	30/10/17	10:15	26,0	1879	

Legenda:

 Ensolarado:
 Sol entre nuvens:
 Nublado:
 Chuva:

Estação	Reservatório	Zona	Data e Horário	Horário	T_{ar} (°C)	RSI (µmol-fótons m ⁻² s ⁻¹)	Condição climática
		ZR	22/01/18	07:15	20,0	490	
	Lobo	ZT	22/01/18	07:50	21,0	1150	
		ZL	22/01/18	08:35	23,0	2533	
		ZR	25/01/18	07:15	20,5	761	
	Santana	ZT	25/01/18	07:45	22,5	2691	
Verão		ZL	25/01/18	08:20	22,5	1201	
		ZR	05/02/18	08:15	23,0	2342	
	29	ZT	05/02/18	07:50	23,0	1965	
		ZL	05/02/18	07:15	20,5	933	
	Toivoire	ZR	05/02/18	09:55	23,0	1756	
	Теглена	ZL	05/02/18	09:20	21,5	2835	
	Lobo	ZR	23/04/18	08:20	21,0	2811	
	LUUU	ZT	23/04/18	09:00	23,0	2849	
		ZL	23/04/18	09:35	24,0	2910	
	Santana	ZR	25/04/18	07:55	18,0	2424	
	Santana	ZT	25/04/18	08:50	23,0	2613	
Outono		ZL	25/04/18	09:25	23,0	2764	
	29	ZR	02/05/18	08:55	22,0	2797	
	2)	ZT	02/05/18	08:25	21,0	2514	
		ZL	02/05/18	07:50	20,0	2157	
	Teiveira	ZR	02/05/18	10:30	21,0	2997	
	теглена	ZL	02/05/18	09:55	26,5	3024	

Tabela 1 (continuação) – Data, horário, temperatura do ar (T_{ar}), radiação solar incidente (RSI) e condição climática no momento da coleta em cada ponto amostral distribuídos nas zonas de rio (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) de cada reservatório ao longo das estações do ano

Legenda:

Ensolarado:	Sol entre nuvens:	Nublado:	Chuva:	

ANEXO C – Listas de táxons fitoplanctônicos identificados

Quadro 1 – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR),	transição
(ZT) e lacustre (ZL) do reservatório do Lobo ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)	

Decorrectório de Lobe			Inv	erno]	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Reservatorio do Lobo	Z	R	Z	T	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	T	Z	L
Táxon	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
BACILLARIOHYCEAE		1	1	r	1		1	r	r	1	r	1	1						r			r	r	
Achnanthidium sp.	Х																							
Cymbellopsis sp.									Х	Х	Х	Х												
Eunotia karenae Metzeltin & Lange-Bertalot					Х																			1
Eunotia pseudosudetica Metzeltin. Lange-Bertalot & García-Rodríguez													х											
Eunotia sp.			Х				Х	Х										Х	Х					ĺ
Eunotia tukanorum Wetzel & D.Bicudo								Х																1
Fragilaria crotonensis Kitton				Х																				
Fragilaria sp.									Х															1
Fragilariforma sp.																			Х					
Gomphonema hawaiiense E.Reichardt	Х	Х																						
Gomphonema parvulum var. lagenula (Kützing) Freguelli	Х		Х	Х	Х						Х	Х												
Navicula sp.						Х	Х																	1
Nupela sp.					Х													Х						1
Pinnularia divergens var. malayensis Hustedt										Х														1
Pinnularia sp.	Х																							1
Placoneis sp.								Х																
Psammothidium sp.								Х	Х		Х	Х	Х											1
Surirella linearis var. constricta Grunow			Х								Х								Х					1
Surirella linearis W.Smith																			Х					
Surirella splendida (Ehrenberg) Kützing																			Х	Х				ĺ
CHLOROPHYCEAE																								
Chlamydomonas sp.	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х

Degenvetárie de Lebe			Inve	erno]	Prim	avera	a				Ve	rão					Out	ono		
Reservatorio do Lobo	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Chlorolobium sp.																				Х	Х	Х	Х	Х
Coelastrum sp.																					Х			
Desmodesmus intermedius (Chodat) E.Hegewald								Х																
Eutetramorus fottii (Hindák) Komárek																			Х				Х	X
Pseudodidymocystis fina (Komárek) E.Hegewald & Deason							Х	Х	Х	Х				Х	Х				х					
Raphidocelis danubiana (Hindák) Marvan. Komárek & Comas													Х			Х	Х							
Vitreochlamys sp.													Х		Х									
CHRYSOPHYCEAE																								
Chrysococcus sp.							Х	Х				Х	Х			Х	Х	Х	Х			Х	Х	X
Dinobryon bavaricum Imhof var. bavaricum			Х		Х	Х							Х	Х	Х	Х			Х			Х		Х
Mallomonas caudata (Ivanov) Iwanoff													Х											
Mallomonas crassisquama (Asmund) Fott												Х												
COSCINODISCOPHYCEAE																								
Acanthoceras sp.																			Х					
Aulacoseira ambigua (Grunow) Simonsen	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х		Х	Х				
Aulacoseira granulata var. angustissima (O.Müller) Simonsen	х				Х						Х								х					
Aulacoseira granulata var. australiensis (Grunow) Moro						Х	Х		Х	Х	Х								х	х			Х	Х
Aulacoseira granulata var. granulata (Ehrenberg) Simonsen						Х	Х			Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
Aulacoseira pusilla (F.Meister) A.Tuji & A.Houki	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	х	Х	Х	х	Х	Х	х	х	Х	Х	Х	Х
Cyclotella meneghiniana Kützing				Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
Discotella sp.	Х	Х																						
Urosolenia eriensis var. morsa (West & G.S.West) Poulin						Х										Х								Х

Quadro 1 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório do Lobo ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 1 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório do Lobo ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Deservatória da Laba			Inv	erno)			F	Prim	avei	ra				Ve	rão					Out	tono	,	
Reservatorio do Lobo	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %										
СКУРТОРНУСЕАЕ													<u> </u>											
Cryptomonas marssonii Skuja							Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
Cryptomonas sp.															Х	Х							Х	
Rhodomonas lacustris Pascher & Ruttner	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х
CYANOBACTERIA																								
Aphanizomenon gracile Lemmermann											Х	Х												
Aphanizomenon sp.				Х					Х															
Aphanocapsa annulata G.B.McGregor						Х		Х																
Aphanocapsa delicatissima West & G.S.West											Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х						
Aphanocapsa elachista West & G.S.West																			Х		Х	Х	Х	Х
Aphanocapsa holsatica (Lemmermann) G.Cronberg & Komárek																			Х	Х	Х	Х	Х	Х
Eucapsis sp.																						Х		
Geitlerinema amphibium (C.Agardh ex Gomont) Anagnostidis			Х																Х	Х		Х		Х
Gloeothece sp.	Х		Х		Х		Х				Х	Х		Х		Х	Х	Х						
Limnococcus limneticus (Lemmermann) Komárková. Jezberová. O.Komárek & Zapomelová										Х														х
Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing			Х																					
Microcystis protocystis W.B.Crow											Х	Х												
Raphidiopsis raciborskii (Woloszynska) Aguilera. Berrendero Gómez. Kastovsky. Echenique & Salerno	X				X								Х											
Rhabdoderma sp.		Х																						
Synechocystis aquatilis Sauvageau	Х	Х	Х	Х	Х											Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
DINOPHYCEAE														-	-				-					
Ceratium furcoides (Levander) Langhans		Х			Х	Х			Х	Х	Х		Х		Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х	Х

Decementária de Labo			Inve	erno]	Prim	avera	a				Ve	rão					Out	ono		
Reservatorio do Lobo	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	ĽL	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Glochidinium penardiforme (Er.Lemmermann) Boltovskoy													Х		Х	Х	Х	Х				Х		Х
Gymnodinium fuscum (Ehrenberg) F.Stein		Х	Х	Х	Х		Х			Х	Х	Х			Х	Х	Х	Х	Х	х	Х	Х	Х	Х
Peridinium gatunense Nygaard	Х	Х	Х			Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х
Sphaerodinium sp.	Х																		Х					
EUGLENOPHYCEAE																								
Cryptoglena sp.	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х						Х	Х		Х	Х	Х	Х		Х			
Lepocinclis ovum (Ehrenberg) Lemmermann	Х			Х		Х	Х						Х						Х					
Strombomonas urceolata (A.Stokes) Deflandre		Х																						
Trachelomonas volvocinopsis Svirenko													Х											
KLEBSORMIDIOPHYCEAE	•			•		•	•	•			•								•	•	•			
Elakatothrix sp.																						Х		Х
Klebsormidium sp.	Х																							
PRASINOPHYCEAE																								
Pedinomonas sp.													Х											
TREBOUXIOPHYCEAE																								
Botryococcus braunii Kützing	Х																		Х	Х		Х		
Botryococcus terribilis Komárek & Marvan																					Х			
Closteriopsis sp.	Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х					Х							Х		Х	Х
Lemmermannia komarekii (Hindák) C.Bock & Krienitz	х									Х		Х												
Oocystis borgei J.W.Snow	Х																							
ZYGNEMATOPHYCEAE																								
Cosmarium obsoletum (Hantzsch) Reinsch												Х												

Quadro 1 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório do Lobo ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 2 – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Deserve tinte Constants			Inv	erno)			I	Prim	avei	ra				Ve	rão					Out	tono		
Reservatorio Santana	Z	ZR (Z	Т	Z	Ĺ	Z	ZR .	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
BACILLARIOHYCEAE	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70	70		70	/0		70	70
Achnanthidium sp.										Х			Х								X			
Adlafia drouetiana (R.M.Patrick) Metzeltin & Lange-Bertalot																							Χ	
Encyonema silesiacum (Bleisch) D.G.Mann						Х												Х	Х	Х		Х	Х	
Eunotia longicamelus L.F.Costa. D.C.Bicudo & C.E.Wetzel							Х																	
Eunotia pseudosudetica Metzeltin. Lange-Bertalot & García-Rodríguez							Х					Х												
Eunotia sp.	Х	Х		Х	Х				Х						Х							Х		
Fragilaria capucina var. fragilarioides (Grunow) Ludwig & Flores													Х											
Fragilaria delicatissima (W.Smith) Lange-Bertalot						Х																		
Fragilaria sp.	Х			Х			Х					Х					Х	Х					Х	
Geissleria sp.		Х	Х		Х								Х			Х								
Gomphonema gracile Ehrenberg			Х		Х					Х														
Gomphonema parvulum (Kützing) Kützing																	Х					Х		
Navicula neomundana (Lange-Bertalot & Rumrich) Lange-Bertalot. Jarlman & van de Vijver		Х																				X		
Navicula sp.		Х				Х					Х			Х	Х	Х			Х	Х			Х	Х
Pinnularia dactylus Ehrenberg		Х						Х		Х														
Pinnularia sp.		Х														Х								
Psammothidium sp.					Х																			
Rhoicosphenia sp.						Х								Х	Х									
Stauroneis alabamae Heiden													Х							Х				
Surirella guatimalensis Ehrenberg		Х								Х														
Surirella linearis var. constricta Grunow									Х															
Surirella splendida (Ehrenberg) Kützing		Х																						1

Deservatória Santana			Inv	erno	-]	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Keservatorio Santana	Z	ZR (Z	T	Z	ĽL	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	T	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
CHLOROPHYCEAE																								
Ankistrodesmus stipitatus Komárková-Legnerová																		X					Х	
Carteria saopaulensis Skvortzov										Х	Х				Х	Х	Х							Х
Chlamydomonas sp.	Х	Х	Х	Х		Х	Х			Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х	Х
Chlorogonium sp.			Х																					
Chlorolobium sp.							Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х		Х	Х	Х	Х		
Chlorotetraedron incus (Teiling) Komárek & Kovácik				Х																				
Coelastrum microporum Nägeli																							Х	
Coelastrum proboscideum Bohlin														Х								Х		
Coelastrum reticulatum (P.A.Dangeard) Senn																				Х	Х		Х	
Desmodesmus brasiliensis (Bohlin) E.Hegewald												Х		Х										
Desmodesmus communis (E.Hegewald) E.Hegewald												Х								12	14			-
Desmodesmus denticulatus (Lagerheim) S.S.An. T.Friedl & E.Hegewald										Х														
Desmodesmus denticulatus var. linearis (Hansgirg)																	Х							
Desmodesmus intermedius (Chodat) E.Hegewald							Х																	
Desmodesmus opoliensis var. carinatus (Lemmermann) E.Hegewald																				Х				
Desmodesmus subspicatus (Chodat) E.Hegewald & A.W.F.Schimidt											Х								х				х	
Eutetramorus fottii (Hindák) Komárek										Х													Х	
Monoraphidium arcuatum (Korshikov) Hindák						Х						Х				Х	Х			Х	Х	Х	Х	
Monoraphidium contortum (Thuret) Komárková-Legnerová						Х							Х											
Monoraphidium flexuosum Komárek								Х																
Monoraphidium griffithii (Berkeley) Komárková-Legnerová																		Х						

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Primavera Verão Inverno Outono **Reservatório Santana** ZR ZT ZL ZR ZT ZL ZR ZT ZL ZR ZT ZL 50 50 10 50 50 10 50 10 50 10 50 50 10 50 50 50 10 10 10 10 50 10 10 10 Táxon % Х Monoraphidium indicum Hindák Х Х Pseudodidymocystis fina (Komárek) E.Hegewald & Deason Х Х Х Х Х Х Х Х Х Raphidocelis sp. Scenedesmus acunae Comas Gonzáles Х Х Х Х Х Selenastrum bibraianus Reinsch Х Tetrastrum sp. Х Westella botryoides (West) De Wildeman CHRYSOPHYCEAE Х Chromulina sp. Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Dinobryon bavaricum Imhof var. bavaricum Dinobryon divergens var. schauinslandii (Lemmermann) Х Brunnthaler Х Х Dinobryon sertularia var. sertularia Ehrenberg Х Х Mallomonas caudata (Ivanov) Iwanoff Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Mallomonas crassisquama (Asmund) Fott Х COSCINODISCOPHYCEAE Х Х Х Х Х Х Х Х Aulacoseira ambigua (Grunow) Simonsen Aulacoseira granulata var. angustissima (O.Müller) Х Х Х Х Х Х Simonsen Х Х Х Aulacoseira granulata var. australiensis (Grunow) Moro Х Aulacoseira granulata var. granulata (Ehrenberg) Simonsen Х Aulacoseira pusilla (F.Meister) A.Tuji & A.Houki Cyclotella meneghiniana Kützing Х Х Х Х Х Х Х Х Х Х Cyclotella striata (Kützing) Grunow

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Description of the second			Inv	erno)			F	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Keservatorio Santana	Z	ZR (Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Discotella stelligera (Cleve & Grunow) Houk & Klee												Х				Х	Х		Х	Х		Х	Х	Х
СКУРТОРНУСЕАЕ																						,		
Chryptochrysis sp.													Х											
Cryptomonas marssonii Skuja	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
Cryptomonas obovata Skuja					Х																Х	Х	Х	
Cryptomonas platyuris Skuja																					Х			
Rhodomonas lacustris Pascher & Ruttner	Х	Х	Х	Х	Х		Х			Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		
Rhodomonas minuta var. nannoplanktica Skuja																		Х						
CYANOBACTERIA															1									
Aphanizomenon sp.		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	X	Х	Х												
Aphanocapsa annulata G.B.McGregor															Х									
Aphanocapsa delicatissima West & G.S.West			Х																					
Aphanocapsa elachista West & G.S.West	Х	Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х				Х
Aphanocapsa holsatica (Lemmermann) G.Cronberg & Komárek		Х	Х												Х		Х		Х					Х
Bacularia sp.																Х				Х				
Coelomoron microcystoides Komárek	Х																							
Dolichospermum sp.																	Х							
<i>Epigloeosphaera brasilica</i> Azevedo. Sant'Anna. Senna. Komárek & Komárková																Х	x	X						Х
Geitlerinema sp.				Х																Х				Х
Gloeothece sp.				Х		Х			Х															
Komvophoron schmidlei (Jaag) Anagnostidis & Komárek																Х								
<i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková. Jezberová. O.Komárek & Zapomelová									Х														Х	

			Inv	erno)		Ī	F	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Reservatorio Santana	Z	ZR	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	T	Z	ĽL	Z	R	Z	T	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Limnothrix sp.	, .	, .							,.			,.	X	X		X	,,,	,.	,.					
Merismopedia glauca Lemmermann				Х																				
Merismopedia tenuissima Lemmermann												Х											Х	
Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing				Х																				
Microcystis protocystis W.B.Crow		Х			Х											Х			Х			Х		
Phormidium sp.																			Х					
Planktolyngbya brevicellularis G.Cronberg & Komárek																Х	Х						Х	
Planktolyngbya sp.	Х	Х					Х							Х		Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	
Planktothrix isothrix (Skuja) Komárek & Komárková	Х															Х								
Pseudanabaena catenata Lauterborn		Х	Х			Х			Х		Х		Х	Х	Х			Х	Х	Х		Х		
Pseudanabaena mucicola (Naumann & Huber-Pestalozzi) Schwabe																		Х						
Rhabdoderma lineare Schmidle & Lauterborn																Х					Х			
Romeria victoriae Komárek & Cronberg	Х				Х					Х												Х		
Synechococcus nidulans (Pringsheim) Komárek																			Х					
Synechocystis aquatilis Sauvageau	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х		Х			
DINOPHYCEAE	•					•	•		•							•			•	•				
Ceratium furcoides (Levander) Langhans	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х												
Glochidinium penardiforme (Er.Lemmermann) Boltovskoy					Х						Х	Х			Х	Х								
Gymnodinium fuscum (Ehrenberg) F.Stein							Х		Х	Х	Х	Х					Х		Х		Х			
Hemidinium brasiliense C.E.M.Bicudo & Skvortsov	Х		Х						Х	Х	Х		Х	Х		Х								
Karlodinium micrum (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen						Х						Х		Х	Х		Х						Х	Х
<i>Parvodinium umbonatum/inconspicuum</i> complexo citado por Cavalcante et al. (2017)																		X					X	
Peridinium gatunense Nygaard	Х	Х	Х	Х														Х		Х	Х			

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Degementárie Contone			Inv	erno	-			I	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Reservatorio Santana	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %
Sphaerodinium sp.			Х	Х	Х	Х	Х								Х	Х								
EUGLENOPHYCEAE		<u> </u>					I		I															
Astasia cylindrica Pringsheim					Х					Х														
Cryptoglena skujae Marin & Melkonian	Х		Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х			Х	Х				
Euglena geniculata Dujardin														Х	Х									
<i>Euglena</i> sp.	Х					Х					Х	Х		Х					Х	Х	Х	Х	Х	Х
Lepocinclis sp.												Х												
Phacus sp.										Х														
Trachelomonas cylindrica var. decollata Playfair																							Х	
Trachelomonas hispida (Perty) F.Stein												Х												
Trachelomonas volvocina (Ehrenberg) Ehrenberg																		Х		Х				
Trachelomonas volvocinopsis Svirenko	Х				Х		Х																	
KLEBSORMIDIOPHYCEAE																								
Elakatothrix sp.																					Х			
TREBOUXIOPHYCEAE																								
Actinastrum aciculare var. aciculare f. minimum (Huber- Pestalozzi) Compère	Х																							
Botryococcus braunii Kützing														Х										ĺ
Chlorella vulgaris Beyerinck (Beijerinck)				Х							Х		Х	Х			Х	Х						ĺ
Closteriopsis acicularis (Chodat) J.H.Belcher & Swale													Х	Х			Х					Х		ĺ
Golenkiniopsis sp.							Х																	ĺ
Hindakia tetrachotoma (Printz) C.Bock. Proschold & Krienitz								Х																
Koliella sp.							Х				Х													
Lemmermannia komarekii (Hindák) C.Bock & Krienitz		Х		Х				Х					Х			Х				Х				

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 2 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Santana ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Pocomustário Sontono			Inv	erno				I	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	ono		
Keservatorio Santana	Z	R	Z	T	Z	L	Z	R	Z	T	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Lemmermannia punctata (Schmidle) C.Bock & Krienitz			Х																					
Mucidosphaerium pulchellum (H.C.Wood) C. Bock. Proschold & Krienitz						Х	X																	
Oocystis borgei J.W.Snow															Х						Х			Х
ZYGNEMATOPHYCEAE																								
Closterium pusillum Hantzsch																Х					Х			
Closterium setaceum Ehrenberg ex Ralfs																					Х			
Desmidium aequale West & G.S.West	Х							Х												Х				
Euastrum denticulatum var. quadrifarium Willi Krieger			Х																					
Hyalotheca dissiliens (Smith) Brébisson var. dissiliens										X														
Staurastrum laeve var. laeve Ralfs																Х								
Staurastrum muticum Ralfs																Х					Х	Х		
Staurastrum nudibrachiatum Borge		Х																						
Staurastrum paradoxum Meyen ex Ralfs																		Х					Х	
Teilingia granulata (J.Roy & Bisset) Bourrelly															Х									

Describe 20			Inv	erno					Prim	avera	a				Ve	rão					Out	iono		
Reservatorio 29	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
BACILLARIOHYCEAE	,,,			, -	, -	,,,		, -	, -	, .	, -	,,,	,,,	,.				,,,	, -	, -				, .
Chamaepinnularia sp.																						X		
Cocconeis sp.										Х														
Eunotia sp.			Х																					
Fragilaria sp.	Х	Х	Х	Х	Х																			Х
Gomphonema lagenula Kützing																Х								
Kobayasiella sp.	Х		Х																					
Navicula sp.	Х			Х													Х							
Pinnularia sp.																Х								
Surirella linearis var. constricta Grunow			Х														Х							
CHLOROPHYCEAE		•				•						•						•						
Chlamydomonas sp.	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х		Х
Chlorolobium sp.									Х	Х	Х		Х			Х	Х	Х		Х				Х
Dangeardinia sp.																Х								
Desmodesmus maximus (West & G.S.West) Hegewald	Х																							
Monoraphidium arcuatum (Korshikov) Hindák	Х	Х				Х									Х									
Monoraphidium indicum Hindák				Х																				
Scenedesmus acunae Comas Gonzáles	Х																							
Sphaerocystis schroeteri Chodat													Х	Х	Х	Х		Х	Х					
CHRYSOPHYCEAE																								
Chrysococcus sp.		Х	Х	Х	Х																			
Dinobryon divergens var. schauinslandii (Lemmermann) Brunnthaler	Х	X	Х	Х	Х	Х																		
Mallomonas caudata (Ivanov) Iwanoff	Х				Х	Х	Х														Х			

Quadro 3 – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório 29 ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 3 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório 29 ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Deconvetório 20			Inv	erno)			P	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Reservatorio 29	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	ĽL	Z	R	Z	Т	Z	Ľ	Z	R	Z	Т	Z	L
Táxon	50 %	10 %																						
Mallomonas crassisquama (Asmund) Fott	Х			Х												Х		Х			Х	Х		
Mallomonas rhombica G.Cronberg	Х				X																			
Ochromonas sp.						Х																		
Sphaleromantis sp.	Х	Х	Х																					
COSCINODISCOPHYCEAE																								
Aulacoseira ambigua (Grunow) Simonsen	Х																							
Cyclotella meneghiniana Kützing	Х	Х	Х		Х	Х						Х	Х											
Discotella stelligera (Cleve & Grunow) Houk & Klee	Х		Х	Х	Х	Х									Х	Х	Х	Х						
СКУРТОРНУСЕАЕ																								
Cryptomonas marssonii Skuja	Х	Х	Х	Х		Х			Х	Х		Х	Х	Х		Х	Х		Х	Х	Х	Х		Х
Cryptomonas obovata Skuja	Х		Х	Х	Х		Х			Х			Х						Х					
Cryptomonas platyuris Skuja	Х								Х								Х							
Rhodomonas lacustris Pascher & Ruttner				Х									Х		Х	Х				Х		Х	Х	
CYANOBACTERIA																								
Ancylothrix sp.																								Х
Aphanocapsa delicatissima West & G.S.West							Х	Х	Х	Х														
Aphanocapsa elachista West & G.S.West	Х	Х		Х																				
Aphanocapsa holsatica (Lemmermann) G.Cronberg & Komárek		Х		Х																				
Epigloeosphaera brasilica Azevedo. Sant'Anna. Senna. Komárek & Komárková	х	Х	X	Х	Х	Х	Х	Х																
Eucapsis sp.																				Х				
Geitlerinema sp.	Х	Х	Х	Х																				
Limnococcus limneticus (Lemmermann) Komárková. Jezberová. O.Komárek & Zapomelová																	Х							
Limnothrix sp.	Х																							ĺ

Inverno Primavera Verão Outono **Reservatório 29** ZR ZT ZL ZR ZT ZL ZR ZT ZL ZR ZT ZL 50 10 50 50 10 50 10 50 10 50 10 50 10 50 10 50 10 50 10 50 50 10 10 10 Táxon % Х Х Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing Х Microcystis protocystis W.B.Crow Planktolyngbya brevicellularis G.Cronberg & Komárek Х Planktolyngbya sp. Х Х Х Pseudanabaena limnetica (Lemmermann) Komárek Х Х Romeria victoriae Komárek & Cronberg Х Х Synechocystis aquatilis Sauvageau DINOPHYCEAE Karlodinium micrum (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen Х Х Х Х Х Parvodinium umbonatum/inconspicuum complexo citado por Х Х Х Х Х Х Cavalcante et al. (2017) Х Peridinium gatunense Nygaard EUGLENOPHYCEAE Х Х Х Х Х Euglena sp. KLEBSORMIDIOPHYCEAE Х Elakatothrix sp. MEDIOPHYCEAE Х Spicaticribra kingstonii J.R.Johansen. Kociolek & R.L.Lowe TREBOUXIOPHYCEAE Chlorella sp. Х Closteriopsis sp. Х Х Х Golenkiniopsis sp. Oocystis borgei J.W.Snow Х Х

Quadro 3 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório 29 ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

					<u> </u>					· · ·														
Deconvotónio 20			Inv	verno]	Prim	aver	a				Ve	rão					Out	tono		
Kesel vator to 29	Z	ZR (7	ZT	Z	ĽL	Z	ZR	Z	Т	Z	ĽL	Z	ZR (Z	T	Z	L	Z	R	Z	Τ.	Z	L
Táxon	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %	50 %	10 %
ХАМТНОРНУСЕАЕ																								
Tetraedriella jovetii (Bourrelly) Bourrelly	Х	Х											Х	Х										
ZYGNEMATOPHYCEAE																								
Mougeotia sp.																								Х
Staurodesmus mamillatus (Nordstedt) Teiling var. mamillatus		Х																						

Quadro 3 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório 29 ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Quadro 4 – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Teixeira ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

		Inv	erno			Prim	avera			Ve	rão			Out	tono	
Reservatorio Teixeira	Z	R	Z	ĽL	Z	R	Z	ĽL	Z	R	Z	L	Z	R	Z	L
Táxon	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%
BACILLARIOHYCEAE		•								•						
Brachysira serians (Brébisson) Round & D.G.Mann							Х									
Chamaepinnularia sp.															Х	
Encyonema neomesianum Krammer			Х													
Encyonema silesiacum (Bleisch) D.G.Mann							Х									
Encyonema sp.										Х						
Fragilariforma sp.			Х													
Navicula sp.	Х	Х					Х			Х			X			Х
Surirella linearis var. constricta Grunow		Х														
Surirella sp.	Х															
СНІОПОРНУСЕАЕ						•			•		•		•		•	
Ankistrodesmus stipitatus Komárková-Legnerová													X		Х	
Chlamydomonas debaryana Goroschankin (Gorozhankin)															Х	
Chlamydomonas sp.	Х	Х	Х	Х	Х	X	Х	Х		Х		Х	X	Х	Х	Х
Chlorolobium sp.					Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х
Coelastrum astroideum De Notaris															Х	
Coelastrum reticulatum (P.A.Dangeard) Senn									X			Х	X	Х	Х	Х
Desmodesmus communis (E.Hegewald) E.Hegewald													X			
Desmodesmus heteracanthus (Guerrero) Hentscheke & Torgan									Х		X					
Eutetramorus fottii (Hindák) Komárek													X			
Kirchneriella sp.													X	Х		
Monoraphidium arcuatum (Korshikov) Hindák															Х	
Monoraphidium griffithii (Berkeley) Komárková-Legnerová									Х				Х		Х	
Quadro 4 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Teixeira ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Deservetérie Teireire	Inverno					Prim	avera			Ve	rão		Outono				
Keservatorio Teixeira	ZR		ZL		ZR		ZL		ZR		ZL		ZR		Z	L	
Táxon	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	
Monoraphidium indicum Hindák	Х																
Pseudocharacium sp.						Х											
Quadrigula chodatii (Tanner-Füllemann) G.M.Smith									Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	
Scenedesmus obtusus Meyen										Х	Х						
Tetrastrum sp.												Х					
Vitreochlamys aulata (Pascher) Batko									Х		Х						
Westella botryoides (West) De Wildeman													Х				
CHRYSOPHYCEAE																	
Chromulina sp.													Х	Х	Х	Х	
Dinobryon bavaricum Imhof var. bavaricum	Х	Х		Х													
Mallomonas caudata (Ivanov) Iwanoff				Х	Х								Х			Х	
Mallomonas rhombica G.Cronberg		Х	Х				Х		Х	Х							
COSCINODISCOPHYCEAE																	
Aulacoseira ambigua (Grunow) Simonsen	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х		
Aulacoseira granulata var. granulata (Ehrenberg) Simonsen	Х																
Aulacoseira pusilla (F.Meister) A.Tuji & A.Houki														Х	Х		
Cyclotella meneghiniana Kützing		Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х			
Cyclotella sp.													Х	Х			
Discotella stelligera (Cleve & Grunow) Houk & Klee							Х	Х	Х						Х		
Thalassiosira sp.						Х	Х	Х							Х	Х	
СКУРТОРНУСЕАЕ																	
Cryptomonas brasiliensis A.Castro. C.E.M.Bicudo & D.C.Bicudo		Х									Х						
Cryptomonas marssonii Skuja	Х	Х		Х	Х				Х	Х			Х	Х		Х	

Quadro 4 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Teixeira ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Reservatório Teixeira		Inv	erno]	Prim	avera	ì	Verão					Out	ono	10	
		ZR		ZL		ZR		ZL		R	ZL		ZR		Z	L	
Táxon	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	
Cryptomonas obovata Skuja			Х	Х		Х				Х		Х	Х			Х	
Protocryptomonas acuta A.Castro. C.E.M.Bicudo & D.C.Bicudo													Х				
Rhodomonas lacustris Pascher & Ruttner	Х				Х	Х			Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	
CYANOBACTERIA																	
Aphanocapsa annulata G.B.McGregor											Х		Х			Х	
Aphanocapsa delicatissima West & G.S.West					Х											Х	
Aphanocapsa elachista West & G.S.West									Х	Х		Х					
Chroococcus sp.																Х	
Epigloeosphaera brasilica Azevedo. Sant'Anna. Senna. Komárek & Komárková					Х										Х		
Eucapsis sp.				Х	Х												
Geitlerinema sp.														Х			
Gloeothece sp.												Х		Х			
Limnococcus limneticus (Lemmermann) Komárková. Jezberová. O.Komárek & Zapomelová			Х						Х	Х	Х	Х			Х	Х	
Merismopedia glauca Lemmermann														Х	Х	Х	
Microcrocis sp.													Х				
Microcystis aeruginosa (Kützing) Kützing		Х	Х	Х	Х	Х							Х		Х	Х	
Microcystis panniformis Komárek. Komárková-Legnerová. Sant'Anna. M.T.P.Azevedo & P.A.C.Senna							Х	Х								Х	
Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek ex Komárek				Х		Х	Х		Х				Х		Х	Х	
Snowella sp.																Х	
Synechococcus nidulans (Pringsheim) Komárek													Х				
Synechocystis aquatilis Sauvageau											Х		Х				
DINOPHYCEAE																	
Ceratium furcoides (Levander) Langhans							Х						Х	Х	Х	Х	

Quadro 4 (continuação) – Lista de táxons identificados nas duas profundidades (50% e 10% da RSFA) nos pontos amostrais compreendidos na zona de rios (ZR), transição (ZT) e lacustre (ZL) do reservatório Teixeira ao longo das estações do ano. (Legenda: X - indica a ocorrência de determinado táxon)

Reservatório Teixeira		Inve	erno]	Prim	avera	L	Verão				Outono			
		ZR		ZL		ZR		L	ZR		ZL		ZR		ZL	
Táxon	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%	50%	10%
Gymnodinium fuscum (Ehrenberg) F.Stein	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х	Х		Х			Х			
Karlodinium micrum (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen									Х							
Parvodinium umbonatum/inconspicuum complexo citado por Cavalcante et al. (2017)	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х						Х		
Peridinium gatunense Nygaard					Х	Х										
EUGLENOPHYCEAE																
Euglena sp.												Х				
Trachelomonas sp.1		Х														
Trachelomonas sp.2							Х									
Trachelomonas volvocinopsis Svirenko	Х															
KLEBSORMIDIOPHYCEAE																
Elakatothrix sp.														Х		
PRYMNESIOPHYCEAE																
Chrysochromulina breviturrita K.H.Nicholls	Х	Х	Х		Х											
TREBOUXIOPHYCEAE																
Chlorella sp.									Х	Х						
Oocystis borgei J.W.Snow						Х							Х	Х		Х
XANTHOPHYCEAE																
Tetraedriella jovetii (Bourrelly) Bourrelly												Х				Х
ZYGNEMATOPHYCEAE																
Staurastrum rotula Nordstedt			Х	Х									Х			Х

ANEXO D – Calibração de DO x Chl-a

Figura 1 – Correlações entre clorofila-*a* (Chl-*a*) e absorbância ($\lambda = 683$ nm) ao longo do Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), do Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). As equações mostradas nos gráficos foram utilizadas para estimar a concentração de Chl-*a* utilizada na normalização para obtenção da fixação relativa de nitrogênio



ANEXO E - Razões molares NID:PID ao longo do experimento

Figura 1 – Resultados das razões molares NID:PID calculadas ao longo do Experimento A (60-N, 23-N, 16-N, 4-N e 0-N), do Experimento B (60-P, 23-P, 16-P, 4-P e 0-P) e da razão controle do meio original (10-NP). As setas vermelhas indicam o momento no qual foi realizada a quantificação da fixação de nitrogênio

