

Elisabete Lourdes do Nascimento

**FATORES AMBIENTAIS REGULADORES DA DINÂMICA DE
CIANOBACTÉRIAS NO RESERVATÓRIO DA USINA
HIDRELÉTRICA DE SAMUEL – RONDÔNIA (AMAZÔNIA
OCIDENTAL, BRASIL).**

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA
À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2012**

Elisabete Lourdes do Nascimento

Fatores ambientais reguladores da dinâmica de cianobactérias no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel – Rondônia (Amazônia Ocidental, Brasil).

Tese de doutorado submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de doutor em ciências biológicas (biofísica).

Orientadora: Dra. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo

Orientador: Dr. Wanderley Rodrigues Bastos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2012

Nascimento, Elisabete Lourdes

Fatores ambientais reguladores da dinâmica de cianobactérias no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, Rondônia (Amazônia Ocidental, Brasil) / Elisabete Lourdes do Nascimento. Rio de Janeiro, 2012.

Folhas – 187.

Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica).

2012

Orientadora: Dra. Sandra Maria F. de Oliveira e Azevedo

Orientador: Dr. Wanderley Rodrigues Bastos

1. Cianobactérias. 2. Macronutrientes. 3. Ferro. 4. Reservatório. 5. Amazônia. I. Azevedo, Sandra Maria Feliciano de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

*A Lourdes, mãe, amiga e referência de vida,
A João Paulo, amor, amigo e companheiro.*

*Mas é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca
Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria.*

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida....*

Milton Nascimento

ELISABETE LOURDES DO NASCIMENTO

Fatores ambientais reguladores da dinâmica de cianobactérias no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, Rondônia (Amazônia Ocidental, Brasil)

Rio de Janeiro, 28 de novembro de 2012.

Aprovada por:

Prof.a. Christina Wyss Castelo Branco

Prof. Jean Remy Davée Guimarães

Prof. Paulo Dorneles

Prof.a. Ana Beatriz Furlanetto Pacheco (revisora)

Prof. Olaf Malm (Suplente interno)

Prof.a. Vera Lucia de Moraes Huszar (Suplente externo)

Prof^ª. Sandra Maria Feliciano de Oliveira e Azevedo (orientadora)

Prof. Wanderley Rodrigues Bastos (orientador)

AGRADECIMENTOS

Desde o momento que cheguei ao Rio de Janeiro para participar da seleção do doutorado em dezembro de 2006, quando fui recebida com todo o carinho pela dona Penha em sua casa (obrigada!) e logo em seguida passei à tarde de domingo com a Prof^a. Sandra escrevendo o projeto da tese, soube nestes instantes que esta tese seria um trabalho de *muitas mãos*, e por essa razão tenho muito a agradecer. Para algumas pessoas, talvez, concluir o doutorado seja mais uma etapa na vida acadêmica, mas para mim é o resultado de um esforço que não se iniciou nos últimos cinco anos, é uma conquista e o produto da ajuda de muitos.

Inicio meus agradecimentos ao Prof. Wanderley Bastos, que para mim é mais que um orientador, é um verdadeiro amigo. Professor preocupado com a formação dos seus alunos e que busca condições para que esta formação ocorra da melhor forma possível, nos apoiando nos aspectos profissionais e familiares, que o Brasil tivesse mais professores assim Wander! Como não tenho palavras para agradecer tudo que você fez e faz por mim, espero expressar tais agradecimentos com dedicação ao caminho que escolhi trilhar.

Tenho muito a agradecer a Prof^a. Sandra Azevedo pela orientação, amizade, pelo cuidado e apoio dado ao longo do desenvolvimento deste trabalho, principalmente por ter me apoiado quando as coisas não aconteceram como programadas. Registro aqui meus sinceros agradecimentos por ter me dado a oportunidade de participar do grupo de pesquisa do LETC, onde encontrei pessoas as quais escrever sobre elas me deixa profundamente emocionada e já com muitas saudades.

À equipe do LETC inicio meus agradecimentos à Elis, Priscila e Roberta, que sempre, mas principalmente nesta etapa final não esitaram em me ajudar, sem a ajuda de vocês meninas não estaria defendendo esta tese neste momento, por isso, MUITO OBRIGADA!!! Mas além do auxílio dado, agradeço ter tido o sorriso da Robertinha todos os dias, o abraço apertado da Elis, pessoa que o coração não cabe em seu peito, obrigada, pelos ensinamentos e orações! Agradeço à alegre e doce companhia da Priscila em nossos finais de semana e noites a fora no laboratório, e por ser amiga suficiente para mudar seu gosto musical nas nossas idas à Lapa!

Andréia fiquei pensando no que escrever para expressar meus agradecimentos a você, quem diria que aquela menina que conheci em 2003 no congresso de Limnologia se tornaria uma grande amiga! Ainda não sei o que escrever...pois já sinto muitas saudades, mas por enquanto, agradeço por transmitir seus conhecimentos e experiências, pelas nossas discussões científicas, mas principalmente pela sua amizade, acolhida e alegria! Não deixe de me visitar e conhecer seus sobrinhos! Afinal, você já sabe o caminho!

O que falar da Raquel?! É possível existir alguém que tem as palavras certas para qualquer momento? Em mim suas palavras e seu carinho Raquel tiraram por inúmeras vezes angústias e incertezas. Além de agradecer toda a ajuda que você nunca esitou em me dar, todas as discussões de dados, registro aqui também minha admiração pela profissional

exemplar que você é! Gente a Raquel é de verdade?! Estou terminando o doutorado e não descobri!

Bel! Nossa, foram tantos momentos bons juntas, tanto conhecimento compartilhado, tantas gargalhadas que fizeram nossos dias de trabalho passar suavemente. Carol! Que apesar de ter tido menor contato, chegou com a sutileza e doçura que lhe são peculiares e conquistou um cantinho no meu coração, obrigada pelos momentos de descontração e pelos auxílios óticos e culinários prestados rs!!! No final do doutorado aconteceu cada coisa que daria um livro! Iamê, apesar de também ter tido pouco contato, agradeço sua amizade e auxílio.

Agradeço a Valéria pelos ensinamentos no laboratório, pela amizade, carinho e cuidado, o cuidado que é uma característica marcante e admirável! Ana Lúcia agradeço a estadia, o cuidado, mas principalmente os bons momentos que passamos, nossas gargalhadas, foi muito bom. Ana Cláudia e Simone obrigada pela companhia e amizade. Marcelo Manzi agradeço os ensinamentos, discussão dos resultados, correções, dúvidas sanadas e amizade. Bia, obrigada pelo apoio principalmente no último capítulo desta tese, pela discussão dos resultados, pela revisão impecável e amizade.

Ricardinho, **muito** obrigada por todo auxílio ao longo desses anos, você é uma pessoa especial! Também agradeço ao Rodrigo, Pedro, Ronaldo, Ramon e especialmente ao Daniel por toda ajuda.

Aos meus amigos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental/UNIR, também tenho muito a agradecer, Dario, Igor, Ronaldinho e Marcio, pelo auxílio nas coletas, Cristina pelo auxílio nas análises de ferro, Lury pela dedicação com a nossa sala de cultivo e nossas “meninas”, Marília, Júlia, Roberta, Leidiane, Denilça, Charliene, Guga, Walkimar, Gil, Cléber e Isaías, que em algum momento ajudaram, no mínimo a carregar os materiais (incluindo balões de 5L com meio de cultura!) para a capela de fluxo laminar, rs! Brincadeiras a parte, vocês sabem que me ajudaram muito mais do que isso e que prezo muito a amizade de vocês, precisando, estou à disposição. Agradeço também a Jane, Darlly e Cibele pela ajuda no início deste trabalho.

A professora Cristina Souza e ao Marcelo da UENF pelo auxílio nas análises no ICP-OS a e professora Célias Sant’Anna pelas dúvidas sanadas na identificação de espécies de cianobactérias. A Valéria e a Suema pelo auxílio na identificação do fitoplâncton. À Roberto Miyai/ELETRONORTE pela amizade e ensinamentos ao longo desses 12 anos de convivência.

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-IBCCF/UFRJ, ao CNPq pelo financiamento do projeto e bolsa concedida. A ELETRONORTE pela autorização para o desenvolvimento do trabalho na aérea do reservatório de Samuel e apoio.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Ambiental/UNIR/*campus* Ji-Paraná, professores e alunos pelo apoio e compreensão, em especial agradeço o apoio da minha

amigae parceira de pesquisa, Ana Lúcia. Não posso deixar de agradecer todo o apoio das nossas parceiras e vizinhas Andressa e Raissa, bem como a compreensão das minhas orientadas, agora teremos várias monografias!

Agradeço o apoio e incentivo da minha família, pai, irmão, cunhada, sogros, tios, vós, primos... tio Paulo obrigada por tudo... à meu sobrinho, Gabriel, quero deixar registrado (para o dia que você souber ler!) que sua alegria fizeram meus dias serem mais leve. Às minhas amigas Káren, Jaque, Cláudia, Elizete e Ednair pela torcida.

Finalizando tenho que agradecer a pessoas muito importantes na minha vida, e se hoje escrevo estes agradecimentos, é por que tive/tenho um porto seguro.

A Lourdes, amiga e maior incentivadora dos meus estudos, suas atitudes sutis me ensinaram a ter coragem, quando tive medo de trilhar caminhos que achei que não conseguiria, você olhava para mim, e em poucas palavras me dizia: você consegue, tenho certeza, vai... Você não precisou me dizer muito, seu exemplo de vida me mostrou o caminho. Essa conquista também é sua, *mãe*. A você dedico às palavras de um dos seus cantores favoritos, Gilberto Gil: *“Sou viramundo virado, nas rondas da maravilha, cortando a faca e facão, os desatinos da vida, gritando para assustar, a coragem da inimiga, pulando pra não ser preso, pelas cadeias da intriga, prefiro ter toda a vida, a vida como inimiga, a ter na morte da vida, minha sorte decidida”*

A meu esposo João Paulo, agradeço a espera, dedicação, compreensão, idas a campo, auxílio nos mapas e imagens, fins de semana no laboratório (incluindo dia dos namorados, lembra?)... por escutar minhas discussões e raciocínios nas horas mais diversas do dia... e da noite, pelas comemorações a cada capítulo concluído... um homem de poucas palavras, mas de muitas atitudes, as quais me emocionam e me surpreendem mesmo após anos de convivência. Para expressar minha gratidão e meu amor, te dedico as palavras de Vinícius de Moraes: *“Amo-te tanto, meu amor... não cante o humano coração com mais verdade...Amo-te afim, de um calmo amor prestante... E te amo além, presente na saudade... Amo-te enfim, com grande liberdade, dentro da eternidade e a cada instante”*

Ao meu filho (a), um ser tão pequeno cujo rosto se quer conheço, mas me trouxe a serenidade que estava faltando para que eu concluí-se esta tese, a você não sei que palavras dedicar... pois o amor que sinto não consigo transcrever... ansiosa!!! pela chegada mais esperada da minha vida.

À Deus, por ter colocado estas pessoas em meu caminho e por me proporcionar todas as experiências vividas, que me fizeram uma pessoa mais feliz.

RESUMO

NASCIMENTO, Elisabete Lourdes. Fatores ambientais reguladores da dinâmica de cianobactérias no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, Rondônia (Amazônia Ocidental, Brasil). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Cianobactérias são procariotos fotossintetizantes com amplo desenvolvimento principalmente em ambientes eutróficos, fenômeno denominado floração. Além dos danos sociais e ambientais causados pelas florações, estas podem se tornar um problema de saúde pública devido a algumas cianobactérias serem capazes de sintetizar cianotoxinas. Em estudo anterior realizado no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (Rondônia), situado na sub-bacia do rio Jamari foi verificado um aumento da densidade de *Microcystis* sp (Cyanobacteria) com o aumento da vazão. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar, através de estudo de campo e em laboratório, fatores ambientais relacionados à dinâmica de cianobactérias e possível produção de cianotoxinas neste reservatório. Os dados são apresentados em três capítulos. O capítulo I trata de variáveis ambientais e sua correlação com o fitoplâncton, a partir de dados obtidos ao longo de um ciclo hidrológico (fev/2007-fev/2008). A dominância de cianobactérias ocorreu em março (*Aphanocapsa. holsatica* e *Microcystis panniformes*) e maio (*Merismopedia tenuissima*), entretanto na maior parte do período estudado as clorofíceas foram dominantes. A dominância de cianobactérias ocorreu em meses do período de cheia, os quais apresentaram concentrações de nutrientes elevadas. Em fevereiro/08 foi detectada concentração de microcistina na água bruta acima do valor máximo permissível ($1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) recomendado pela portaria 2.914/2011/MS. Sabendo-se que a margem esquerda do reservatório possui extensas áreas desmatadas destinadas à pecuária e que o solo desprotegido contribui para a entrada de nutrientes alóctones, o capítulo II apresenta os dados de um experimento em microcosmos cujo objetivo foi verificar os efeitos do enriquecimento por nutrientes na comunidade fitoplanctônica, verificando se este *input* nutricional favoreceria o crescimento de cianobactérias. Apenas no tratamento em que P foi adicionado isoladamente ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi observada a dominância de *Dolichospermum solitarium* no 24° e 35° dias de experimento. Neste período as concentrações de DIN foram baixas ($150 \mu\text{g.L}^{-1}$), o que pode ter limitado o crescimento de outras espécies fitoplanctônicas e favorecido *Dolichospermum solitarium* por esta ser capaz de fixar nitrogênio atmosférico. No capítulo III é descrita a resposta fisiológica de uma linhagem de *M. panniformis* isolada do reservatório quando cultivada em diferentes concentrações de ferro (0, 23 e $223 \mu\text{g.L}^{-1}$ /controle) durante 8 dias. Após 7 dias de privação de Fe, o tratamento 0 Fe resultou em menor crescimento e menor síntese de clorofila a partir do 4° dia. Maiores concentrações de microcistina-LR foram observadas em $23 \mu\text{g.L}^{-1}$ Fe e controle. As informações geradas contribuíram para elucidar as variáveis ambientais relacionadas ao desenvolvimento de cianobactérias no reservatório e a concentração de microcistinas, dentre elas destacam-se o N e o P cujo *input* ao reservatório pode aumentar devido à forma de ocupação do solo, e o Fe, elemento característico da pedologia da região.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Elisabete Lourdes. Environmental factors regulating the cyanobacteria dynamics in the Samuel's reservoir hydroelectric powerplant, Rondônia (Western Amazon, Brazil). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes with extensive development in eutrophic environments, a phenomenon called *bloom*. Besides the social and environmental damage caused by blooms, these may become a public health problem due to some cyanobacteria be able to synthesize cyanotoxins. In a previous study conducted in the Samuel's hydroelectric powerplant reservoir (Rondônia), located in Jamari sub-basin, an increase was observed in the density of *Microcystis* sp (Cyanobacteria) with the increase of flow. Therefore, this study aimed to evaluate, through field and laboratory studies, environmental factors related to the cyanobacteria and cyanotoxins dynamics in this reservoir. Data are presented in three chapters. Chapter I deals with environmental variables and their correlation with phytoplankton, from data obtained over a hydrological cycle (Feb/2007-Feb/2008). The dominance of cyanobacteria occurred in March (*Aphanocapsa holsatica* and *Microcystis panniformes*) and May (*Merismopedia tenuissima*), however in most of the studied period the Chlorophyceae were dominant. The Cyanobacteria dominance occurred in the rainy months, which showed nutrients in high concentrations. In February the Microcystins concentrations were detected in raw water above the maximum permissible value recommended by the national legislation 518/2004/MS ($1\mu\text{g.L}^{-1}$). Knowing that the left bank of the reservoir has large areas deforested for cattle ranching and the bare soil contributes to the allochthonous input of nutrients, Chapter II presents data of an experiment in microcosms whose objective was to determine the effects of nutrient enrichment in phytoplankton community, specifically investigating the growth of cyanobacteria. Only when the P treatment was added alone ($250\mu\text{g.L}^{-1}$), *Dolichospermum solitarium* it was observed dominance of at 24th and 35th day of the experiment. In this period have limited the DIN concentrations were low ($150\mu\text{g.L}^{-1}$) and that might have limited growing of other phytoplankton species and favored *D. solitarium*, since this one is able to fix atmospheric nitrogen. Chapter III describes the physiological response of *M. panniformis* isolated from reservoir, when growing under different iron concentrations (0, 23 e $223\mu\text{g.L}^{-1}$ /controle) for 8 days. After 7 days of Fe complete deprivation resulted in slower growth and reduced chlorophyll synthesis starting on the 4th day. Higher concentrations of microcystin-LR were observed in $23\mu\text{g.L}^{-1}$ Fe and control. The information generated contributed to elucidate the environmental variables related to cyanobacteria development in the reservoir and the concentration of microcystins, among which stand out the N and P whose input to reservoir may increase due to the form of land, and Fe, the characteristic element of the region geology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Mapa dos municípios do Estado de Rondônia destacando a área de cada município sob influência da sub-bacia do rio Jamari.	6
Figura 02: Cronologia do desmatamento na sub-bacia do rio Jamari (1985-2011).	7
Figura 03: Estimativa do rebanho existente nas áreas inseridas na sub-bacia do rio Jamari dos onze municípios com área territorial nesta sub-bacia: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru), MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).	8
Figura 04:Área plantada das oito principais culturas de Rondônia com área territorial na sub-bacia do rio Jamari: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru) MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).	10
Figura 05: Densidade populacional dos municípios com área territorial na sub-bacia do rio Jamari: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru), MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).	12
Figura 06: Percentual de esgoto tratado por município (a) e soluções alternativas à rede coletora de esgoto sanitário (b). Fonte IBGE (2008 e 2011).	13
Figura 07: Modelo proposto para síntese de microcistina em ambientes com altas concentrações de ferro dissolvido (Utkilen & Gjølme, 1995).	21
Figura 08: Mapa de localização do reservatório da U.H.E. Samuel evidenciando a estação M1.	24

Capítulo I: Fatores ambientais controladores das populações de Cyanobacteria e produção de cianotoxinas, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (Rondônia).

- Figura 01: Série temporal da precipitação média mensal na área do reservatório da U.H.E.-Samuel ao longo do período estudado (fevereiro/07-fevereiro/08) e entre os anos de 1979-2007. 43
- Figura 02: Dados de vazão afluente do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 44
- Figura 03: Imagens de satélite do reservatório da U.H.E. Samuel no mês de abril/07, período de cheia (A) e no mês setembro/07, período de seca (B). 45
- Figura 04: Projeção dos dados da Análise das componentes principais (PCA) das variáveis limnológicas (média da Zeu) ao longo do período estudado. NO₃: nitrato, PO₄: fósforo solúvel reativo, Fe dis: ferro dissolvido, Fe tot: ferro total, Vaz: vazão, NH₄: amônia, Chl *a*: clorofila *a*, Alcal: alcalinidade, T° temperatura, Zeu: zona eufótica, OD: oxigênio dissolvido. 46
- Figura 05: Valores de transparência da água (Secchi) e zona eufótica e vazão na estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 48
- Figura 06: Boxplot mostrando valores de pH encontrados na Zeu (a) e valores de alcalinidade (b). As caixas representam o interquartil (25-75%), as barras o intervalo de variação dos valores de pH e alcalinidade obtidos em cada metro de profundidade da Zeu, e as linhas horizontais representam os valores medianos. 49
- Figura 07: Valores de temperatura da água (a), oxigênio dissolvido (b) no período de fevereiro/07-fevereiro/08. 50
- Figura 08: Concentração de nitrato (a), amônia (b) e ortofosfato (c) na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 55
- Figura 09: Concentração de clorofila *a* na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 57
- Figura 10: Biovolume (a) e biomassa relativa (b) dos grupos fitoplanctônicos encontrados na Zeu (amostra integrada) da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 62

Figura 11: Biovolume (a) e biomassa relativa (b) das espécies de cianobactérias encontradas na Zeu (amostra integrada) da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 64

Figura 12: Projeção do resultado da Análise de Correspondência Canônica (CCA). 1: fevereiro, 2: março, 3: abril, 4: maio, 5: junho, 6: julho, 7: agosto, 8: setembro, 9: outubro, 10: novembro, 11: dezembro (2007), 12: janeiro e 13: fevereiro (2008). Uro: *Uosolenia sp*, Aho: *Aphanocapsa holsatica*, Cbr: *Cryptom brasilliensis*, Mpa: *Microcystis panniformes*, Tem: *Merismopedia tenuissima*, Cyc: *Cyclotella sp*, Cos: *Cosmarium sp*, Eut: *Eunotia sp*, Cre: *Coelastrum reticulatum*, Pli: *Planktolyngbya limnetica*, Lpa: *Lemmermanniella parva*, Mpu: *Merismopedia punctata*, Chrom: *Cromulina sp*, Sta: *Stauradesmus sp*, Tvo: *Trachelomonas volvocina*, Chl: *Chlorococcales sp*, Per 1: *Peridinium sp1*, Chroo: *Chroomonas cf acuta*, Chm: *Chlorella homosphaera*, Per2: *Peridinium sp2*, Cryp: *Chryptophyceae*, Crypo: *Cryptomonas sp*. 66

Figura 13: Relação entre vazão e ferro dissolvido obtida a partir do resultado da CCA (a) e variação da densidade de *M. panniformes* obtidos nos planos de ordenação do primeiro e segundo eixo da CCA. As isolinhas foram geradas pelo CANODRAW com base na regressão usando um modelo linear geral (GLM). 70

Figura 14: Boxplot mostrando os valores de microcistina total encontrados na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). As caixas representam o interquartil (25-75%), as barras o intervalo de variação e as linhas horizontais representam os valores medianos. 72

Capítulo II: Efeitos da adição de nutrientes sobre a comunidade fitoplanctônica (ênfase em cianobactérias) do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel: estudo em microcosmos.

Figura 01: Experimento microcosmos. 88

Figura 02: Variação da condutividade elétrica (a) do pH (b) no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média e desvio padrão). Res, valores 91

registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Figura 03: Variação das concentrações de nitrato (a), amonio (b), nitrito (c) e ortofosfato (d), no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 94

Figura 04: Variação da razão N/P no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 95

Figura 05: Variação da concentração de ferro dissolvido no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 96

Figura 06: Variação da concentração de clorofila a (a) e biomassa total (b) no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 98

Figura 07: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no controle (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 100

Figura 08: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento N+P+Fe (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 101

Figura 09: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento N (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 102

Figura 10: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento P (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 103

- Figura 11: Variação da biomassa (a, b) dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento Fe durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 104
- Figura 12: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorofíceas no durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 106
- Figura 13: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorofíceas no tratamento com adição de nitrogênio, fósforo e ferro durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 106
- Figura 14: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorofíceas no tratamento com adição de nitrogênio durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 107
- Figura 15: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa(b) de clorofíceas no tratamento com adição de fósforo durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 107
- Figura 16: Variação do biovolume e da biomassa relativa de clorofíceas no tratamento com adição de ferro (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 108
- Figura 17: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no controle durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 110
- Figura 18: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de nitrogênio, fósforo e ferro durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento. 110
- Figura 19: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de nitrogênio durante o período do experimento. Res, valores 111

registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Figura 20: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no 111
tratamento com adição de ferro durante o período do experimento. Res, valores
registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Figura 21: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no 112
tratamento com adição de fósforo durante o período do experimento. Res, valores
registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Capítulo III: Influência do ferro em alguns parâmetros fisiológicos e na síntese de microcistina por uma linhagem de *Microcystis panniformes*(MIRS-4)isolada do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel.

Figura 01:Densidade de células (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo de *M.* 136
panniformis MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ferro . a: indica que
o respectivo tratamento é diferente do controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$); b: indica que os
tratamentos são diferentes entre si; c: indica que o tratamento 0 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ é diferente do
tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ e do controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$); a ausência de letra significa que
não houve diferença entre as condições (n=3).

Figura 02:Concentração de clorofila *a* (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo de 137
M. panniformis MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe (a) e fotos
mostrando os cultivos no 4º (b) e 8º dia (c). a: indica que o respectivo tratamento é
diferente do controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$), (n=3); b: indica que os tratamentos são diferentes
entre si; a ausência de letra significa que não houve diferença entre as condições (n=3).

Figura 03:Concentração de microcistina-LR (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo 138
de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ de Fe. a:
indica que o respectivo tratamento é diferente do controle; b: indica que os tratamentos
são diferentes entre si); a ausência de letra significa que não houve diferença entre as
condições (n=3).

Figura 04: Concentração de ferro intracelular (a) e extracelular (b) ao longo de 8 dias 139
de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$, n =
3.

Figura 05: Quantificação relativa dos transcritos dos genes de resposta à limitação de 140
ferro, *feo* (a) e *fut* (b) ao longo de 4 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio
ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$. d: indica que os tratamentos 0 e 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ são
estatisticamente iguais e diferentes do 223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Fatores ambientais controladores das populações de Cyanobacteria e produção de cianotoxinas, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (Rondônia).

Tabela 01: Correlação das variáveis limnológicas nos eixos 1 e 2 resultantes da Análise das Componentes Principais (PCA). 47

Tabela 02: Concentração de ferro dissolvido e ferro total (média, máximo e mínimo) nas amostras de água coletadas em diferentes profundidades da zona eufótica na estação M1 do reservatório da U.H.E. - Samuel (fevereiro/2007 a fevereiro/2008). 52

Tabela 03: Valores médios, máximos e mínimos das variáveis limnológicas estudadas na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel nos períodos P1/7, P2 e P1/8 (fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). 59

Tabela 04: Relação das 22 espécies que contribuíram com biomassa igual ou superior a 5% na amostra (mês), evidenciando a contribuição que cada espécie apresentou dentro de seu grupo taxonômico, e a contribuição de cada espécie com a biomassa fitoplanctônica total obtida no período de fevereiro/07 a fevereiro/08. 61

Tabela 05: Correlação das variáveis ambientais e das espécies nos eixos 1 e 2 resultantes da Análise de Correspondência Canônica (CCA). 67

Tabela 06: Resultado das correlações de Pearson (r^2) entre as concentrações de microcistina total e as variáveis ambientais ao longo do período estudado (fevereiro/07-fevereiro/08). 73

Capítulo II: Efeitos da adição de nutrientes sobre a comunidade fitoplanctônica (ênfase em cianobactérias) do reservatório da U.H.E.Samuel: estudo em microcosmos.

Tabela 01: Comparação entre as concentrações totais de nutrientes adicionados em outros trabalhos experimentais realizados no Brasil e aquelas utilizadas no presente estudo. 87

Tabela 02: Concentrações de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontradas na água do reservatório utilizada no experimento, concentrações de nutrientes adicionadas à mesma, e concentração de nutrientes no início do experimento. 87

Capítulo III: Influência do ferro em alguns parâmetros fisiológicos e na síntese de microcistina por uma linhagem de *Microcystis panniformes*(MIRS-4) isolada do reservatório da U.H.E. - Samuel.

Tabela 1: Condições da cromatografia em gradiente. 131

Tabela 2. Íons precursores e respectivos fragmentos utilizados na detecção e 131
quantificação de microcistinas por espectrometria de massas.

Tabela 3: Primers usados na análise de qRT-PCR. 135

SUMÁRIO

PREÂMBULO	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1. Bacia Hidrográfica Amazônica	3
1.2. Desenvolvimento da região Amazônica e o processo de ocupação de Rondônia	3
1.3. Caracterização ambiental da sub-bacia hidrográfica do rio Jamari	4
1.4. Cianobactérias	14
1.5. Cianotoxinas	16
1.6. Cianobactérias, cianotoxinas e fatores ambientais	18
2. ÁREA DE ESTUDO	22
2.1. Características da área de estudo	23
2.1.1. Clima	23
2.1.2. Hidrografia	23
2.1.3. Pedologia	25
2.1.4. Geomorfologia	25
2.1.5. Vegetação	26
3. OBJETIVO GERAL	27
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Capítulo I: Fatores ambientais controladores das populações de Cyanobacteria e produção de cianotoxinas, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (Rondônia).

INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	39
Área de Estudo	39

Ponto amostral e periodicidade das coletas	39
Análises Laboratoriais	40
Tratamento Estatístico	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
Variáveis limnológicas da estação M1	42
Análise Multivariada das variáveis ambientais e das espécies fitoplanctônicas	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
Capítulo II: Efeitos da adição de nutrientes sobre a comunidade fitoplanctônica (ênfase em cianobactérias/ Cyanobacteria?) do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel: estudo em microcosmos.	
INTRODUÇÃO	83
MATERIAL E MÉTODOS	86
Montagem do experimento	86
Análise dos parâmetros físicos, químicos e biológicos da água	88
Tratamento Estatístico	90
RESULTADOS	90
Variáveis abióticas: temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido	90
Variáveis abióticas - nutrientes: macronutrientes (nitrato, nitrito, amônia e ortofosfato) e micronutriente (ferro)	92
Variáveis bióticas: clorofila <i>a</i> e biomassa total	97
Variáveis bióticas: biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos	98
Principais táxons de clorofíceas	104
Principais táxons de cianobactérias	108
DISCUSSÃO	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

Capítulo III: Influência do ferro em alguns parâmetros fisiológicos e na síntese de microcistina por uma linhagem de *Microcystis panniformes* (MIRS-4) isolada do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel.

INTRODUÇÃO	126
MATERIAL E MÉTODOS	128
Isolamento e cultivo da cepa de <i>Microcystis Panniformis</i> (MIRS-4)	128
Preparo do inóculo da cepa MIRS-4	129
Montagem do experimento	129
Parâmetros fisiológicos analisados	129
Concentrações de ferro intracelular e extracelular	132
Quantificação de transcritos de genes de resposta à limitação de ferro	132
Tratamento Estatístico	135
RESULTADOS	135
DISCUSSÃO	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
DISCUSSÃO GERAL	153
CONCLUSÕES	161
RECOMENDAÇÕES	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANA: Agência Nacional de Águas

DCA: Análise de Correspondência não Tendenciosa

CCA: Análise de Correspondência Canônica

NID: nitrogênio inorgânico dissolvido

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDARON: Agência de defesa Sanitária agrosilvopastorial do Estado de Rondônia

OD: Oxigênio dissolvido

PCA: Análise das Componentes Principais

pH: Potencial hidrogeniônico

PPB: parte por bilhão

U.H.E: Usina Hidrelétrica

Zeu: Zona eufótica

PREÂMBULO

Há muito tempo as cianobactérias vêm sendo o principal objeto de estudo de vários grupos de pesquisas no Brasil, tal como o Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Universidade Federal do Rio de Janeiro). Como conseqüência da consolidação desses grupos de pesquisa, cresce também o número de artigos publicados nesta temática, nos mais variáveis enfoques, com destaque para a ecofisiologia e a toxicologia.

O aumento no número de pesquisas realizadas no Brasil e em outros países deve-se ao fato de que as cianobactérias são potenciais produtoras de cianotoxinas, as quais podem causar danos à biota e aos seres humanos. No entanto, no Brasil, a maioria dos estudos sobre cianobactérias está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Regiões como o Centro-Oeste e o Norte ainda carecem do conhecimento a respeito destes microrganismos. O bioma amazônico ocupa 61% do território nacional e comparado a magnitude deste ecossistema o número de publicações acerca de cianobactérias e cianotoxinas nesta região ainda é baixo.

Uma vez que a ocorrência de florações de cianobactérias produtoras de cianotoxinas causa danos sociais, econômicos e ambientais e que a Amazônia é a maior reserva de água doce superficial do planeta, sendo alvo de grandes empreendimentos, tais fatores motivaram a execução deste projeto em um estado da região Norte, Rondônia.

A área de estudo selecionada foi o Reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel, localizado a 52 Km da capital do estado, Porto Velho. O reservatório de Samuel foi formado em 1989 através da construção de uma barragem na Cachoeira de Samuel no rio Jamari. O rio Jamari é o principal afluente da margem esquerda do rio Madeira. O reservatório de Samuel é considerado de água clara, oligo-mesotrófico e com elevadas temperaturas durante todo o ano. A partir da década de 90 passou-se a observar alterações ambientais na área do entorno do reservatório. Essas mudanças na paisagem estão relacionadas principalmente à expansão da agricultura e da pecuária. Tais distúrbios no entorno de um ambiente aquático acarretam alterações à dinâmica do sistema, haja vista que o solo desprotegido, somado ao uso intenso de fertilizantes agrícolas, pode levar à eutrofização dos ambientes e conseqüentemente alterar a estrutura das comunidades aquáticas, a exemplo da comunidade fitoplanctônica.

Dados sobre a estrutura da comunidade fitoplanctônica deste reservatório apresentados por Nascimento (2006), mostraram a dominância de uma espécie de cianobactéria, *Microcystis* sp, sobre os demais grupos fitoplanctônicos. Esta dominância ocorreu no início e no término do período de cheia da região. Entretanto, como o objetivo desse estudo não era compreender os fatores ambientais relacionados à dinâmica desta espécie no reservatório, tal lacuna permaneceu. Quais variáveis ambientais estariam correlacionadas às mudanças na estrutura da comunidade fitoplanctônica no reservatório ao longo de um ciclo hidrológico? O aumento na frequência anual e densidade de cianobactérias, que vem sendo observado desde meados de 2002 pela equipe do Laboratório de Limnologia da Usina Hidrelétrica de Samuel pode causar danos à qualidade do ambiente devido ao potencial tóxico destes microrganismos? (Capítulo I). O aumento gradativo da entrada de nutrientes no reservatório, também em decorrência da degradação ambiental do seu entorno, pode vir a favorecer a formação de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas? (Capítulo II)

Além disso, é crescente o número de publicações que relatam os efeitos do ferro sobre o crescimento de diferentes espécies de *Microcystis* e a produção de microcistina. Sabendo-se que o solo da região do reservatório de Samuel é constituído por latossolo, que tem como uma de suas principais características elevados níveis de ferro, estaria o crescimento de *Microcystis* e possível produção de microcistinas no reservatório sendo regulado por este micronutriente? (Capítulo III)

Visando responder estas três principais perguntas, esta tese foi desenvolvida e os resultados são apresentados na forma de três capítulos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Bacia Hidrográfica Amazônica

A Bacia Amazônica possui uma extensão de cerca de 6.000.000 km², é considerada a maior bacia hidrográfica do mundo. Desta área, aproximadamente 3.850.000 km² encontram-se em território brasileiro, representando 45% do território nacional. Está situada na América do Sul entre os paralelos de 5°00'N a 20°00'S. É limitada ao norte pelo Planalto das Guianas, com altitude variando de entre 500 e 3000 metros, ao sul pelo Planalto Brasileiro formando uma barreira de 700 metros, a oeste pela Cordilheira dos Andes, com elevações de 3000 a 7000 metros e a leste pelo oceano atlântico (Moiliner *et al.*, 1995; Mortatti *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1998).

Os solos encontrados na Bacia Amazônica apresentam-se distribuídos de uma forma heterogênea e são em sua maioria ácidos e de baixa fertilidade química, principalmente devido às altas temperaturas, chuvas intensas e história geológica da região (Mortatti *et al.*, 1997).

O clima desta floresta equatorial é quente e úmido, caracterizado pela ocorrência de períodos de chuvas intensas, denominado período de cheia e por períodos de baixa precipitação, denominado período de seca. A existência de longos períodos de precipitação, que variam de acordo com a região geográfica da floresta, é um dos fatores que distinguem esta região de outras partes do globo (Costa *et. al*, 1998).

1.2. Desenvolvimento da região Amazônica e o processo de ocupação de Rondônia

Os programas governamentais visando o desenvolvimento da Amazônia, executados desde a década de 60, mudaram profundamente a estrutura demográfica, econômica e paisagística da região. A construção de rodovias interligando a região amazônica às demais regiões do país, somada aos programas de colonização do governo federal, estimularam a migração gerando paisagens principalmente agrárias, na qual a floresta foi sendo dizimada.

No Estado de Rondônia, localizado no sudoeste da região amazônica, a colonização não foi diferente. Rondônia possui uma extensão de aproximadamente 243.000 km² e sofreu grandes impactos econômicos, sociais e ambientais com a implantação dos programas

governamentais (Programa Integrado de Desenvolvimento do Noroeste do Brasil – POLONOROESTE e Plano Agropecuário e Florestal de Rondônia - PLANAFLORO) que visavam o desenvolvimento regional. As décadas de 1960, 1970 e 1980 passaram então a ser denominadas por alguns autores como décadas da destruição, devido às ações governamentais de apoio aos agricultores que ocupavam a região terem ficado apenas no papel (Pádua, 2000).

De grande importância foi o término da construção da rodovia Cuiabá - Porto Velho (BR-364) e sua posterior pavimentação no âmbito do POLONOROESTE, que intensificaram o fluxo migratório em direção ao Estado. Os migrantes foram atraídos pelo potencial econômico de Rondônia, como as terras inexploradas disponíveis à agricultura, à pecuária e à extração de madeira (Pereira, 1997).

1.3. Caracterização ambiental da sub-bacia hidrográfica do rio Jamari

Assim como a pavimentação da rodovia BR-364, outro empreendimento importante que influenciou a migração e o estabelecimento de pessoas vindas das mais diversas regiões do país ao Estado de Rondônia, foi a construção da U.H.E. de Samuel. Iniciada em 1982 pelas Centrais Elétricas do Norte do Brasil S.A (ELETRONORTE) teve como objetivo gerar e fornecer energia elétrica para os Estados do Acre e Rondônia. O barramento do rio Jamari, onde está situado o reservatório, aconteceu em 1988 e a operação comercial da usina teve início em 1989, com o total enchimento do reservatório.

Desta forma, ao longo das décadas, o Estado de Rondônia, assim como a sub-bacia do rio Jamari vem sofrendo um processo de degradação ambiental, constituído principalmente pelo desmatamento em decorrência do avanço da agropecuária. Em termos de contribuição ao Produto Interno Bruto (PIB), a agropecuária é a principal atividade econômica do Estado segundo dados do IBGE de 2008.

A sub-bacia do rio Jamari possui uma área total de 15.993,91 km². Desta área, 582,64 km² são de hidrografia e 8.118,29 km² correspondem à área da bacia desmatada até 2011 (56%), segundo dados do Projeto de Monitoramento da Floresta Amazônica por Satélite (PRODES) do Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE) de 2012.

Onze municípios de Rondônia possuem uma parcela de sua área territorial inserida na sub-bacia do rio Jamari (figura 01). O avanço cronológico do desmatamento da sub-bacia é

apresentado na figura 02. Assim como ocorre em todo o Estado de Rondônia, o eixo do desmatamento localiza-se às margens da BR-364. A partir de 2005, já foi possível observar o acentuado grau de degradação ambiental no entorno da sub-bacia do rio Jamari.

Com o avanço da exploração madeireira, das áreas de pastagens para a pecuária e o *boom* do agronegócio no Brasil, somados à fiscalização precária das áreas de preservação ambiental, há um cenário para uma redução de cerca de 40% das áreas de florestas da bacia Amazônica ainda no século XXI. Para a Amazônia brasileira, esses números são ainda mais assustadores, já que as perdas podem ultrapassar 50% de seus atuais 3,3 milhões de km² de florestas (Soares-Filho *et al.*, 2005).

Um dos problemas relacionados aos recursos hídricos que tem se agravado no século XXI, é a eutrofização, que corresponde a um fenômeno natural em que ocorre a entrada de nutrientes, principalmente fósforo (P) e nitrogênio (N), de forma particulada ou dissolvida nos ecossistemas aquáticos (Tundisi, 2003). No entanto, o aumento do suprimento externo de nitrogênio e fósforo para os ecossistemas aquáticos, principalmente devido ao uso de fertilizantes na agricultura, a criação de pastagens para a pecuária e o lançamento de esgotos domésticos e industriais oriundos dos grandes centros urbanos acarreta a eutrofização artificial dos corpos d' água (Smith *et al.*, 1999).

A eutrofização das águas continentais é preocupante, pois tem resultado na mudança da estrutura das comunidades aquáticas, com a consequente dominância das cianobactérias, gerando efeitos ao longo de toda a cadeia alimentar (Ferrão-Filho *et al.*, 2009).

O desmatamento pode contribuir com o processo de eutrofização artificial dos corpos d' água, tanto através de seu efeito direto, deixando o solo desprotegido e mais susceptível ao processo erosivo e à lixiviação, como através do seu efeito indireto, que corresponde ao uso que terá a área então desmatada. A agricultura pode acarretar a entrada de partículas ricas em P e N oriundos de fertilizantes agrícolas e a pecuária contribui através da entrada de efluentes ricos em fezes, urina ou adubo, devido à lavagem dos solos durante as chuvas, tendo como destino final os corpos d' água (Oliveira *et al.*, 2004).

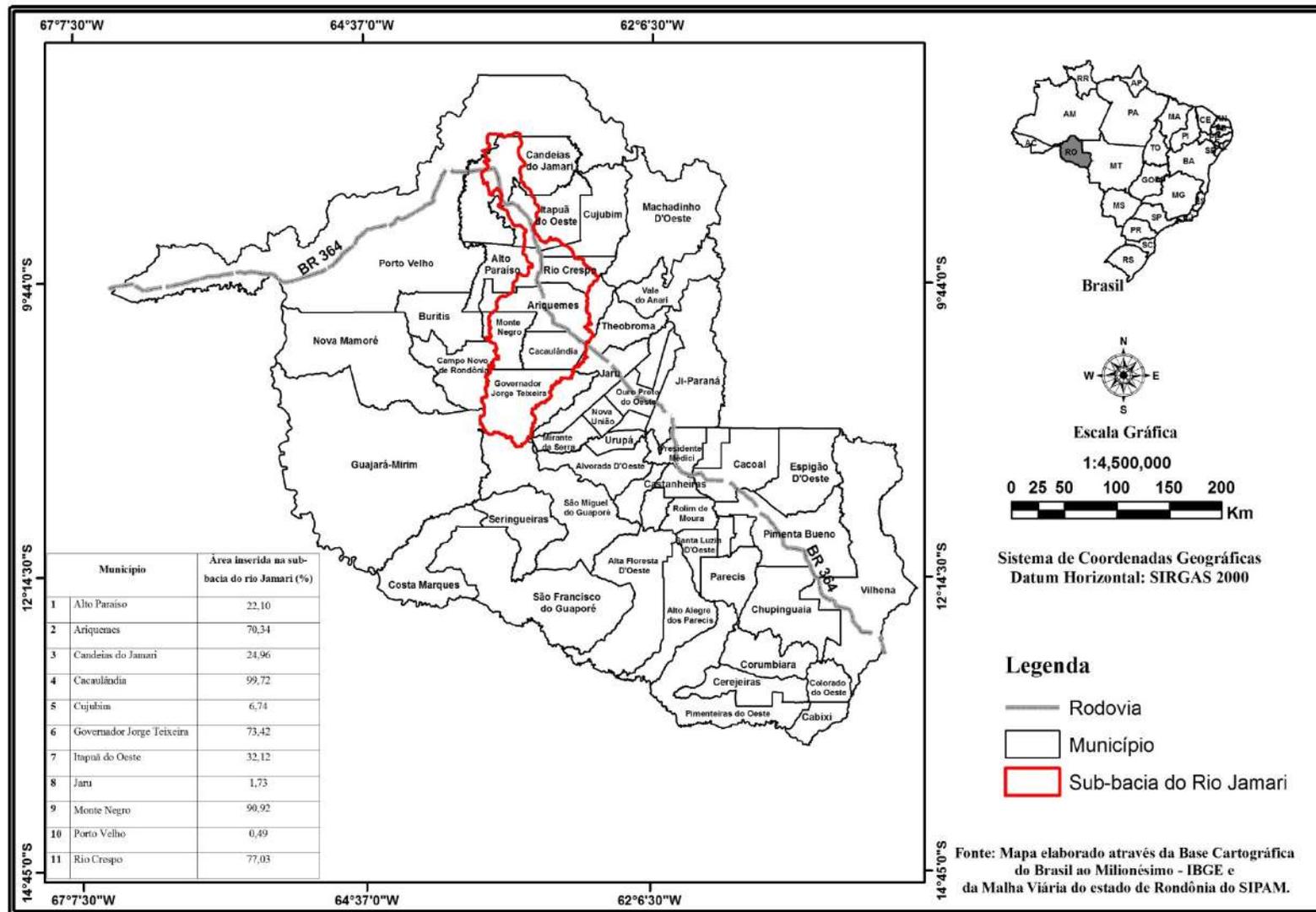


Figura 01: Mapa dos municípios do Estado de Rondônia destacando a área de cada município sob influência da sub-bacia do rio Jamari.

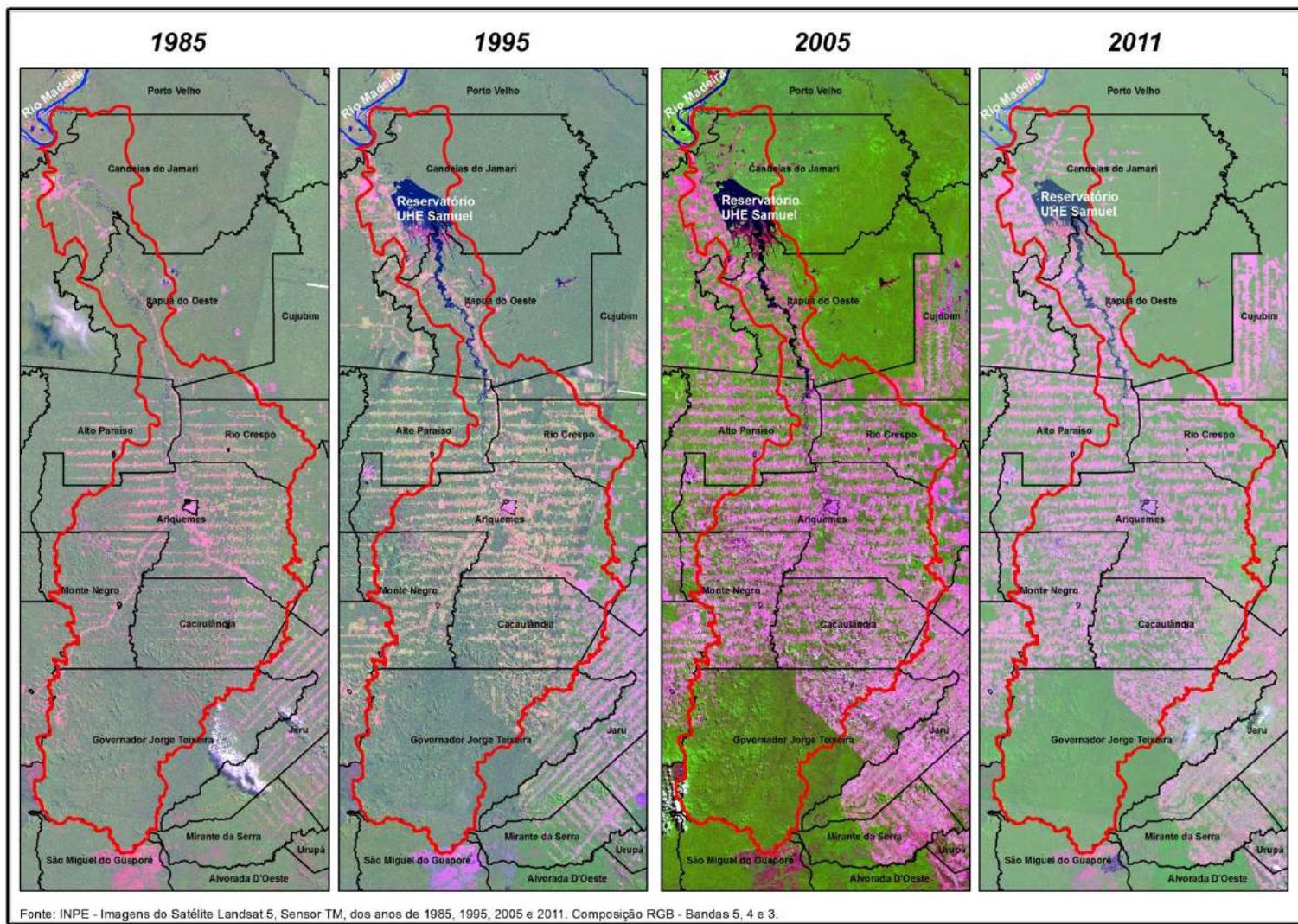


Figura 02: Cronologia do desmatamento na sub-bacia do rio Jamari (1985-2011).

Floresta =  Área antropizada = 

Um levantamento realizado pelo órgão de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia (IDARON) em novembro de 2011 estimou o rebanho bovino existente no Estado como de 12.074.362 cabeças de gado. Nos onze municípios que se encontram parcialmente inseridos na sub-bacia do rio Jamari há um rebanho de 2.896.964 cabeças de gado (IDARON, 2012).

Em decorrência de nenhum município ter sua área totalmente inserida na sub-bacia do rio Jamari (figura 01), foi realizada uma estimativa do rebanho existente apenas nas áreas que se inserem na mesma. A estimativa foi calculada considerando que 80% da área dos municípios inseridas na sub-bacia sejam utilizadas para pecuária. Desta forma estima-se que haja em torno de 830.816 cabeças de gado em toda a sub-bacia.

Se excluirmos o rebanho estimado para a área dos municípios de Porto Velho e Candeias do Jamari, os quais se encontram a jusante do reservatório de Samuel, tem-se 791.787 cabeças de gado. A distribuição da estimativa do rebanho existente na sub-bacia do rio Jamari nos onze municípios é apresentada na figura 03.

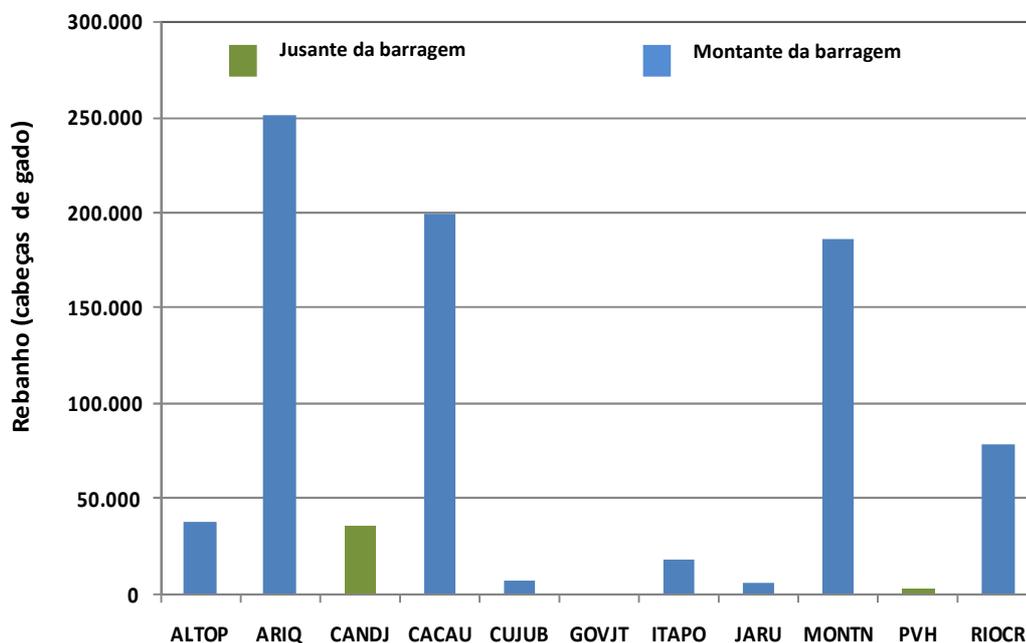


Figura 03: Estimativa do rebanho existente nas áreas inseridas na sub-bacia do rio Jamari dos onze municípios com área territorial nesta sub-bacia: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru), MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).

No intuito de aprimorar a atividade pecuária no Brasil, estudos têm sido realizados para verificar a contribuição de macronutrientes nas áreas utilizadas para pastoril dos rebanhos (Braz *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2007). Um bovino com peso entre 300-400 kg lança em média no ambiente, através de suas fezes, 21,42 g/dia de fósforo. O nitrogênio também é eliminado pelas fezes, com média de 47,04 g/dia, mas sua principal via de excreção é a urina, cerca de 156,18 g/dia.

Quando presentes no solo, as formas inorgânicas desses macronutrientes podem ser rapidamente incorporadas na pastagem. Parte é incorporada pela biota microbiana e uma parcela é volatilizada (N-NH_4^+). Aproximadamente 30% do nitrogênio excretado pelas fezes e urina permanecem no solo podendo atingir os corpos d' água por erosão ou lixiviação. Para o fósforo estima-se que este percentual seja maior (Thosi, 1996; Russeli, 1997; Ferreira, 1995).

Considerando a estimativa do rebanho existente nas áreas dos municípios situados a montante da barragem do reservatório de Samuel (791.787) e os dados médios apresentados pelos estudos citados das concentrações de N e P presentes nas excreções bovinas, estima-se que diariamente há uma entrada de 161,83 toneladas/dia de N e 17,08 toneladas/dia de P nos solos da sub-bacia do rio Jamari. Como deste montante 30% estaria disponível para atingir os corpos d' água por erosão e/ou lixiviação, pode-se concluir que há um potencial de entrada de 48,55 toneladas/dia de N e 5,12 toneladas/dia de P nesta sub-bacia.

Estudo realizado por Bonilla (2005), em área de pastagem e área florestada no Estado de Rondônia demonstrou que a água decorrente da precipitação sob o solo desprotegido em área de pastagem tem maior facilidade de trânsito no terreno e conseqüentemente tem menor percolação que numa área florestada. Devido ao maior fluxo de água, esta autora verificou a maior entrada de nitrogênio nos igarapés estudados da região central do Estado.

Mortattiet *al.*, (1997) apontam que a entrada de elementos químicos decorrentes da erosão dos solos pode ser denominada como erosão química, que tem forte influência na dinâmica aquática dos rios amazônicos, principalmente nos rios de água clara que apresentam baixa concentração de elementos químicos importantes, a exemplo do fósforo.

Apesar dos expressivos dados do potencial de entrada de N e P na sub-bacia, é válido ressaltar que esta entrada depende de inúmeros fatores, que vão desde o metabolismo do animal, da microbiota presente no solo, da vegetação utilizada para atividade pastoril, além de

questões climáticas. No período chuvoso, por exemplo, certamente essa entrada potencial de nutrientes em decorrência de processos erosivos e da lixiviação será mais representativa.

Souza (2012), ao analisar uma série histórica de dados pluviométricos da sub-bacia do rio Jamari, disponíveis no sítio da Agência Nacional de Águas (ANA), verificou que esta sub-bacia está mais propensa a eventos de precipitação extremos. Em decorrência deste fator, esta sub-bacia encontra-se mais susceptível a alterações na qualidade da água em decorrência da lixiviação e dos processos erosivos.

No que tange às atividades agrícolas em Rondônia, as principais culturas por ordem de contribuição ao PIB do Estado são: soja, café, mandioca, milho, cacau, feijão, arroz e banana. A área plantada para cada cultura nos municípios com área na sub-bacia do rio Jamari é apresentada na figura 04. A área plantada total para estas oito culturas nos 11 municípios é de 878 km². Destes, 273 km² são utilizados para a cultura do café, 143 km² para a cultura do cacau e 121 km² para a cultura da mandioca.

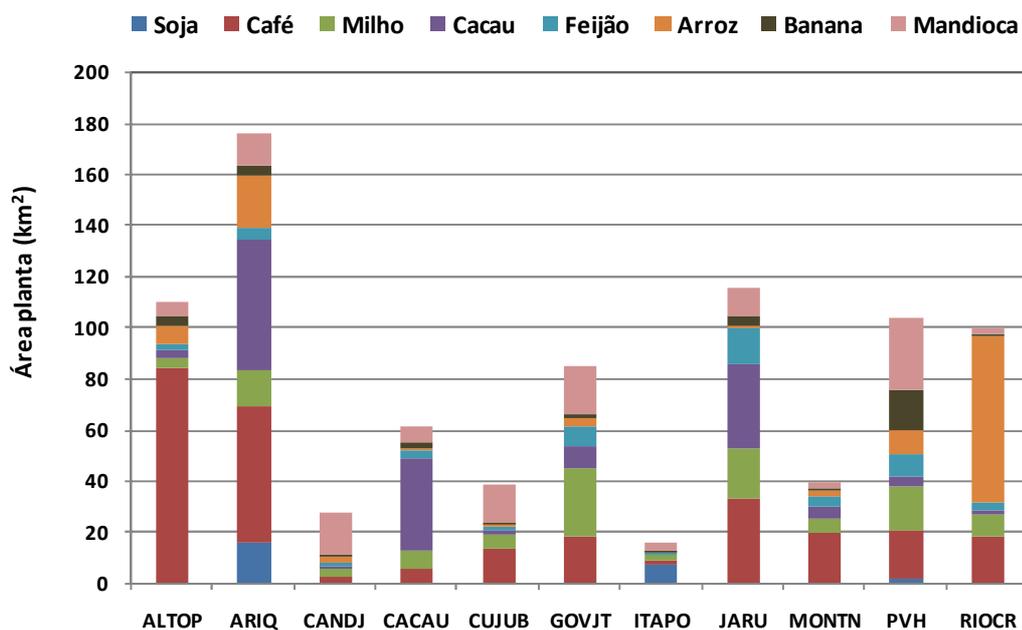


Figura 04: Área plantada das oito principais culturas de Rondônia com área territorial na sub-bacia do rio Jamari: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru) MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).

Em áreas utilizadas para agricultura frequentemente há o uso de agrotóxicos para o combate de pragas, e fertilizantes, visando melhorar a qualidade nutricional do solo. Em decorrência destas práticas, os fertilizantes nitrogenados e fosfatados contribuem para o enriquecimento de nutrientes dos corpos d' água (Tundisi, 2003).

Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (2012), no Brasil foram entregues ao consumidor final em 2011, 541.000 toneladas de fertilizantes nitrogenados e 401.000 toneladas de fertilizantes fosfatados, os quais são utilizados principalmente em culturas como o arroz, café, algodão e cana-de-açúcar. Os Estados de Mato Grosso, São Paulo e Minas Gerais foram os principais mercados consumidores. A fonte para obter informações acerca da quantidade de fertilizantes que entram no Estado de Rondônia anualmente é através das notas emitidas pela Secretaria de Finanças do Estado de Rondônia, o que inviabilizou a obtenção desta informação (Dagoberto Gonçalves de Abreu, IDAROM, comunicação pessoal, 2012).

Além da agricultura e da pecuária, outro fator importante, que contribui para a entrada de fósforo e nitrogênio aos corpos d' água é o lançamento de efluentes domésticos e industriais. Rondônia não possui um pólo industrial expressivo, dados do IBGE (2008) informam que a pecuária, por exemplo, tem uma contribuição oito vezes maior para o PIB do Estado que a indústria.

O volume de efluente doméstico produzido por uma população está relacionado à sua densidade populacional. O município de Porto Velho, com 428.527 habitantes possui a maior densidade populacional, segundo o censo 2010 (IBGE). No entanto apenas 0,47% da sua área territorial encontra-se inserida nesta sub-bacia. Os municípios com maior área inserida na sub-bacia do rio Jamari são Cacaulândia (99%), Monte Negro (90%), Rio Crespo (77%), Governador Jorge Teixeira (73%) e Ariquemes (70%). Conjuntamente, estes municípios apresentam uma população de 124.008. A distribuição da densidade populacional nos municípios com área na sub-bacia do rio Jamari é apresentada na figura 05.

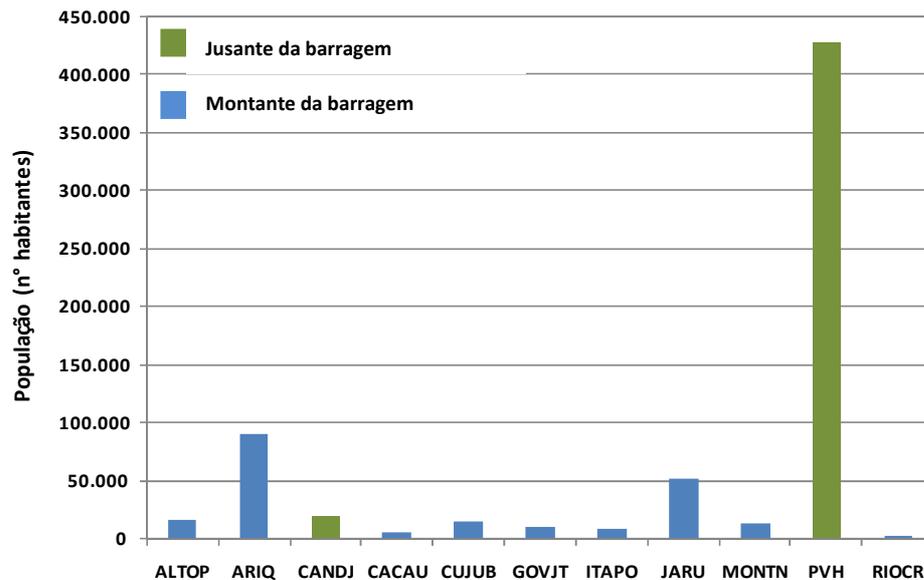


Figura 05: Densidade populacional dos municípios com área territorial na sub-bacia do rio Jamari: ALTOP (Alto Paraíso), ARIQ (Ariquemes), CANDJ (Candeias do Jamari), CACAU (Cacaulândia), CUJUB (Cujubim), GOVJT (Governador Jorge Teixeira), ITAPO (Itapuã do Oeste), JARU (Jaru), MONTN (Monte Negro), PVH (Porto Velho) e RIOCR (Rio Crespo).

Rondônia possui apenas 1,6% dos seus municípios atendidos por rede coletora de esgoto ocupando, o último lugar no ranking brasileiro divulgado pelo IBGE (2008). Cidades que tratam de 70-100% do esgoto doméstico produzido não se encontram inseridas na sub-bacia do rio Jamari (figura 06-a). Por esta razão, é comum nas residências o uso de fossas rudimentares como solução alternativa para destinação do esgoto doméstico (figura 06-b), bem como é comum o despejo do esgoto *in natura* nos corpos d' água menores que cortam as áreas urbanas dos municípios. Apenas 3,8% dos municípios do Estado tratam de 70-100% do esgoto gerado (IBGE, 2008).

As alterações ambientais sofridas pelos ecossistemas terrestres e aquáticos da região amazônica, decorrentes do desmatamento, não se restringem apenas ao aumento dos processos erosivos decorrentes do uso do solo, ou do lançamento de efluentes sem prévio tratamento. Estudos demonstram que a região passará por mudanças climáticas que poderão alterar seu ciclo hidrológico (Li *et al.*, 2009). O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) prevê longos períodos de seca para toda a bacia amazônica. Para bacias, como a do rio Negro, estima-se um déficit de 37% de chuvas. Em decorrência do aumento dos

gases do efeito estufa em todo o planeta, as projeções também apontam para um aumento na temperatura do ar de até 3,5°C, até o final do século XXI (Candido *et al.*, 2007). Desta forma, os habitats amazônicos terrestres e aquáticos certamente serão afetados pelas alterações climáticas previstas até o final deste século.

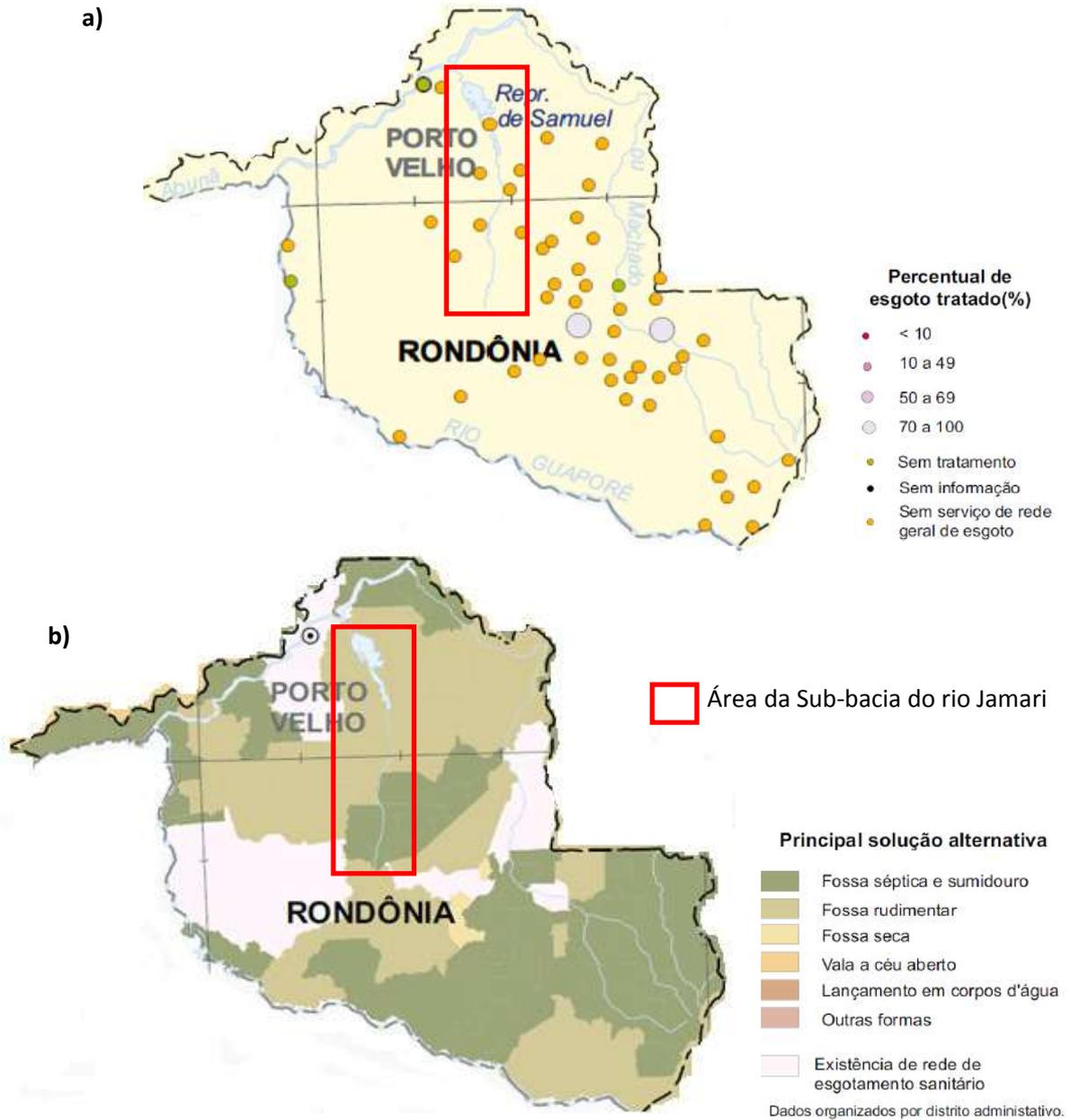


Figura 06: Percentual de esgoto tratado por município (a) e soluções alternativas à rede coletora de esgoto sanitário (b). Fonte IBGE (2008 e 2011).

Em decorrência dos cenários de aumento da temperatura global previstos pelo IPCC, discussões acerca dos possíveis efeitos de temperaturas mais elevadas no aumento de

florações tóxicas de cianobactérias já se iniciaram no meio científico. Baseados em estudos de campo e com cepas isoladas, as primeiras discussões apontam para o favorecimento do desenvolvimento destes microrganismos em temperaturas mais elevadas (Elliot *et al.*, 2005; Paerl, 2008; Paerl *et al.*, 2011).

Esta breve explanação acerca da degradação ambiental que o Estado de Rondônia tem sofrido, com ênfase na sub-bacia do rio Jamari, demonstra que várias são as fontes de entrada de nutrientes (fósforo e nitrogênio) para este sistema aquático, nutrientes estes frequentemente associados a florações de cianobactérias. A sub-bacia do rio Jamari certamente não se encontra em um processo de eutrofização artificial nos moldes daqueles que ocorrem principalmente na região Sudeste do Brasil. Haja vista que a área hidrográfica da sub-bacia é igual a 582,64km², e provavelmente o volume de água ali presente ainda é capaz de autodepurar a carga de nutrientes recebida pelas mais diversas fontes. No entanto, é fato que a degradação ambiental do seu entorno acarreta a maior entrada destas substâncias no sistema, que somada a outros fatores, influencia a composição da comunidade fitoplanctônica neste ambiente.

Considerando os aspectos relacionados aos problemas ambientais e de saúde pública associados a florações de cianobactérias produtoras de toxinas e face aos registros dessas florações em diferentes regiões do Brasil, como Nordeste, Sudeste e Sul (Matthiensen *et al.*, 1999; Yunes, 2009; Minillo, 2005; Andrade *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2009; Vasconcelos, *et al.*, 2011), fica evidente a necessidade de estudos ecológicos e fisiológicos com cepas de cianobactérias da região amazônica. Estes estudos podem ajudar a entender os mecanismos que propiciam a ocorrência de florações e dominância de cianobactérias nesses ecossistemas aquáticos tropicais.

1.4. Cianobactérias

A presença das cianobactérias no planeta data de 3,5 bilhões de anos. Foram encontrados fósseis de cianobactérias no noroeste da Austrália, e estudos de datação indicaram terem sido estes microrganismos os primeiros produtores a liberarem oxigênio na atmosfera terrestre (Yoo *et al.*, 1995).

As cianobactérias são caracterizadas como microrganismos procariontes, aeróbios e fotoautotróficos. Seus processos vitais são dependentes de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. Não possuem membranas envolvendo os tilacóides, nos quais são encontrados a clorofila *a* e os pigmentos fotossintéticos acessórios. Possuem parede celular constituída de polissacarídeos ligados a polipeptídios (desprovidas de celulose), com estrutura química semelhante às bactérias Gram-negativas, membrana plasmática, cápsula ou bainha mucilaginosa, sendo a reprodução apenas assexuada (Sant'Anna *et al.*, 2006).

Quanto a sua morfologia, podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosas. O tamanho de suas células pode variar de 2-40 µm de diâmetro. Podem viver em simbiose com plantas e fungos, serem bentônicas ou se distribuírem na coluna d' água. São cosmopolitas e podem ser encontradas em diferentes habitats, como lagos antárticos, fontes termais, rochas úmidas e solos ácidos. Sua existência mais comum, no entanto, é na forma planctônica, tanto em ambientes marinhos como de água doce (Kaebernick & Neilan, 2001).

As cianobactérias apresentam vantagens adaptativas para estocar fósforo (formação de grânulos de fosfato), capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (espécies que possuem heterocitos), habilidade para minimizar a herbivoria, e fluuabilidade na coluna d' água (Pettersson *et al.*, 1993; Haney, 1987; Reynolds, 1987; Paerl, 2006).

Com o aumento das concentrações de fósforo e nitrogênio na coluna d' água, principalmente em decorrência do processo de eutrofização artificial, as cianobactérias passam a predominar sobre os outros grupos fitoplanctônicos, formando as florações. Entretanto, quando os níveis de fósforo e nitrogênio não se encontram elevados, as cianobactérias ficam em desvantagem na competição pela assimilação destes nutrientes em relação aos outros grupos, que nestas condições crescem melhor (Yunes *et al.*, 1996). Um dos gêneros mais comuns associados às florações de cianobactérias é o gênero *Microcystis*, sendo *Microcystis aeruginosa* a espécie mais comumente encontrada nas florações tóxicas em todo o mundo (Tsutsumi *et al.*, 1998).

1.5. Cianotoxinas

As cianobactérias são potencialmente produtoras de toxinas conhecidas como cianotoxinas, que constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos (Carmichael, 1992). Devido à complexidade da estrutura molecular de algumas dessas cianotoxinas, a exemplo das microcistinas (heptapeptídeos cíclicos), a maioria dos autores concordam que estes metabólitos secundários não sejam gerados ao acaso, já que na síntese dessas moléculas estão envolvidos processos químicos e biológicos complexos (Kaebernick & Neilan 2001). Uma hipótese recente sugere que as cianotoxinas seriam moléculas mediadoras da interação entre as cianobactérias e também com outros componentes do habitat, como bactérias heterotróficas, fungos, protozoários e algas de diferentes grupos. Outros estudos também sugerem que a produção dessas cianotoxinas esteja relacionada à comunicação intercelular, seja intra ou interespecífica (Kearns e Hunter, 2000; Dittmann *et al.*, 2001, Bar-Yosef *et al.*, 2010, Kaplan *et al.*, 2012).

A maioria das cianotoxinas está em grande parte contida dentro das células de cianobactérias e podem ser liberadas ao meio por lise celular ou quando ocorrem mudanças na permeabilidade da membrana da célula, decorrentes da ação de algum fator ambiental (Soong *et al.*, 1992). Vários gêneros e espécies de cianobactérias podem produzir cianotoxinas, as quais apresentam efeitos danosos para a biota aquática, podendo também atingir a saúde humana. De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. No entanto, por sua ação farmacológica, as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são as neurotoxinas e as hepatotoxinas (Chorus & Bartram, 1999).

As neurotoxinas têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos e são produzidas por espécies incluídas nos gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium* e *Lygbia* e *Cylindrospermopsis* (Carmichael 1994). As toxinas produzidas por espécies dos gêneros citados estão distribuídas em três grupos: anatoxina-a (alcalóide), anatoxina-a (s), organofosforados, e saxitoxinas (alcalóides carbamatos). As neurotoxinas interferem no funcionamento do sistema nervoso e frequentemente causam a morte de animais em poucos minutos pela indução da paralisia dos músculos respiratórios (Carmichael, 1994).

Entretanto, os tipos mais comuns de cianotoxinas são as hepatotoxinas, que podem ser peptídeos cíclicos, como no caso das microcistinas e nodularinas, ou um alcalóide, denominado cilindrospermopsina. As espécies identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Umezakia* e *Aphanizomenon* (Chorus & Bartram, 1999).

As microcistinas são as hepatotoxinas mais comumente encontradas em corpos d' água eutrofizados. São heptapeptídeos cíclicos produzidos por várias espécies de *Microcystis* principalmente por *Microcystis aeruginosa*. No entanto, essas hepatotoxinas também podem ser produzidas por espécies incluídas nos gêneros: *Oscillatoria* (Brittain *et al.*, 2000), *Aphanocapsa* (Domingos *et al.*, 1999), *Synechocystis* (Nascimento & Azevedo, 1999), *Planktothrix*, *Nostoc*, *Anabaena* e *Hapalosiphon* (Yoo *et al.*, 1995; Sivonen, 1996; Dawson, 1998).

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.*, (1988) e leva em consideração a variação dos seus dois L-aminoácidos. Denomina-se microcistina-LR quando seus aminoácidos variantes forem leucina-arginina, microscitina-RR, quando arginina-arginina; seguindo este padrão para as demais variações nos dois L-aminoácidos que essa molécula pode apresentar. Já são conhecidas mais de 70 variantes de microcistinas (Spoon *et al.*, 2003; Cood *et al.*, 2005). A microcistina-LR é considerada a variante mais tóxica e mais frequentemente encontrada nos corpos d' água (Carmichael *et al.*, 1988; Patocka, 2001).

As microcistinas são potentes inibidoras de proteínas fosfatases (PPases) do tipo 1 e 2A de células eucariontes. As PPases são enzimas que atuam na desfosforilação de diferentes proteínas regulando várias atividades celulares. No hepatócitos, a inibição das PPases causada pela ação das microcistinas gera um aumento do status de fosforilação dos microtúbulos e filamentos intermediários dos hepatócitos, desestruturando-os (Mezhoud *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2011).

De uma forma simplificada, as microcistinas são transportadas através dos receptores dos ácidos biliares, chegando aos hepatócitos e causando uma desorganização de seu citoesqueleto. Como consequência há a perda de contato entre as células, dando origem a espaços que passam a ser preenchidos pelo sangue, que começa a fluir dos capilares para esses locais, causando uma hemorragia intra-hepática (Falconer, 1991). Outros efeitos da

microcistina nos hepatócitos já foram observados, como rompimento celular, peroxidação de lipídeos, perda da integridade da membrana, danos no DNA e necrose celular (Fischer & Diehtric., 2000; Runnegar *et al.*, 1981; Erikson *et al.*, 1990; Falconer, 1991, Hooser *et al.*, 1991; Carmichael, 1994; Lambert *et al.*, 1994). Além de já serem reconhecidas como potentes promotoras de tumores hepáticos (Falconer, 1991; Fujiki, 1992 e Nishiwaki-Matsuhima *et al.*, 1992).

Através de estudos de toxicidade oral em níveis subcrônicos, realizados com camundongos (Fawell *et al.*, 1994) e porcos (Falconer *et al.*, 1994), foi estabelecido como limite máximo de ingestão diária aceitável o valor $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas em água para o consumo humano (OMS, 1998). No Brasil, a portaria do Ministério da Saúde 2.914 de 14/12/2011 que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano, estipula como valor máximo permitido de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

O arranjo estrutural dos aminoácidos formadores da molécula de microcistina permite que essas moléculas sejam altamente estáveis e resistentes à hidrólise química e oxidação, em pH próximo do neutro. Já em temperatura elevada (40°C) e condições de pH alto ou baixo, foi observada hidrólise lenta, sendo necessárias aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das microcistinas presentes no meio. Entretanto, já foi observada uma lenta degradação fotoquímica das microcistinas expostas à luz solar e essa degradação aumenta na presença de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis, provavelmente ficobiliproteínas, podendo a degradação variar de duas a seis semanas. A presença de substâncias húmicas também parece acelerar a degradação das microcistinas sob luz solar (Tsuji *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1996; Welker e Steinberg, 1999).

1.6. Cianobactérias, cianotoxinas e fatores ambientais

Os fatores ambientais relacionados à formação de uma floração de cianobactérias são mais conhecidos do que os fatores que levam à produção de cianotoxinas. Estudos em laboratório com culturas de cianobactérias já relacionaram maior crescimento e maior produção de cianotoxinas a fatores como: intensidade luminosa, temperatura, concentração de

macro e micronutrientes, salinidade e pH (Carmichael, 1992; Chorus e Bartram, 1999; Dittmann *et al.*, 2001).

Em geral, as cianobactérias apresentam melhor crescimento em temperaturas em torno de 15 a 30°. Alguns trabalhos já observaram que a produção de microcistinas tende a aumentar em temperaturas mais altas (25-30°) e intensidades luminosas em torno de 40-140 $\mu\text{E}/\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Além disso, a temperatura poderia atuar sobre a estrutura química da molécula, como por exemplo, na formação e posicionamento dos aminoácidos variantes (Song *et al.*, 1998; Kaebernick & Neilan, 2001).

Com relação ao pH, as cianobactérias de uma forma geral apresentam melhor crescimento em águas neutro-alcálicas (pH 7,0-9,0) e conseqüentemente com baixa disponibilidade de CO₂. Já com relação à produção de microcistinas, valores de pH mais baixos aumentariam a síntese (Shapiro, 1990; Caraco & Miller, 1998; Song *et al.*, 1998).

Entre os elementos químicos necessários para a proliferação de cianobactérias, os macronutrientes nitrogênio e fósforo são, em muitos casos, mais determinantes, devido ao fato de que o requerimento por esses elementos é maior do que sua disponibilidade na maioria dos ambientes de água doce não eutrofizados. Por essa razão, o enriquecimento dos corpos d'água por estes macronutrientes fornece condições nutricionais necessárias para a formação e manutenção de uma floração de cianobactérias (Shapiro, 1990 e Pearl, 2008). No caso de *Microcystis*, segundo Kaebernick & Neilan, (2001), por não possuírem heterocitos (células responsáveis pela fixação no N₂), acredita-se que seriam mais sensíveis a alterações nas concentrações de nitrogênio no meio do que de fósforo, visto que as mesmas possuem a capacidade de estocar este elemento. O nitrogênio constitui cerca de 14% da molécula de microcistina-LR. Desta forma, o fornecimento deste nutriente para células de *Microcystis* é de fundamental importância, pois não só é constituinte da estrutura química da toxina, mas também das enzimas envolvidas no complexo processo de síntese da microcistina. Já o fósforo atua na conservação, transporte e na liberação da energia necessária para todo este processo (Ver *et al.*, 2008).

Sistemas de água doce com baixa razão N/P (<15) são mais susceptíveis à dominância de cianobactérias. Ambientes que possuem uma razão N/P mais elevada (>20) são mais susceptíveis de serem dominados por algas eucarióticas. Este comportamento tem sido

observado principalmente em ambientes periodicamente sujeitos a um período de estratificação longo (>30 dias). Este fato tem sido verificado em ambientes de água doce, tanto de regiões tropicais como temperadas (Downing *et al.*, 2001; Pearl, 2008).

No entanto, estudos sobre os efeitos dos macronutrientes no crescimento de cianobactérias e produção de cianotoxinas têm apresentado resultados contraditórios (Lee *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000), e muito provavelmente essas contradições sejam devidas às diferenças nos métodos de cultivo. Por exemplo, em culturas fechadas, foi verificado que em déficit de N a produção de microcistina por *Microcystis* era menor. Já em cultivos contínuos, foi observado que com o aumento da concentração de N a síntese de microcistina aumentou, enquanto que as taxas de outras proteínas permaneceram constantes. A adição de fósforo não produziu efeito sobre a razão microcistina e proteína (Lee *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000).

Com o maior número de estudos sobre a relação entre fatores ambientais e o aumento na densidade de cianobactérias e produção de cianotoxinas, têm-se verificado que não apenas os ambientes eutrofizados estão proporcionando o aumento de florações. Alguns estudos já começaram a demonstrar a relação de fatores como os micronutrientes, que até então não haviam sido investigados, quando comparados aos macronutrientes. .

Lukac & Aegerter (1993) estudaram o efeito do cobre, cobalto, manganês, zinco e ferro no crescimento de células de *Microcystis aeruginosa* e na produção de microcistina. Dentre os elementos analisados, o Zn teve efeito pronunciado no crescimento celular (sendo requerido principalmente durante a fase exponencial), mas não na produção de microcistina, enquanto o ferro teve efeito nos dois fatores analisados. Na ausência ou em baixas concentrações de ferro as células cresceram mais lentamente, mas produziam de 20-40% mais de microcistina. O ferro, quando comparado aos demais micronutrientes, possui mais funções fisiológicas dentro da célula, está envolvido no transporte de elétrons no processo fotossintético, na assimilação de N, respiração e na síntese de clorofilaa.

Estudo realizado por Utkilen & Gjølme (1995) verificou que um aumento na concentração de ferro intracelular em paralelo a intensidades luminosas mais elevadas seriam responsáveis pelo aumento na produção de microcistinas por *Microcystis aeruginosa*. Baseados nos avanços moleculares sobre a síntese de microcistina e em seus experimentos com cepas em laboratório, Utkilen & Gjølme (1995) propuseram um modelo para produção

de microcistina em ambientes com maior disponibilidade de ferro dissolvido na água. Neste modelo o Fe^{+3} presente na água seria convertido pela luz a Fe^{+2} , o qual seria absorvido pela célula de *Microcystis*. Além disso, a atividade de uma ou mais enzimas envolvidas na síntese do heptapeptídeo seria controlada pela quantidade de ferro livre dentro da célula, ou seja, o ferro atuaria com um cofator enzimático (figura 07).

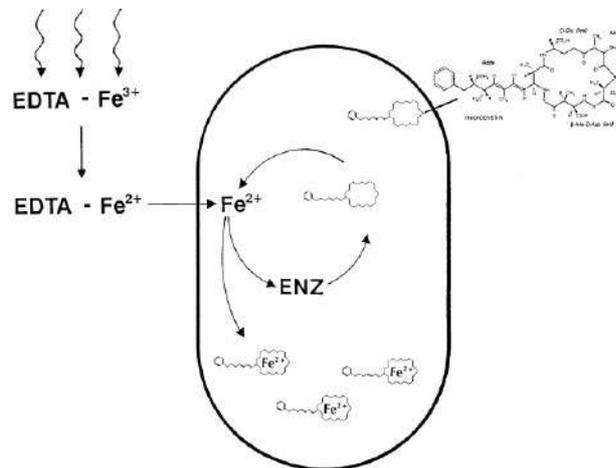


Figura 07: Modelo proposto para síntese de microcistina em ambientes com altas concentrações de ferro dissolvido (Utkilen & Gjølme, 1995).

Jiang *et al.*, (2008) realizaram estudo com cepas de *Microcystis aeruginosa*, sendo testados os efeitos do P, N, micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Co, Cu e Mo), temperatura, intensidade luminosa e pH sobre o crescimento celular e produção de microcistina. Os resultados demonstram que os fatores com maior significância foram: P, N, Fe, intensidade luminosa e temperatura, que atuando em forma conjunta favoreceriam a formação de florações tóxicas.

Entretanto, ainda não houve um estudo conclusivo que apontasse um efeito uniforme de um dos fatores ambientais normalmente investigados (luz, temperatura, nutrientes, salinidade, etc) sobre a produção de uma ou mais cianotoxinas por cianobactérias de grupos taxonômicos distintos. Em contrapartida, o que usualmente é relatado é o efeito de um desses fatores sobre o aumento na densidade de cianobactérias no meio e/ou produção de uma dada cianotoxina por uma cepa isolada, ou mesmo uma correlação sobre uma determinada variável ambiental e o aumento do crescimento e/ou toxicidade de uma floração. De maneira geral, o que está claramente demonstrado é que a variação da maioria desses fatores ambientais

atuaria estimulando ou inibindo o crescimento de uma dada espécie de cianobactéria e, como consequência do aumento dessa biomassa, se teria uma maior concentração de toxinas num dado volume, sem que isso pudesse ser relacionado com o efetivo incremento na síntese dessas moléculas pela célula (Claska & Gilbert, 1998; Nascimento & Azevedo, 1999; Oh *et al.*, 2000).

Também é importante ressaltar que as cianobactérias pertencem a um grupo de espécies antigo e diversificado com diferentes características ecofisiológicas e estratégias adaptativas às condições ambientais. Grande parte dos estudos relatados na literatura tem sido realizada em ambientes eutróficos ou com cepas oriundas desses ambientes, de forma que as conclusões tendem a generalizar para todo o grupo e para os mais diferentes ambientes (Marinho & Azevedo, 2007). Além dos fatores exógenos envolvidos no crescimento e na síntese de toxina por cianobactérias, fatores endógenos, como a biossíntese de pigmentos, estado fisiológico e fase de crescimento, têm importante papel nesses processos e devem ser levados em consideração nos experimentos em laboratório (Paerl & Milli, 1996; Kaebnik & Neilan, 2001).

2. ÁREA DE ESTUDO

A U. H. E. de Samuel localiza-se a 52 km da capital do Estado de Rondônia, Porto Velho. Foi construída no rio Jamari, e sua capacidade máxima de geração é de 216 MW, destinando-se a abastecer o mercado de energia elétrica do Sistema Acre-Rondônia.

A estação M1 localizada a 1,5 km da barragem do reservatório sob as coordenadas geográficas 08°45'02,6"S e 63°26'25,9"W (figura 08) foi selecionada como ponto de amostragem para o desenvolvimento desta tese. A profundidade máxima da estação M1 é de 30 m, registrada no período de cheia. No período de seca a profundidade chega a atingir 25 m. O reservatório de Samuel possui uma área alagada de 584.26 km²(cota máxima), uma vazão média de 265 m³.s⁻¹ e um tempo de residência da água de 3,5 meses (ELETRONORTE, 1998).

A seleção deste ponto foi definida com base em dados pré-existentes de densidade de *Microcystis* sp, encontrada por Nascimento (2006) e por possuir melhores condições logísticas, devido a sua proximidade com o Laboratório de Limnologia da U.H.E. Samuel.

Neste ponto de amostragem foi realizado o monitoramento mensal de variáveis físicas, químicas e biológicas da água por um período de 13 meses.

2.1. Características da área de estudo

2.1.1. Clima

Na região da área de estudo predominam temperaturas elevadas durante todo o ano, com pequena amplitude térmica anual. A média anual da temperatura do ar fica em torno de 24°C a 26° C, com temperatura máxima entre 30°C e 34°C, e mínima entre 17° C e 23°C nas regiões mais altas (SEDAM, 2002). A precipitação média anual varia de 1.800 a 2.400 mm, mantendo uma umidade atmosférica média de 82% ao ano. Mais de 90% desta precipitação ocorre na estação chuvosa. O período sazonal é marcado por duas estações, uma chuvosa com duração de 8 a 9 meses de precipitação (setembro a abril) e outra de estiagem com pouca ocorrência de precipitação e duração de 3 a 4 meses (junho a agosto). Isto define um clima que, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo tropical quente e úmido. A evapotranspiração potencial (ETP) é alta durante todo o ano, apresentando valores superiores a 100 mm/mês. O total anual da ETP só atinge valores superiores aos da precipitação mensal nos meses de maio, junho, julho e agosto (SEDAM, 2002).

2.1.2. Hidrografia

A rede hidrográfica do estado de Rondônia é composta pelo rio Madeira e seus afluentes, que formam oito sub-bacias: Guaporé, Mamoré, Abunã, Mutum-Paraná, Jaci-Paraná, Jamari, Machado e Aripuanã (SEDAM, 2002).

O rio Jamari é um rio de água clara que nasce no sudoeste da Serra do Pacaás Novos à 500 m de altitude, desembocando na margem direita do rio Madeira, após um percurso de aproximadamente 560 km e drenando cerca de 29.700 km². Sua bacia possui um desenvolvimento geral no sentido sul-norte, com comprimento total da ordem de 300 km e largura máxima de 100 km. A vazão média rio Jamari, para o período de 1931 a 1991, situou-se em torno de 345 m³/s, com vazões máximas registradas em fevereiro a abril e vazões mínimas de setembro a novembro (SEDAM, 2002).

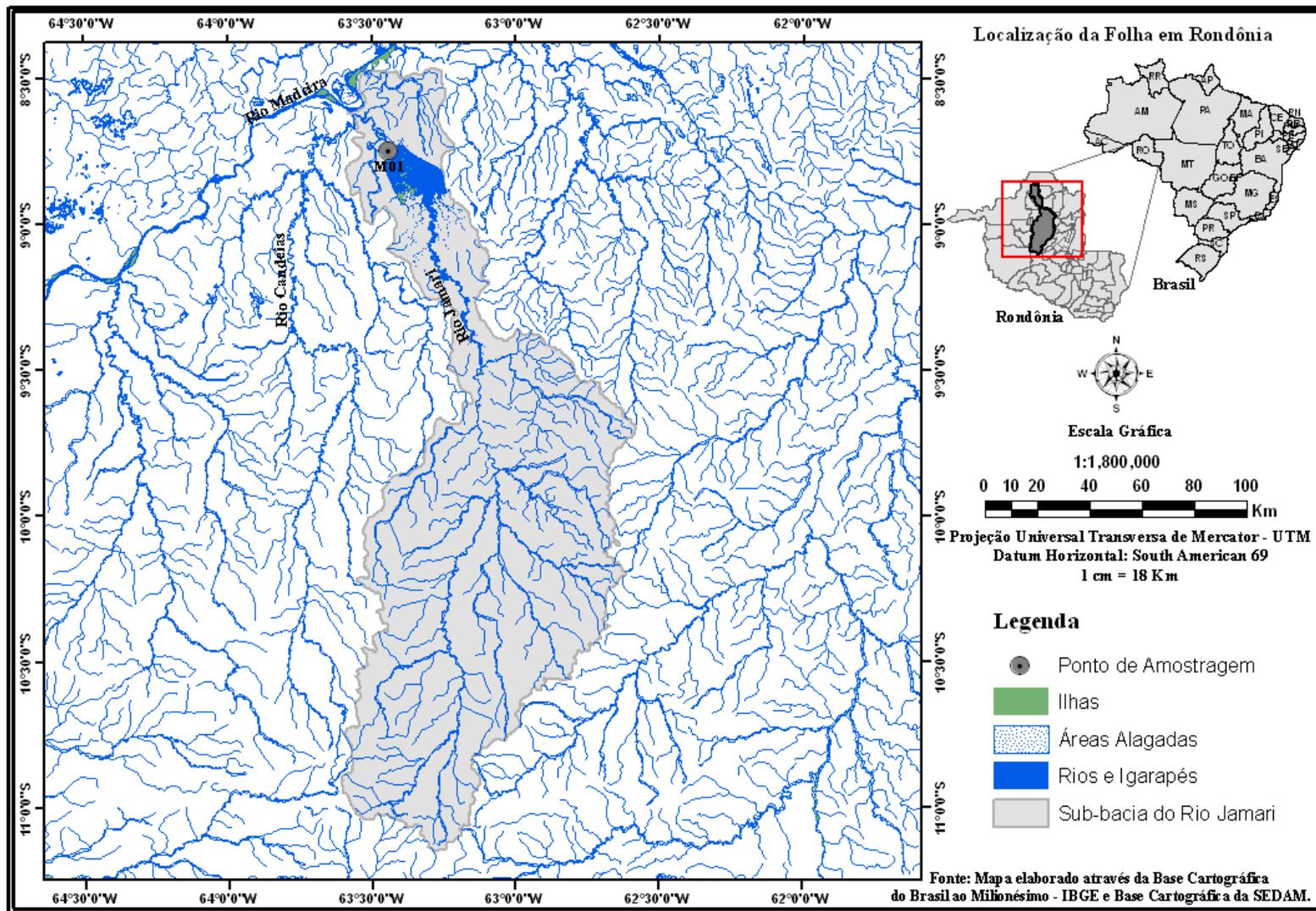


Figura 08: Mapa de localização do reservatório da U.H.E. Samuel evidenciando a estação M1.

Os principais afluentes pela margem direita são os rios Branco, Preto do Crespo e Quatro Cachoeiras e, pela margem esquerda, Massangana e Candeias. A montante do município de Ariquemes é considerado um rio de planalto, com inúmeras cachoeiras. A jusante torna-se um rio típico de planície (SEDAM, 2002).

2.1.3. Pedologia

Conforme o Zoneamento Sócio-econômico ecológico do Estado de Rondônia (ZSEERO, 2002), o grupo mais representativo de solos presentes na sub-bacia hidrográfica são os latossolos. Estes geralmente são solos bastante intemperizados, apresentando como principais minerais os derivados da argila: caolinita, gipisita, minerais amorfos e sesquióxidos de ferro e alumínio. Em razão da forte lixiviação, sua capacidade de troca catiônica é baixa, assim como a quantidade de cálcio, magnésio, potássio e sódio adsorvidos. Os Latossolos Vermelho-Amarelos Distróficos são os mais frequentes, sendo geralmente pobres, ácidos, álicos e distróficos. Outro grupo de solos importante na área de estudo são os Cambissolos. Este grupo de solos se caracteriza pela presença de horizonte “câmbico”, o qual contém uma boa proporção de minerais intemperizáveis. São poucos a moderadamente profundos e ocorrem nas encostas das colinas. Desenvolveram-se a partir de rochas ácidas, possuindo, em geral, baixa fertilidade e reação ácida. Em função do seu relevo e de suas características físicas, são muito suscetíveis à erosão se desprovidos da sua cobertura vegetal. Outro grupo importante são os Podzólicos, que apresentam acumulação de argila. Caracterizam-se pelo horizonte B textural argiloso, ácidos, frequentemente álicos e distróficos, com baixa saturação de bases. O tipo de argila predominante é a caolinita, embora seja comum a ocorrência de óxido e sesquióxidos de ferro e alumínio.

2.1.4. Geomorfologia

Dentre as unidades geomorfológicas que compõem a sub-bacia do rio Jamari se destaca a Superfície de Aplanamento que compreende extensas superfícies aplanadas, tratadas na literatura geomorfológica brasileira como elaboradas por processos de pediplanação. Estas superfícies abrangem centenas de quilômetros quadrados e possuem pendentes regionais geralmente abaixo de 1%. Como o processo de aplanamento não ocorreu necessariamente em

toda a área ao mesmo tempo e existiam pré-condições estruturais e de paleorelevos, bem como variabilidade de embasamento, pode-se entender porque estas extensas superfícies podem variar altimetricamente de 100 m de altitude nas proximidades do rio Madeira até mais de 350/400 m na base de relevos residuais do tipo *inselbergs*. Outro aspecto que mostra transformação neste sistema é o intenso processo de meteorização das rochas e formação de espessos mantos de coluvios e solos. Resíduos do processo de aplanamento são observados pela existência de *inselbergs* e campos de matações dispersos por toda a superfície (ZSEE-RO, 2002).

Outra unidade que se destaca são as “Cuestas” e “Hogback” com relevos assimétricos, associadas às faixas de dobramentos, com grande amplitude e correspondendo, nesta área, a relevos de caráter residuais circundados por superfícies de aplanamento (ZSEE-RO, 2002).

2.1.5. Vegetação

Conforme a classificação das formações vegetais do Estado de Rondônia, baseada no Zoneamento Socioeconômico e Ecológico do estado (ZSEE-RO, 2002), a vegetação na área de estudo é composta por Floresta Ombrófila Aberta, com trechos compostos por Savana Arborizada ou Cerrado Arbóreo. Dentre estes tipos vegetais, a floresta Ombrófila Aberta, presente em 115.932 km² ou 49% do Estado de Rondônia, é a predominante. Este tipo de floresta possui dossel bem distinto, com indivíduos emergentes e sub-bosque estratificado, podendo estar associadas a palmeiras e cipós. Ocorrem principalmente sobre latossolos e podzólicos, ou seja, em solos antigos, rasos, fortemente intemperizados, com afloramento de rochas, seixos superficiais e lateritas de idades variadas desde o quaternário (aluviais), predominando no terciário até o pré-cambriano.

Na margem direita da barragem da U.H.E. – Samuel cresce a Floresta Ombrófila Aberta de Terras Baixas sobre latossolos ou solos lateríticos, medianamente profundos e bem drenados e com dossel aberto. Nesta categoria as florestas podem ainda ser mistas com palmeiras e/ou cipós. Em geral a estrutura da comunidade comporta até 180 espécies e uma densidade entre 400 e 500 árvores/hectare.

3. OBJETIVO GERAL

- Conhecer a dinâmica sazonal da comunidade fitoplanctônica do reservatório da U.H.E. Samuel, com ênfase em Cianobacteria, através de estudo de campo e de laboratório, a fim de avaliar os fatores ambientais controladores do desenvolvimento deste grupo e da produção de cianotoxinas.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO I:

- Conhecer a dinâmica sazonal da comunidade fitoplanctônica do reservatório da U.H.E. Samuel, com ênfase em Cianobacteria;
- Determinar as principais variáveis limnológicas reguladoras da ocorrência e densidade de cianobactérias e produção de cianotoxinas neste ambiente;

CAPÍTULO II:

- Através de experimentos em microcosmos, verificar se a adição de nutrientes na água do reservatório favorece o crescimento de cianobactérias;

CAPÍTULO III:

- Verificar a influência do ferro sobre diferentes aspectos fisiológicos de uma linhagem de *Microcystis pannifomes* isolada do reservatório da U.H.E. Samuel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS – ANDA, 2012. www.anda.org.br/index.php?mpg=00.00.00&ver=por, acessado em 05/07/2012.

ANDRADE, C. M.; GOMES, C. T. S.; ARAGÃO, N. K. C. V. SILVA, E. M.; LIRA, G. A. C. T., 2009.. Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobacteria no reservatório de Tapacurá-PE. Ver Inst Adolfo Lutz, 68 (1):109-117.

BAR-YOSEF Y., SUKENIK A., HADAS O., VINER-MOZZINI Y., KAPLAN A., 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. Curr. Biol. 20: 1557–1561.

BONILLA, A. L. C. Balanço de nitrogênio em microbacias pareadas (floresta vs. pastagem) no Estado de Rondônia. 2005. Dissertação. Universidade de São Paulo. 87p.

BRAZ, S. P.; NASCIMENTO J. R. D.; CANTARUTTI, R. B., 2002. Aspectos quantitativos do processo de reciclagem de nutrientes pelas fezes de bovinos sob pastejo em pastagem de *Brachiaria decumbens* na zona da Mata de Minas Gerais. Revista Brasileira de Zootecnia, 31 (2): 858-865.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, B. R.; BUNNER, D. L.; ELLOF, J. N.; FALCONER, I. R.; GORHAM, I. R.; HARADA, K. I.; KRISHNAMURTHY, T.; MOORE, R. E.; RINEHART, K. L.; RUNNEGAR, M. T. C.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M., 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxin of cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon, 26:971-973.

CANDIDO, L. A. 2007. O clima atual e futuro da Amazônia nos cenários do IPCC: a questão da savanização. Ciência e Cultura, 59 (3): 44-47.

CARACO, N.; MILLER, R., 1998. Direct and indirect effects of CO₂ on competition between a cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton. Canadian Fish Aquatic Science, 55:54-62.

CARMICHAEL, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Scientific America, 270(1):78-86.

CARMICHAEL, W. W.; 1992. Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, 72: 445-459.

CENTRAIS ELÉTRICAS DO NORTE DO BRASIL, 1998. Relatório técnico. 85p.

CHORUS, I.; BARTRAM, J., 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, 416p.

CLASKA, M. E. & GILBERT, J. J., 1998. The effect of temperature on the response of *Daphnia* to toxic cyanobacteria. Freshwater Biology, 39: 221-232.

- COLE, G.A., 1994. Textbook of limnology. Waveland Press, Illinois: 412p.
- COOD, G.A.; MORRISON, L.; METCALF, J., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. Toxicology and Applied Pharmacology, 203: 264-272.
- COSTA, I. A. S.; CUNHA, S. R. S.; PANOSSO, R.; ARAÚJO, M. F. F.; MELO, J. L. S.; SANT'ANNA, E. M. E., 2009. DINÂMICA DE CIANOBACTÉRIAS EM RESERVATÓRIOS EUTRÓFICOS DO SEMI-ÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE. Oecol. Bras., 13(2): 382-401.
- DAWSON, R., 1998. The toxicology of microcystins. Toxicon, 36 (7): 935-962.
- DITTMAN, E.; ERHARD, M.; KAEBERNICK, M.; SCHELER, C., NEILAN, B.; VON DOHREN, H.; BORNER, T., 2001. Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Microbiology, 147:3119-3133.
- DOMINGOS, P.; RUBIM, T. K.; MOLICA, R. J. R.; AZEVEDO, M. F. O.; CARMICHAEL, W. W., 1999. First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from of northeast brasilian drinking water supply. Environmental Toxicology, 14(1): 31-35.
- DOWNING, J.A.; WATSON, S.B.; MCCAULEY E., 2001. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes. Canadian Journal Fish Aquatic Science, 58: 1905–1908.
- ELLIOTT, J. A., THACKERAY, S. J., HUNTINGFORD, C., JONES, R. G., 2005. Combining a regional climate model with a phytoplankton community model to predict future changes in phytoplankton in lakes. Freshwater Biology, 50: 1404-1411.
- ERIKSSON, J. E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J. P.; MERILUOTO, J., 1990. Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR a cyclic peptide toxin. Biochem. Biophys. Acta, 1025 (1): 60-66.
- FALCONER, I. R., 1991. Tumor promotion and liver Injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environmental Toxicology and Water Quality, 6: 177-184.
- FAWELL, J. K.; JAMES, C. P.; JAMES, H. A., 1994. Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Water Research Centre. Medmenham, UK. p.1-46.
- FERRÃO-FILHO, A. S., MOLICA, R. & AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias. Oecol. Bras., 13(2): 225-228, 2009.
- FERREIRA, E.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S., 1995. Destino do 15N – urina bovina aplicado na superfície de um solo podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira

de Zootecnia – SBZ, Brasília – DF, 32: 109-110.

FISCHER, W. J.; DIETRICH, D. R., 2000. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). Toxicol. Appl. Pharmacol., 164 (1): 73-81.

FUJIKI, H., 1992. Is the Inhibition of protein phosphatase 1 and 2A activities a general mechanism of tumor promotion in human cancer development? Molecular Carcinogenesis, 5:91-94.

GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS – IBGE/GCEA-RO, 2012. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA. Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento da Safra Agrícola no Ano Civil SAFRA 2011/2012, 25p.

HANEY, J. F., 1987. Field studies on zooplankton-Cyanobacteria interactions. N.Z.J. Marine Freshwater Research, 21: 467-475.

HARADA, K. I.; TSUJI, K.; WATANABE; M. F., 1996. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. Phycologia, 35(6): 83-88.

HOOSER, S., BEASLEY, V. R., WAITE, L., KULLENSCHMIDT, M., CARMICHAEL, W. W., HASCHEK, W., 1991. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Vet. Patho., 28: 259-266.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2008. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. 219p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2008. Produto Interno Bruto dos Municípios 2004-2008, 212p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário, 2006. 141p.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS-INPE. MONITORAMENTO DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA POR SATÉLITE-PRODES. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2012.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H., 2008. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium-*Microcystis aeruginosa*. Harmful Algae, 7: 127-136.

JOUNG, S.H.; OH, H.M.; KO, S.R.; AHN, C.Y., 2011. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. Harmful Algae, 10: 188-193.

- JUNK, W.J.; BAYLEY, B.P.; SPARKS, E.R., 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. 110-127. In: DODGE, P.D. Proceeding of the International large river Symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci., v. 106.
- KAEBERNICK, M. & NEILAN, B. A., 2001. Ecological and molecular investigation of cyanotoxin production. FEMS Microbiology Ecology, 35: 1-9.
- KAPLAN, A.; HAREL, M., KAPLAN-LEVY, R. N., HADAS, O., SUKENK, A., DITTMANN, D., 2012. The Languages Spoken in the Water Body (or the Biological Role of Cyanobacterial Toxins). Front Microbiology, 3: 138.
- KEARNS, K. D.; HUNTER, M. D., 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. Environmental Microbiology, 2(3): 291-297.
- LABRY, C.; HERBLAND, A.; DELMAS, D., 2002. The role of phosphorus on planktonic production of the Gironde plume water in the Bay of Bicay. Journal of Plankton Research, 24: 97-117.
- LAMBERT, T., BOLAND, M., HOLMES, C., HUDREY, S., 1994. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant. Environmental Science Technology, 28: 753-755.
- LEE, S. J., JANG, M. H., KIM, H-S., YOON, B-D & OH, H-M., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N:P ratio and growth stage. Journal Applied Microbiology, 89: 323-329.
- LI, W.; FU, R.; DICKINSON, R. E. J. Geophys. Res., 111, D02111, 2009
- LIU, X.; LU, X.; CHEN, Y., 2011. The effects of temperature and nutrient rations on *Microcystis* blooms in Lake Taishu, China: 11-year investigation. Harmful Algae, 10: 337-343.
- LUKAC, M.; AEGERTER, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 31: 293-305.
- MARTINS, M.L.N. & SPERLING, E.V., 1997. Dinâmica do ferro e do manganês no hipolímnio do reservatório Serra Azul em Minas Gerais. Livro de Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Foz do Iguaçu, 1525-1538.
- MATTHIENSEN, A; YUNES, J. S; CODD, G. A., 1999. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. Revista Brasileira de Biologia; 59 (3): 361-376.
- MENG, G.; SUN, Y.; FU, W.; GUO, Z.; XU, L., 2011. Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells.

Toxicologia, 290: 218-229.

MEZHOUD, K.; PRASEUHT, D.; PUISEUX-DAO, S.; FRANÇOIS, J. C.; BERNARD, C.; EDERY, M., 2008. Global quantitative analysis of protein expression and phosphorylation status in the liver of the medaka fish (*Orzias latipes*) exposed to microcystin-LR I. Balneation study. Aquatic Toxicology, 86:166 – 175.

MINILLO, A., 2005. Análise da distribuição, densidade e toxicidade de florações de cianobactérias em reservatórios do médio e baixo rio Tietê (SP) e relação com as características limnológicas do sistema. Tese (Doutorado). Ciências da Engenharia Ambiental. 400p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2004. Portaria 518 de 25 de março de 2004. 15p.

MOILINIER, M.; GUYOT, J. L.; OLIVEIRA, E.; GUIMARÃES, V.; CHAVES, A., 1995. Hidrologia da bacia do rio Amazonas. Ciência e Tecnologia, 41: 31-36.

MORTATTI, J.; VICTORIA, R. L.; TARDY, Y., 1997. Balanço de Alteração e Erosão Química na Bacia Amazônica. Geochimica Brasiliensis, 11(1): 1-13.

NASCIMENTO, E. L., 2006. Concentração de Mercúrio no Plâncton e Fatores Ecológicos do Reservatório da U.H.E-Samuel-Amazônia ocidental (Rondônia/Brasil). Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente-Universidade Federal de Rondônia. 122p.

NASCIMENTO, S. M.; AZEVEDO, S. M. F. O., 1999. Changes in cellular components in a cyanobacterium (*Synechocystis aquatilis* f. *salina*) subjected to different N/P ratios-An ecophysiological study. Toxicology, 14 (1):37-44.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R., OHTA, T., NISHIWAKI, S., SUGANUMA, M., KOHYAMA, K., ISHIKAWA, T., CARMICHAEL, W. W., FUJIKI, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. Journal Cancer Research Clinic Oncology, 118: 420-424.

OH, H-M.; LEE, S.J.; JANG, M. H.; YOON, B-D., 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. Journal Applied Microbiology, 66: 176-179.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-OMS. 1998. Guidelines for Drinking-Water Quality. 1º edição, 540p.

PÁDUA, J. A., 2000. Biosfera, história e conjuntura na análise da questão amazônica, História, Ciências e Saúde. 1: 6-19.

PAERL, H.; MILLIE, D., 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria.

Phycologia,35(6): 160-167.

PAERL, H.W. & HUISMAN, J., 2008. Blooms like is hot. Science, 320: 57-58.

PAERL, H.W., 2006. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. In: H.K. Hudnell (ed): Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine and Biology.

PAERL, H.W., HALL, N.S., CALANDRINO, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. Science of the Total Environment, 40: 1739-1745.

PATOCKA, J. 2001. The toxins of cyanobacteria. Acta Medica, 44: 69-75.

PEARL, H., 2008. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater–marine continuum. In: ISOC-HAB Executive Advisory Committee. Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms (ISOC-HAB): State of the Science and Research Needs. 952p.

PEREIRA, J. M. O processo de ocupação e de desenvolvimento da Amazônia. (1997). Brasília. 34(134:12p.

PETTERSSON, K.; HERLITZ, E.; ISTVANOVICS, V., 1993. The role of *Gloeotrichia echinulata* in the transfer of phosphorus from sediments to water in lake Erken. Hydrobiologia, 25: 123-129.

REYNOLDS, C. S., 1987. Cyanobacterial water-blooms. Advances in botanical research. Academic Press., London. p. 67-143. v. 13.

REYNOLDS, C. S., 1998. What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? Hydrobiologia, 369/370: 11-26.

RUNNEGAR, M.; FALCONER, I. R.; SILVER, J., 1981. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Archives of Pharmacology,317: 268-272.

RUSSELLE, M. P., 1997. Nutrient cycling in pasture. In: Simpósio Internacional Sobre Produção Animal em Pastejo, Viçosa–MG. GOMIDE, J.A. (33d.). Viçosa: UFV, 235-266.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. P. T.; ARAUJO, L. F.; CARVALHO, M. C.; CARVALHO, L. R.; SOUZA, R. C. R., 2006. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais. Editora: Interciência. 60P.

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO AMBIENTAL DE RONDÔNIA-SEDAM.,2002.

Atlas Geoambiental de Rondônia, Porto Velho. 20p.

SHAPIRO, J., 1990. Current beliefs regarding dominance of blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. Int Verein Theor Angew Limnol Verh, 24:38-54

SIOLI, H. & KLINGE, H., 1964. Solos, tipos de vegetação e água na Amazônia. Boletim Geográfico: informações, notícias, bibliografia e legislação, 179: 147-153.

SIVONEN, K., 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia, 35 (6): 12-24.

SMITH, V.H., TILMAN, G.D. NEKOLA, J.C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental Pollution, 100: 179-196

SOARES, M. T. S.; SANTOS, S. A.; ABREU, U. G. P., 2007. Estimativa Preliminar do Conteúdo de Nitrogênio Depositado via Fezes Bovinas no Pantanal da Nhecolândia. Comunicado Técnico 65. ISSN 1981-7231, Corumbá- MS, 1-6.

SOARES-FILHO, B. S.; NEPSTAD, D. C.; CURRAN L.; CERQUEIRA, G. C.; GARCIA R. A.; RAMOS C. A.; VOLL, E.; MCDONALD, A.; LEFEBVRE P.; SCHLESINGER, P.; MCGRATH, D., 2005. Cenários de desmatamento para a Amazônia. Estudos Avançados, 19 (54): 137-152.

SONG, L.; SANO, T.; LI, R., WATANABE; M. M.; LIU, Y.; KAYA, K., 1998. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycological Research, 46(Suppl.): 19-23.

SOONG, F. S.; MAYNARD, E.; KIRKE, K.; LUKE, C., 1992. Illnes associated with blue green algae. The Medical Journal of Australia, 156:67.

SOUZA, V. A. S. Eventos de precipitações extremas na Amazônia Ocidental, Rondônia – Brasil. 2012. Monografia. Universidade Federal de Rondônia. 75p.

SPOOF, L.; VESTERKVIST, P.; LINDHOLM, T.; MERILUOTO, J., 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Journal Chromatography, A 1020: 105-19.

THOSI, H., 1996. Suplementação mineral em pastagens. In: Simpósio Sobre Manejo da Pastagem, Piracicaba – SP. PEIXOTO, A.M. *et al.* (34ds.). Piracicaba: FEALQ, 151-183.

TSUJI, K.; NAITO, S.; KONDO, F.; ISHIKAWA, N.; WATANABE, M. F.; SUZUKI, M.; HARADA, K. I., 1993. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. Environmental Science Technology, 28: 173-177.

TSUTSUMI, T.; NAGATA, S.; YOSHIBA, F.; YUENO, Y., 1998. Antiidiotype monoclonal

antibodies against anti-microcystin antibody and the use in enzyme immunoassay. Toxicon,36: 235-245.

TUNDISI, J. G., 2003. A crise da água: eutrofização e suas consequências. In: Água no século XXI: Enfrentando a escassez. Editora: Rima, São Carlos-SP. 67-82p.

UTIKLEN, H.; GJOLME, N., 1995. Iron-simulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Apply Environmental Microbiology, 61: 797-800.

VASCONCELOS, J.F.; BARBOSA, J.E.L.; DINIZ, C.R.; CEBALLOS, B.S.O., 2011. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores Boletim ABLimno. 39 (2): 20p.

VIERS, J.; BARROUX, G.; PINELLI, M.; SEYLER, P.; OLIVA, P.; DUPRÉ, B.; BOAVENTURA, G.R., 2005. The influence of the Amazonian floodplain ecosystems on the trace element dynamics of the Amazon River mainstem (Brazil). Science of the Total Environment, 339: 219–232.

WELKER, M.; STEINBERG, C., 1999. Indirect photolysis of cyanotoxins: one possible mechanism for their low persistence. Water Research,33: 1159-1164.

WU, S.K.; XI, P.; LIANG, G.D.; WANG, S.B.; LIANG, X.M., 2006. Relationships between microcystins and environmental parameters in 30 subtropical shallow lakes along the Yangtze River, China. Freshwater Biology, 51: 2309-2319.

XU, Y.; YANG, F.; LIU, Y.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, G.; LI, R., 2011. Genetic diversity of *Microcystis* populations in a bloom and its relationship to the environmental factors in Qinhuai River, China. Microbiological Research, 167: 20-26.

YOO, R. S., CARMICHAEL, W.W., HOEHN, R. C. & HRUDEY, S. E. (1995). Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide. American Water Works Association – Research Foundation, U.S.A. 229p.

YUNES, J. S., 2009. Florações de *Microcystis* na Lagoa dos Patos e o seu estuário: 20 anos de estudos. Oecol. Bras., 13(2): 313-318.

YUNES, J. S.; SALOMÓN, P. S.; MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; RAGGETT, S. L.; COSS, G. A.; 1996. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos Lagoon estuary, southern Brazil. Journal of Aquatic Ecosystem Health, 5:223-229.

ZONEAMENTO SÓCIO-ECONÔMICO ECOLÓGICO DE RONDÔNIA-ZSEE-RO. (2002). Governo do Estado de Rondônia, Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral (SEPLAN/RO). 2ª Aproximação do Zoneamento Sócio-Econômico e Ecológico de Rondônia.

CAPÍTULO I

Fatores ambientais controladores da dinâmica da comunidade fitoplanctônica, com ênfase em Cyanobacteria e produção de cianotoxinas, no reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel (Rondônia).

INTRODUÇÃO

O padrão sazonal dominante na bacia Amazônica é a flutuação pronunciada e previsível no nível da água dos rios (pulsos), que por sua vez tem influência marcante na sazonalidade ao longo da bacia, resultando em períodos definidos de águas altas (enchente e cheia) e águas baixas (vazante e seca) durante o ano (Junk, 1997; Goulding *et al.*, 2003). Os pulsos, em um contexto mais abrangente, são definidos como qualquer tipo de flutuação, natural ou artificial, no nível das águas que afete os sistemas aquáticos naturais ou artificiais. Os pulsos de origem natural são resultantes de mudanças climáticas, tais como vento e precipitação, e os pulsos artificiais, são aqueles induzidos pelo homem. No caso dos reservatórios os pulsos de origem artificial ocorrem, por exemplo, pela manipulação dos níveis de água e através da abertura e fechamento das comportas. Neste último caso uma das consequências é a perda de biomassa de fitoplâncton e zooplâncton, e da exportação de nutrientes para a jusante Logo, grande parte dos sistemas aquáticos artificiais funciona impulsionada por flutuações de curta ou longa duração, que têm impacto nos ciclos biogeoquímicos e na organização das comunidades (Tundisi *et al.*, 2005).

A comunidade fitoplanctônica apresenta ciclos sazonais e anuais relacionados com as variáveis ambientais, cujo resultado é manifestado na comunidade através de uma modificação qualitativa e quantitativa das espécies nas diferentes épocas do ano (Reynolds, 1984; Sommer, 1984). Em ambientes de regiões tropicais, as variáveis ambientais que regulam os padrões de sazonalidade do fitoplâncton não são apenas luz e temperatura, como nos ambientes temperados, visto que em ambientes tropicais estes fatores podem ser considerados mais constantes ao longo do ano. Desta forma, outras variáveis passam a ter maior relevância, tais como: a precipitação, o vento e flutuação no nível da água, que por sua vez, geram padrões de variações na disponibilidade de nutrientes e luz, refletindo-se nos ciclos das populações fitoplanctônicas (Reynolds, 1984, 2006).

Buscando verificar quais as variáveis ambientais relacionam-se com a formação de florações de cianobactérias, bem como com a síntese de cianotoxinas nos ambientes aquáticos, é crescente o número de trabalhos que realizam monitoramentos sazonais da densidade de cianobactérias, em paralelo ao monitoramento de variáveis físicas, químicas e biológicas da água (Havens *et al.*, 2003; Wuet *et al.*, 2006; Onderka, 2007; Xiao *et al.*, 2009; Daves *et al.*, 2009; Haander *et al.*, 2011; ; Jänichen *et al.*, 2011; Joung *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012). Vários fatores ambientais estão relacionados ao bom desenvolvimento de cianobactérias, tais como nutrientes, luz e temperatura. Estes fatores não atuam de forma isolada, geralmente duas ou mais variáveis ambientais podem ser relacionadas ao desenvolvimento de florações em um dado sistema (Xiao *et al.*, 2009).

O aumento da densidade de cianobactérias, gerando as florações, tem sido amplamente relacionado a ambientes eutróficos (Reynolds, 2006; Schindler *et al.*, 2008), mas novas abordagens indicam que as mudanças climáticas globais podem contribuir para estes eventos (O' Neil *et al.*, 2012; Pearl & Paul, 2012). Há um consenso de que o aumento da temperatura em decorrência das alterações climáticas irá favorecer o desenvolvimento de cianobactérias potencialmente tóxicas (Pearl & Huisman, 2008; Pearl & Paul 2012). Soma-se a esta discussão, a revisão de Reichwaldt e Ghadouani (2012), que aborda a influência das alterações nos padrões de chuva em decorrência das alterações climáticas e seus efeitos na formação de florações. Regiões que apresentarem intensos eventos de chuva, ou seja, elevado volume em determinado tempo, poderão ter um aumento no desenvolvimento de cianobactérias, devido à entrada de nutrientes por lixiviação do solo, o que pode ser agravado dependendo do tipo de uso do mesmo. Desta forma, eventos extremos de chuva previstos para a região (Cândido *et al.*, 2007) poderão contribuir para entrada de nutrientes nos ecossistemas aquáticos amazônicos. Entretanto, sob este paradigma, são necessários estudos mais detalhados para predizer os efeitos que alterações climáticas poderão causar em reservatórios de U.H.Es da Amazônia (Soito & Freitas, 2011).

Moisander *et al.*, (2009) sugerem que o aumento das concentrações de nitrogênio favorece a permanência de florações de *Microcystis* sp e que o fósforo seria um nutriente limitante secundário. Vézic *et al.*, (2002) colocam que a combinação de concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo são cruciais para a formação da floração. Apesar dos estudos que tratam da importância dos nutrientes para o aumento da densidade de cianobactérias

potencialmente tóxicas muitas vezes chegarem a diferentes conclusões, aqueles relacionados à temperatura se mostram mais concordantes sugerindo que temperaturas elevadas favorecem a proliferação de cianobactérias (Butterwiki *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011; Pearl & Paul, 2012).

Outros fatores importantes também relatados na literatura que favorecem a formação de florações são: condições reduzidas de turbulência da água (Reynolds, 1987) e ambientes com baixas razões N:P, devido a uma baixa afinidade por nitrogênio (Smith, 1983), tolerância a baixa intensidade luminosa (Reynolds, 1987; Smith, 1996), bem como a predação pelo zooplâncton pode ser inibida pela produção de cianotoxinas (Fulton & Pearl, 1987; Agrawal, 1998).

Fatores ambientais não agem apenas sobre a biomassa das cianobactérias, mas também sobre a produção de cianotoxinas. Estudos realizados em campo (Chen *et al.*, 2009) e em laboratório (Jiang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011) acerca dos fatores ambientais que apresentam melhor correlação com a produção de microcistinas por *Microcystis aeruginosa*, têm sido cada vez mais frequentes. Principalmente devido ao fato de espécies do gênero *Microcystis* apresentarem uma biomassa abundante durante a formação de florações de cianobactérias (Paerl & Huisman, 2008). Vézic *et al.*, (2002), demonstraram que linhagens tóxicas de *Microcystis* sp apresentam melhor crescimento que linhagens não-tóxicas, quando expostas a concentrações mais elevadas de nitrogênio.

Entretanto, considerando seu impacto ambiental e de saúde pública, estudos acerca da ecologia do fitoplâncton com ênfase em cianobactérias e produção de cianotoxinas, são escassos em reservatórios da região amazônica, podendo-se citar apenas Vieira *et al.*, (2005). Já em rios amazônicos, até o presente momento há apenas duas publicações que registram florações de cianobactérias. Há registro de floração de *Cylindrospermopsis raciborski*, nos rios Iriri e Xingu na região de Altamira no Estado do Pará, tendo sido também detectada a presença de saxitoxina na água bruta (Vieira & Vieira, 2003). Outro episódio de floração registrado ocorreu no rio Tapajós, na região de Santarém, também no Estado do Pará (Sá *et al.*, 2010). A floração registrada por estes autores foi composta por *Microcystis* sp e *Anabaena* sp, havendo registro também da presença de microcistina em amostras de água bruta.

Comumente, estudos realizados com a comunidade fitoplanctônica na região consistem em levantamentos taxonômicos (Lopes e Bicudo, 2002; Santiago e Keppeler,

2011), e os estudos de cunho ecológico predominam em rios (Fisher, 1976; Smith Jr e Demaster, 1996; Aprile e Mera; 2007), lagos ou áreas de planície de inundação (Pinilla, 2006; Almeida, 2008; Silva *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o primeiro capítulo desta tese foi desenvolvido no intuito de verificar quais os fatores ambientais controlam a dinâmica da comunidade fitoplanctônica, ênfase em Cianobacteria e produção de cianotoxinas, no reservatório da U. H. E. de Samuel (Rondônia).

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

A descrição da área de estudo encontra-se no item 02 desta tese.

Ponto amostral e periodicidade das coletas

Para o desenvolvimento desta pesquisa, definiu-se um ponto amostral localizado a aproximadamente 1 km da barragem do reservatório da U. H. E. de Samuel, denominado estação M1. Neste ponto, foram realizadas mensalmente coletas de água da superfície e a cada metro de profundidade da zona eufótica. As coletas foram realizadas durante o período fevereiro/2007 – fevereiro/2008, totalizando 13 amostragens.

Medidas de Campo: A transparência da água foi estimada através da profundidade de extinção do disco de *Secchi*, sendo posteriormente calculada a zona eufótica ($2,7 \times$ a profundidade de extinção do disco de *Secchi*) segundo Cole (1994). Com auxílio da garrafa de Van Doorn foram realizadas amostragens de água a cada metro abrangendo toda a extensão da zona eufótica (destinadas à análise de clorofila *a*, macro e micronutrientes totais e dissolvidos e alcalinidade), bem como a determinação das variáveis limnológicas temperatura, pH e oxigênio dissolvido, determinadas com o uso de sondas com eletrodos específicos (Schott Handy Lab).

Análises Laboratoriais

Alcalinidade total: a alcalinidade foi determinada por titulação potenciométrica com solução de ácido sulfúrico (0,01 N) , segundo metodologia descrita em APHA, (1998).

Clorofila *a*: As amostras de água destinadas à análise de clorofila *a* foram filtradas em laboratório com o uso de filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman), os quais foram preservados congelados até o momento da análise. A concentração de clorofila *a* foi obtida por espectrofotometria, seguindo a metodologia descrita em APHA (1998).

Macronutrientes: os macronutrientes analisados foram nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônio (NH_4^+) e fosfato solúvel reativo (PO_4^{3-}). A determinação destes analitos foi realizada nas amostras de água previamente filtradas (GF/C, Whatman), e através da técnica de separação e análise por cromatografia de íons, utilizando-se cromatógrafo de íons modelo ICS-1000 (Dionex). A análise dos ânions nitrato, nitrito e ortofosfato, ocorreu sob as seguintes condições cromatográficas: colunas AS-14A e AG-14A, eluente 3,5 mM de carbonato de cálcio e 1 mM de bicarbonato de cálcio, em condição isocrática, com supressão de condutividade por supressora ASRS-300. Para remoção do ruído (*background*) também foi utilizada a supressora CRD-300, com fase móvel de hidróxido de sódio 200 mM. Para a análise do amônio (cátion) as condições foram: colunas CS-12A e CG-12A, eluente 20 mM ácido metanosulfônico e supressora CSRS-300.

Micronutrientes: O processo de análise para determinação dos micronutrientes ferro, zinco, cobalto, cobre e manganês, consistiu na concentração destes elementos por evaporação de 1 L de água filtrada em membranas 0,45 μm (fração dissolvida) e água bruta (fração total) em bloco de aquecimento (100°C), com posterior abertura química com ácido nítrico e ácido clorídrico, a fim de que houvesse a liberação dos elementos presentes na amostra (APHA, 1998). A determinação dos micronutrientes foi realizada no Espectrofotômetro de Absorção Atômica por Chama, modelo GBC/AVANTA.

Fitoplâncton: As amostras de fitoplâncton também foram coletadas a cada metro da zona eufótica, com auxílio da garrafa de Van Doorn e fixadas com solução transeaux e posteriormente com solução lugol 5%. As populações foram identificadas, sempre que possível, a nível de espécie. A densidade fitoplanctônica (indivíduos/mL) foi estimada segundo Utermöhl (1958) em microscópio invertido IX50 (Olympus) em aumento de 400

vezes. Os indivíduos (células, colônias, cenóbios, filamentos) foram enumerados em campos aleatórios (Uhelinger, 1964), em número suficiente para alcançar 100 indivíduos da espécie mais frequente, sendo o erro inferior a 20%, e um coeficiente de confiança de 95% (Lund *et al.*, 1958).

O biovolume ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) foi estimado multiplicando-se as densidades de cada espécie pelo volume médio de suas células, sempre que possível considerando as dimensões médias de cerca de 30 indivíduos. O volume de cada célula foi calculado a partir de modelos geométricos aproximados à forma dos indivíduos (Hillebrand *et al.*, 1999).

Microcistinas na água: A cada metro de profundidade da zona eufótica também foram coletados 2 L de água, que após processo de liofilização foram destinados à quantificação de microcistina total (água bruta). Esta quantificação se deu através do teste de imunoenensaio tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando kit Microcistina Placa (Beacon) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Tratamento Estatístico

No intuito de caracterizar os aspectos limnológicos da estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel e avaliar os fatores ambientais correlacionados à dinâmica do fitoplâncton, com ênfase nas cianobactérias, ao longo do período estudado foram utilizadas três tipos de análise de ordenação: Análise das Componentes Principais - PCA, Análise de Correspondência não tendenciosa - DCA e Análise de Correspondência Canônica - CCA. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software CANOCO 4.5.

A matriz para a realização da PCA foi constituída pelos valores médios das variáveis ambientais (limnológicas) obtidos na Zeu ao longo do período estudado, as variáveis correspondem ao pH, oxigênio dissolvido, temperatura, alcalinidade, nitrato, amônio, ortofosfato, ferro dissolvido e total, bem como os valores de profundidade da Zeu e vazão afluente do reservatório.

Através da análise de correspondências não tendenciosa (DCA) foi verificado que o tamanho dos gradientes indicou uma tendência unimodal, sendo recomendada a análise do

conjunto de dados através da Análise de Correspondências Canonônicas - CCA (Leps e Smilauer, 1999).

A matriz para a DCA e CCA foi constituída pelos valores médios mensais da Zeu das variáveis pH, alcalinidade, temperatura, clorofila *a*, nitrato, amônia, ortofosfato, ferro dissolvido. Também constituíram a matriz os dados de profundidade da Zeu e vazão afluente do reservatório, bem como os valores de biomassa das 22 espécies, que contribuíram com 5% ou mais na biomassa da amostra (mês) ao longo do período estudado. De acordo com Taylor e Wetzel (1988) consideram-se espécies mais importantes dentro da comunidade fitoplanctônica (descritores biológicos) aquelas com contribuição igual ou superior a 5% da biomassa total, justificando a adoção do critério.

Para verificar a correlação existente entre as variáveis ambientais e a concentração de microcistina total encontrada na água da estação M1 ao longo do período estudado, foram realizadas análises de correlação de Pearson utilizando o software GraphPrism 3.6. Para estas correlações foram utilizados os valores das variáveis nitrato, amônia, ortofosfato, temperatura, pH e ferro dissolvido, obtidos em cada metro de profundidade da Zeu, bem como dos valores de microcistina total na água bruta, também analisada em cada metro de profundidade da Zeu.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variáveis limnológicas da estação M1

A precipitação média anual da bacia amazônica é de aproximadamente 2.300 mm, havendo áreas com precipitações superiores a 3.000 mm/ano e áreas com mínimas de 1.600 mm/ano (Figueroa e Nobre, 1990). Dados de séries temporais de precipitação mensal disponíveis no sítio da Agência Nacional de Águas (ANA, 2012) mostram que na área do reservatório de Samuel (estação 963001/ANA) os meses com maiores precipitações variaram entre dezembro e março no período de 1979-2007, e os meses com menores precipitações variaram entre junho, julho e agosto (figura 01). No período estudado, as menores precipitações médias mensais ocorreram em junho (0 mm), julho (1 mm) e agosto (2,3 mm). Já a maior precipitação média foi registrada em janeiro/08 (388 mm). A precipitação média

anual para o período de janeiro-dezembro/07 foi de 1.884 mm, estando abaixo (332 mm) da precipitação média anual dos últimos 28 anos, que foi de 2.216 mm.

A precipitação na Amazônia apresenta uma heterogeneidade espacial e temporal, sendo assim seu ciclo hidrológico é caracterizado por um período de águas baixas e um período de águas altas (Figuerola e Nobre, 1990). Entre os períodos de águas baixas e águas altas, há dois períodos de transição, enchente e vazante. Os quatro períodos do ciclo hidrológico (enchente, águas altas, vazante e águas baixas), podem ser facilmente observados pela alteração no nível da água dos lagos amazônicos, por exemplo.

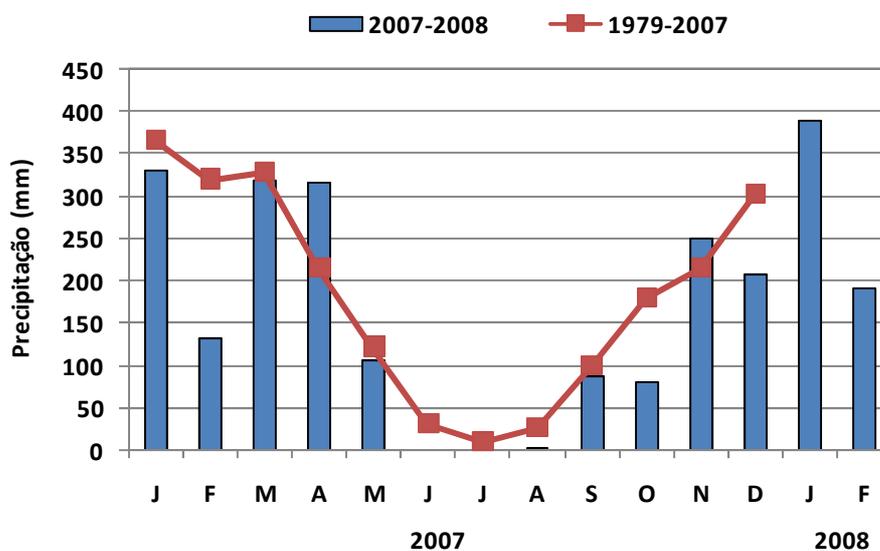


Figura 01: Série temporal da precipitação média mensal na área do reservatório da U.H.E.deSamuel ao longo do período estudado (fevereiro/07-fevereiro/08) e entre os anos de 1979-2007. Fonte: ANA (2012).

Em ambientes aquáticos artificiais da região amazônica, como os reservatórios de usinas hidrelétricas, é possível, através de dados de vazão afluente visualizar os quatro períodos. No entanto, em decorrência da operação da usina o volume de água do reservatório é controlado. Na cheia, o volume de água excedente à operação da usina é liberado para a jusante, conseqüentemente neste período há um menor tempo de retenção da água. Na seca ocorre o represamento da água do reservatório em decorrência dos menores índices pluviométricos, e conseqüentemente o tempo de retenção da água é maior. Os dados de vazão afluente do reservatório de Samuel no período estudado são apresentados na figura 02, evidenciando os quatro períodos do ciclo hidrológico da região amazônica.

Pode-se notar, através dos dados de vazão, que o pico do período de águas baixas ocorreu no mês de setembro (35 m³/s) e o pico do período de águas altas ocorreu em fevereiro/08 (934 m³/s). No ano de 2007, o pico do período de águas altas foi registrado no mês de março (916 m³/s). Comparando os dados de vazão de setembro/07 com os dados registrados em fevereiro/08, nota-se que houve um aumento da entrada de água no reservatório de 26,5 vezes, o que equivale a 2.605 %. É importante relatar que mesmo havendo um aumento na precipitação em setembro/07 (87 mm), isso não foi suficiente para refletir na vazão afluente do reservatório, pois neste mês ainda havia extensas áreas do reservatório expostas (figura 03-b).

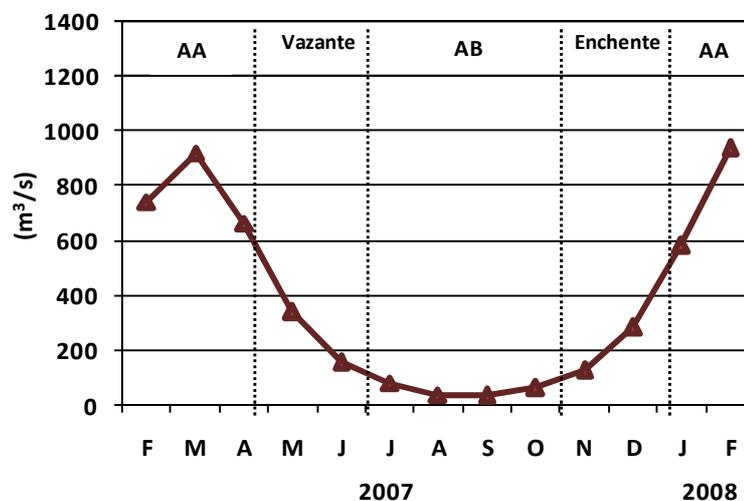


Figura 02: Dados de vazão afluente do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). AA: águas altas; AB: águas baixas.

Através de imagens de satélite é possível observar a expressiva entrada de água advinda da bacia de drenagem e da pluviosidade, a qual influencia na dinâmica deste ecossistema artificial. No período de maior pluviosidade, as áreas expostas no período de águas baixas são novamente conectadas ao sistema aquático (figura 03-a).

O ciclo hidrológico da região amazônica é considerado o principal fator regulador das áreas de planície de inundação (Sioli, 1984; Junk *et al.*, 1989). Sendo assim, a entrada de água nos ambientes aquáticos da região, decorrente do período de águas altas, é muito importante para diversos grupos da biota aquática, a exemplo da comunidade fitoplanctônica, pois com as chuvas há o aporte de macronutrientes e micronutrientes importantes para a produção primária.

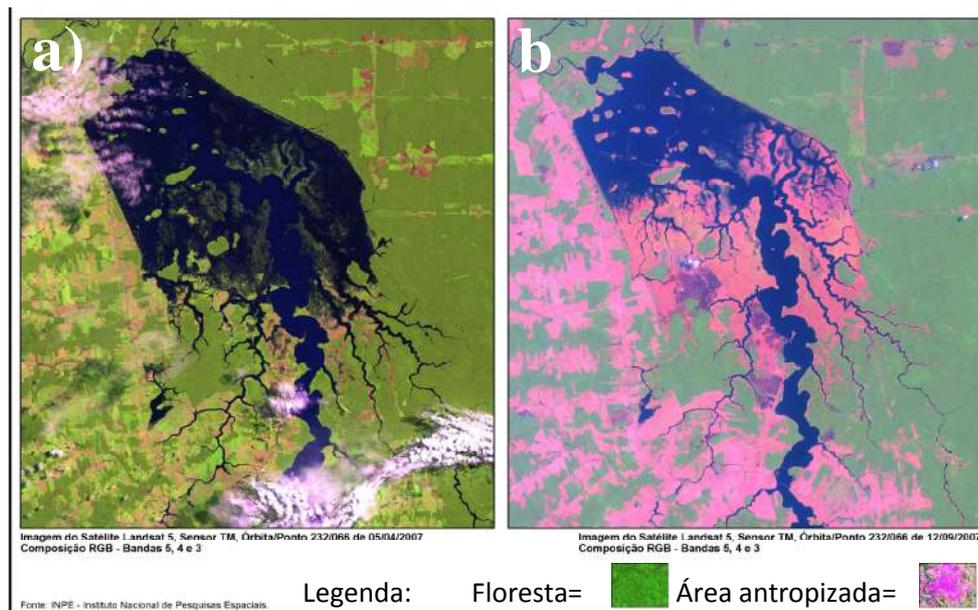


Figura 03: Imagens de satélite do reservatório da U.H.E. Samuel no mês de abril/07, período de águas altas (A) e no mês setembro/07, período de águas baixas (B).

Diferente do que ocorre nos ambientes aquáticos naturais, nos reservatórios a dinâmica do sistema é alterada em função da operação da usina. Desta forma, para melhor discussão da caracterização limnológica da Zeu da estação M1, foi realizada uma análise das componentes principais - PCA. A PCA foi aplicada no intuito de verificar a possível formação de padrões temporais das variáveis. Sendo assim, a projeção das amostras (meses) e das variáveis nos dois primeiros eixos é apresentada na figura 04. O eixo 1 explicou 56,1% da variância dos dados, e o eixo 2 explicou 27,5%, assim o total da variância explicada foi de 83,3%. A PCA apresentou a formação de quatro grupos. O primeiro grupo foi constituído pelos meses característicos do período de águas altas (janeiro, fevereiro e março) denominado período 1 (P1). O segundo grupo (P2) foi constituído por meses característicos da vazante (abril e maio). O terceiro grupo (P3) foi formado por meses do período de águas baixas (junho, julho, agosto, setembro e outubro) e o quarto grupo (P4) foi constituído pelos meses de novembro e dezembro, que correspondem ao período de enchente. Os meses característicos da enchente (novembro e dezembro) se posicionaram distantes um do outro na projeção dos dados da PCA. Tal resultado deve-se ao fato da mistura da coluna d' água ocorrida em novembro com o início das chuvas, ocasionando, por exemplo, a ressuspensão de nutrientes, os quais foram

rapidamente assimilados pelo fitoplâncton, fazendo com que o mês de dezembro assemelha-se à períodos de menor vazão, como o P3.

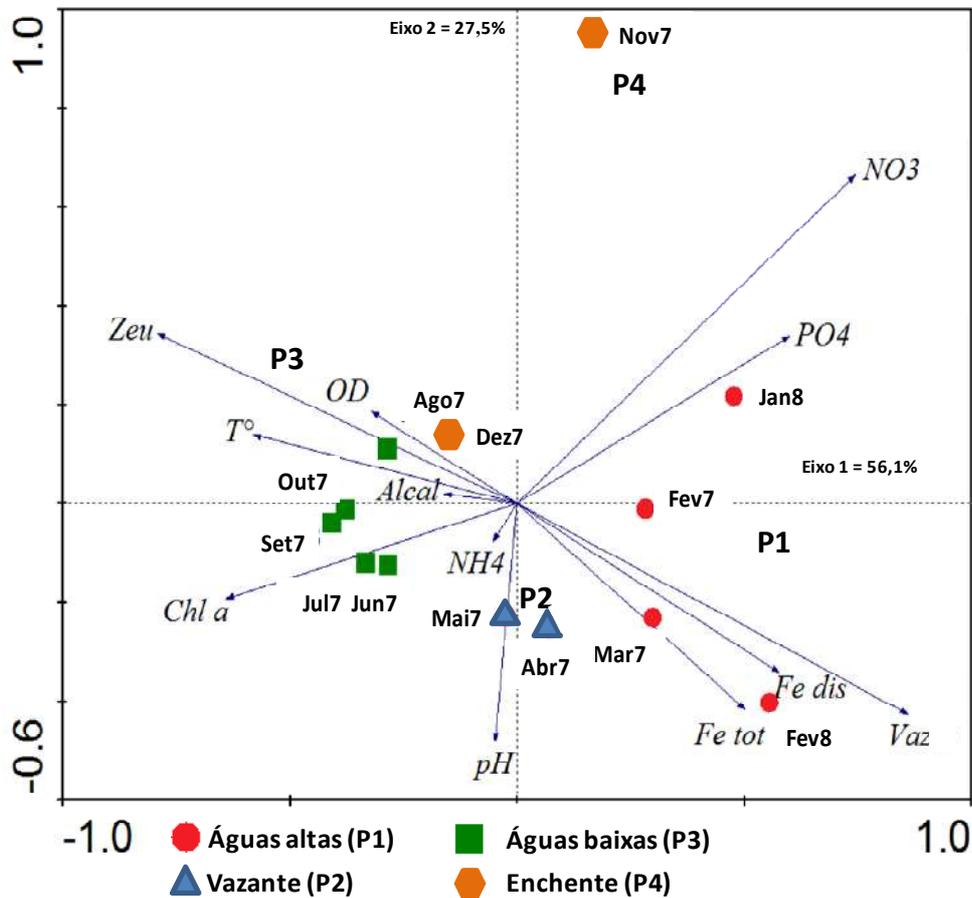


Figura 04: Projeção dos dados da Análise das Componentes Principais (PCA) das variáveis limnológicas (média da Zeu) na estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel no período de fevereiro/07-fevereiro/08. NO₃: nitrato, PO₄: fósforo solúvel reativo, Fe dis: ferro dissolvido, Fe tot: ferro total, Vaz: vazão, NH₄: amônia, Chl a: clorofila a, Alcal: alcalinidade, T° temperatura, Zeu: zona eufótica, OD: oxigênio dissolvido.

As variáveis que tiveram maior contribuição para o eixo 1 foram a vazão, o nitrato e a zona eufótica (tabela 01). Para o eixo 2, as variáveis com maior contribuição foram: nitrato, pH e vazão.

Nos meses de novembro e dezembro, teve início o aumento gradativo da vazão. Em novembro a média mensal já era de $123 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, 48% maior que o mês anterior (outubro). Com

isso foi visível uma entrada expressiva de nutrientes no sistema além da ressuspensão de nutrientes das camadas mais profundas da coluna d'água. O valor médio de nitrato na Zeu foi de $1.145 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de ortofosfato foi de $131 \mu\text{g.L}^{-1}$. Essa característica da água fez com que na PCA o mês de novembro tenha se localizado mais distante (*outlier*). Em dezembro, apesar de a vazão ter aumentado ($264 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$) as concentrações de nutrientes diminuíram, passando a apresentar características mais próximas ao período de águas baixas. Certamente os nutrientes presentes na água em novembro foram consumidos rapidamente pela comunidade fitoplanctônica, visto que em outubro esta comunidade se encontrava em presença de menores concentrações de nutrientes.

Tabela 01: Correlação das variáveis limnológicas nos eixos 1 e 2 resultantes da Análise das Componentes Principais (PCA).

Variáveis	Coeficiente de correlação	
	Eixo 1	Eixo 2
Nitrato	0,7444	0,6647
Amônia	-0,0530	-0,0777
Fosfato	0,6001	0,3396
Oxigênio dissolvido	-0,3205	0,1859
Temperatura	-0,5809	0,1395
pH	-0,0485	-0,4811
Alcalinidade	-0,1611	0,0188
Clorofila <i>a</i>	-0,6415	-0,1933
Ferro dissolvido	0,5773	-0,3416
Ferro total	0,5021	-0,4168
Vazão	0,8602	-0,4257
Zona eufótica	-0,7912	0,3448

A figura 05 apresenta os dados de transparência da água e profundidade da Zeu. Foi possível observar claramente que os menores valores de transparência da água e Zeu foram obtidos no P1. A transparência mínima foi de 1,4 m, o que refletiu uma Zeu de 3,8 m de profundidade em fev/2008.

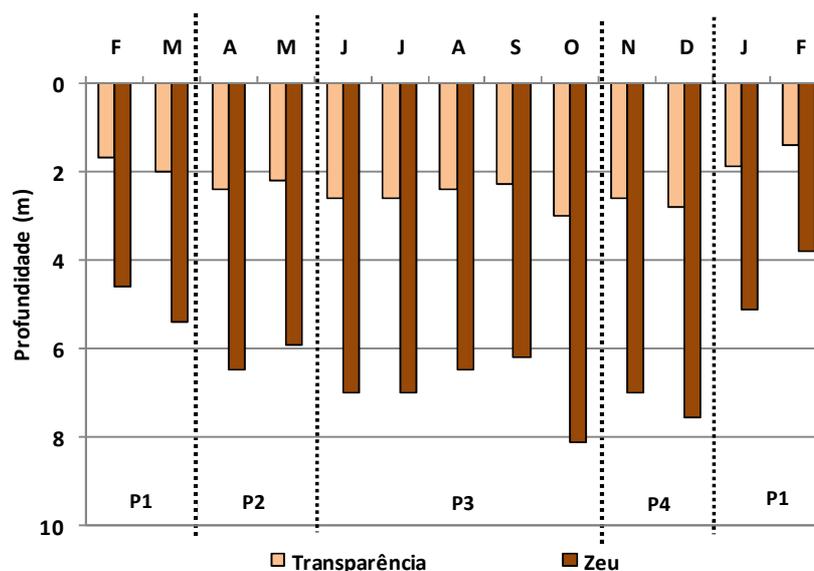


Figura 05: Valores de transparência da água (Secchi) e zona eufótica estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008).

No P1/2007 e P1/2008 foram obtidos menores valores de transparência e consequentemente uma Zeus menos profunda, em decorrência da maior entrada de material alóctone. Com a diminuição da vazão (P2 e P3) houve o aumento da transparência e Zeus, pois a diminuição das chuvas propiciou a maior deposição do material particulado em suspensão na coluna d' água e menor entrada de material alóctone. Os meses de agosto e setembro, apesar de apresentarem como característica baixa pluviosidade, não apresentaram valores mais elevados de transparência e Zeus mais profundas, o que certamente é reflexo do desenvolvimento da biomassa fitoplanctônica, vide os dados de clorofila *a* e biomassa, apresentados posteriormente.

Com relação ao pH (figura 06-a), a Zeus da estação M1 apresentou valores médios mais próximos à neutralidade nos meses de fevereiro/07 a maio (P1/2007 e P2). No P3, principalmente a partir de julho, e no P1/2008 o pH passou a apresentar valores mais baixos (média de 6,5 em outubro). Quanto à alcalinidade (figura 06-b), a mesma variou de 8,5 a 11,5 mg.L⁻¹ de CaCO₃(valores médios). Em decorrência de problemas com o eletrodo de pH, não foi possível a determinação desta variável e da alcalinidade nos meses de novembro e dezembro.

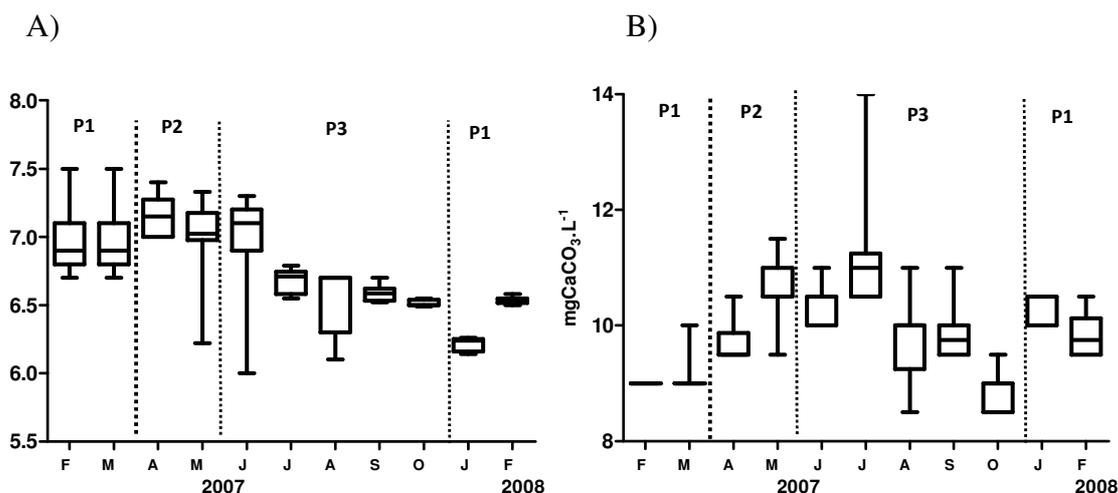


Figura 06: Boxplot mostrando valores de pH encontrados na Zeu (a) e valores de alcalinidade (b) encontrados na Zeu na estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel no período de fevereiro/07-fevereiro/08. As caixas representam o interquartil (25-75%), as barras o intervalo de variação dos valores de pH e alcalinidade obtidos em cada metro de profundidade da Zeu, e as linhas horizontais representam os valores medianos.

A temperatura da água (figura 07-a) apresentou valores mais elevados no P1/2007 e P3, sendo a máxima 31°C registrada na superfície (0 m) nos meses de junho e agosto. Temperaturas mais baixas foram registradas no P1/2008 (média de 28,6°C/janeiro e 28,3°C/fevereiro). A temperatura da água ao longo da Zeu se mostrou homogênea durante praticamente todo o período, visto que em maio, a partir de 4 m de profundidade foram observadas temperaturas mais baixas. A concentração de oxigênio dissolvido na Zeu, variou de 3,7 mg.L⁻¹ (junho/2007/8m) a 9,2 mg.L⁻¹ (agosto/2007/0m) (figura 07-b), com 115% de saturação. Opostamente aos dados de temperatura, as concentrações de oxigênio dissolvido não se distribuíram de forma tão homogênea ao longo da Zeu. Nos meses de maio, junho e julho foram registrados concentrações mais baixas a partir de 5 m de profundidade. Em junho a heterogeneidade das concentrações de oxigênio dissolvido na Zeu foi mais pronunciada, com 6,3 mg.L⁻¹ na superfície (0 m) e 3,7 mg.L⁻¹ na camada mais profunda(8 m).

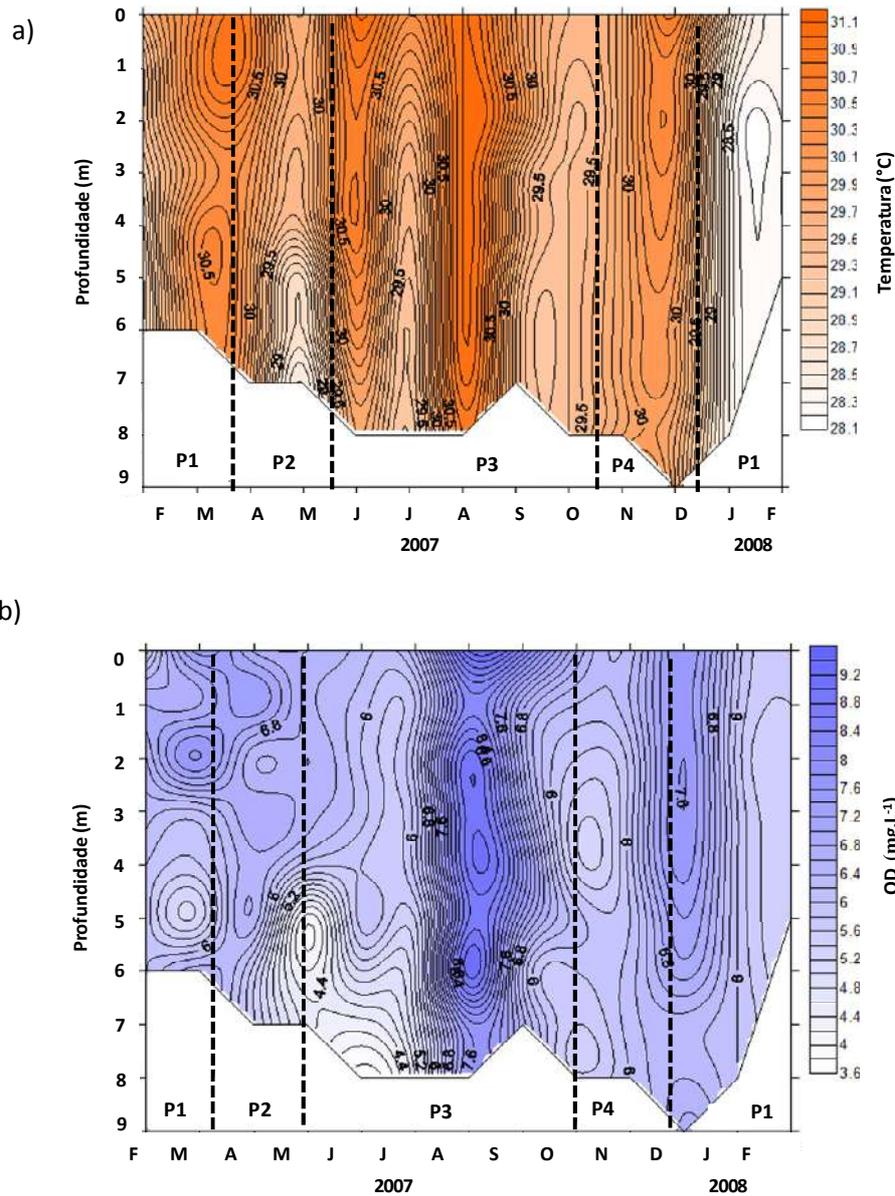


Figura 07: Valores de temperatura da água (a), oxigênio dissolvido (b) encontrados na Zeu na estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel no período de fevereiro/07-fevereiro/08.

No P1 as concentrações de oxigênio dissolvido possivelmente diminuíram em decorrência da ressuspensão de águas anóxicas mais profundas, encontradas nos períodos de menores vazões (P2 e P3), de acordo com dados obtidos por Nascimento (2003). Esta autora verificou estratificação química acentuada em novembro de 2003 na estação M1 do reservatório (fim do período de águas baixas segundo dados de vazão). Foi registrado 7,1 mgO₂.L⁻¹ na superfície e 0,76mgO₂.L⁻¹ a 25m de profundidade. Já no mês de março do

mesmo ano (período de águas altas) as concentrações de oxigênio dissolvido variaram de 5,1 mgO₂.L⁻¹ na superfície a 4,3 mgO₂.L⁻¹, não sendo observada estratificação química.

Dentre os micronutrientes analisados (Fe, Zn, Mn, Co e Cu), o ferro foi o único detectado na fração total e na fração dissolvida (tabela 02) ao longo do período estudado. No entanto, as concentrações de ferro dissolvido em alguns meses apresentaram valores abaixo do limite de detecção da técnica (20 µg.L⁻¹). As maiores médias de ferro dissolvido foram encontradas nos meses de maior vazão: fevereiro (P1/2007), 179,3 µg.L⁻¹, janeiro (P1/2008) 147,0 µg.L⁻¹ e fevereiro (P1/2008) 297,0 µg.L⁻¹, com exceção apenas do mês de julho (P3) 162,7 µg.L⁻¹, correspondente a um período de menores vazões e o qual também apresentou concentração média elevada de ferro. Valores abaixo de 20 µg.L⁻¹ foram encontrados em novembro e dezembro, correspondentes ao período de enchente (P4), visto que neste período foram observados índices pluviométricos mais elevados refletindo em uma maior vazão. Com relação ao ferro total, valores médios mais elevados também foram observados nos meses correspondentes ao P1, 567,5 µg.L⁻¹ (fevereiro/P1/2007), 662,0 µg.L⁻¹ (janeiro/P1/2008), 804,1 µg.L⁻¹ (fevereiro/P1/8), exceção apenas para o mês de maio (P2), o qual também apresentou valor médio elevado, 625,0 µg.L⁻¹.

A entrada de água decorrente do período chuvoso na região amazônica contribui para a entrada de macronutrientes e micronutrientes nos ecossistemas aquáticos. Segundo levantamento da concentração de alguns elementos-traço na fase dissolvida, no Lago Central (Rio Solimões/Amazonas), foram registrados valores de ferro dissolvido na ordem de 121 µg.L⁻¹ no período de cheia, e 68 µg.L⁻¹ no período de seca (Vierset *al.*, 2005), próximos aos encontrados neste estudo.

A concentração dos micronutrientes dissolvidos está relacionada com o tipo de água do ecossistema, águas claras, brancas ou pretas, segundo a classificação de Sioli (1965); e também com a geologia e pedologia da região. A classe mais representativa de solo na área do reservatório de Samuel é a classe latossolos, os quais são ricos em óxidos de ferro e alumínio, e bastante intemperizados (ZSEE-RO, 2002).

Para estar disponível ao fitoplâncton, o ferro deve estar em sua forma dissolvida (Reynolds, 2006). O ferro dissolvido pode ser encontrado em dois estados de oxidação, sua forma reduzida íon férrico (Fe²⁺) e sua forma oxidada, o ferro ferroso (Fe³⁺). O ferro também

pode ser encontrado em sua forma particulada, como o $\text{Fe}(\text{OH})_3$. A química do ferro em águas naturais é complexa, envolvendo reações de complexação, oxirredução, equilíbrio de solubilidade e hidrólise (Wetzel, 1993). Na faixa de pH e Eh das águas naturais oxigenadas (pH 5,0-8,0 e Eh 0,3-0,5), cerca de dois terços do ferro encontram-se na forma particulada, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, enquanto o ferro dissolvido pode ser detectado em apenas um terço desta. Devido à participação ativa do ferro em processos de oxirredução, a liberação de espécies dissolvidas do sedimento para a coluna d' água ocorre somente em condições redutoras, ou seja, em condições anaeróbias (Martins, 1997).

Tabela 02: Concentração de ferro dissolvido e ferro total (média, máximo e mínimo) nas amostras de água coletadas em diferentes profundidades da zona eufótica na estação M1 do reservatório da U.H.E. - Samuel (fevereiro/2007 a fevereiro/2008).

		Ferro dissolvido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			Ferro Total ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
		Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
P1/7	Fev	179,3	243,0	80,13	567,5	740,7	619,5
	Mar	22,7	42,4	<20,0	184,3	247,0	114,5
	Abr	57,1	80,6	23,6	214,2	478,7	88,5
	Mai	51,0	64,4	29,4	625,0	760,3	445,2
	Jun	22,8	35,4	<20,0	314,1	394,0	228,3
	Jul	162,7	279,0	29,0	301,0	381,6	210,4
	Ago	35,7	65,1	<20	263,3	388,6	125,7
P2	Set	39,2	99,0	21,7	175,3	223,1	126,3
	Out	21,0	29,6	<20,0	168,4	187,3	157,0
	Nov	<20,0	<20,0	<20,0	76,3	101,2	34,1
	Dez	<20,0	<20,0	<20,0	41,14	73,3	<20
P1/8	Jan	147,0	251,7	86,1	662,0	989,6	543,3
	Fev	297,0	346,5	271,8	804,1	985,1	673,1

LDT: Limite de Detecção da Técnica = $20\mu\text{g.L}^{-1}$

No presente estudo, foi verificado que as menores concentrações de ferro dissolvido ($<20 \mu\text{g.L}^{-1}$) foram encontradas nos meses de março, junho, agosto, outubro, novembro e dezembro de 2007. Os valores de pH da Zeu ao longo do período estudado estiveram próximos a neutralidade, o que somado às condições óxicas da Zeu, pode ter contribuído para

a baixa solubilidade do ferro. Concentrações mais elevadas de ferro dissolvido (tabela 02) foram encontradas no período de maior vazão (P1), quando ocorre a ressuspensão das águas anóxicas do hipólíminio. Neste período também foram observadas maiores concentrações de ferro total, também decorrentes da ressuspensão de formas particuladas (principalmente $\text{Fe}(\text{OH})_3$) que se encontravam depositadas no sedimento, bem como devido à entrada de partículas alóctones.

Rios de água clara, a exemplo do rio Jamari, são pobres em sedimentos em áreas que possuem uma floresta densa, que protege os solos contra a força erosiva da chuva (Junk, 1983). Exatamente esta proteção está sendo eliminada em grande escala, por causa dos grandes projetos agropecuários, de mineração e industriais implantados na região amazônica, em consequência da disponibilidade de energia hidrelétrica. Por isso, a erosão pode aumentar facilmente de 10 a 100 vezes. Os processos de erosão e lixiviação do solo contribuem significativamente para a entrada de macronutrientes, como o fósforo e o nitrogênio e micronutrientes, a exemplo do ferro, nos ecossistemas aquáticos. A concentração de fósforo e nitrogênio nas partículas orgânicas e inorgânicas que compõem o solo está relacionada à composição química característica do solo de uma região, e também a fatores como o uso e ocupação do mesmo (Tundisi, 2003). O nitrogênio é um elemento essencial ao metabolismo fitoplanctônico. A exploração do gás nitrogênio, abundante na atmosfera, é restrita a um grupo de fotoautotróficos capaz de fixá-lo, desta forma, as principais formas de nitrogênio inorgânico dissolvido, disponíveis para o fitoplâncton são os íons nitrato (NO_3^-), forma mais abundante nos ambientes aquáticos, nitrito (NO_2^-) e amônio (NH_4^+). As fontes de nitrogênio para o ambiente aquático são: a atmosfera, a entrada deste elemento pelos sistemas terrestres ou a reciclagem do mesmo no próprio sistema aquático (Reynolds, 2006). Como fontes antropogênicas citam-se os efluentes domésticos e industriais, o uso de fertilizantes na agricultura e os excrementos de animais decorrentes da pecuária (Tundisi, 2003).

Com relação às formas inorgânicas de nitrogênio, no presente estudo visamos determinar as concentrações de nitrato, nitrito e amônio. Entretanto não foi possível a quantificação do nitrito, visto que é comum este elemento ocorrer em baixas concentrações em águas naturais, pois é um componente intermediário resultante da redução bacteriana do nitrato ou mais comumente da oxidação do amônio (Camacho *et al.*, 2003).

Com relação aos teores de nitrato (figura 08-a) nos meses de fevereiro e março (P1/2007), foram observados valores médios elevados, $571,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $423,9 \mu\text{g.L}^{-1}$,

respectivamente. Nos primeiros meses do P3 os teores de nitrato diminuíram gradativamente, registrando um valor médio de $105,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (junho) e $70,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (julho). No P3 também foi encontrada a concentração mínima de nitrato de todo o período estudado, $60,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (setembro). Com o início das chuvas (P4) as concentrações de nitrato aumentaram, o mês de novembro registrou valor médio de $1.145,4 \mu\text{g.L}^{-1}$. Assim, com o estabelecimento novamente do período de cheia (P1/2008) nos meses de janeiro e fevereiro, os teores de nitrato permaneceram elevados, $915,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $549,7 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Quanto aos valores de amônio (figura 08-b), durante P1/2007 e os dois primeiros meses do P3 (junho e julho), foram encontrados os maiores valores médios deste íon na Zeu, podemos citar o mês de fevereiro com $78,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P1/2007) e o mês de julho com $66,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (P3). Dentre os macronutrientes analisados, o amônio foi o único que apresentou um comportamento mais heterogêneo ao longo da Zeu, com os maiores valores sendo registrados principalmente nas camadas mais profundas. Citam-se, por exemplo, os valores obtidos em abril, $172,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (3 m) e $152,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (4 m), respectivamente. Nestes períodos, as camadas mais profundas da Zeu foram caracterizadas por baixos valores de oxigênio dissolvido e, como já é sabido, baixos valores de oxigênio contribuem para a formação do amônio (Wetzel, 1993). A menor concentração de amônio, ($14,0 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi encontrada em dezembro (6 m).

O fósforo solúvel reativo (PO_4^{3-}) ou ortofosfato é um importante macronutriente para o metabolismo do fitoplâncton. O ortofosfato, forma dissolvida do fosfato, constitui a forma de fósforo disponível para o fitoplâncton (Ferreira *et al.*, 2005). A principal fonte natural de fósforo para os ambientes aquáticos continentais são as rochas da bacia de drenagem (Wetzel, 1993). Como fontes antrópicas, assim como as fontes de nitrogênio citam-se os excrementos de animais, esgotos domésticos e fertilizantes (Tundisi, 2003). O fósforo frequentemente se torna limitante à produção primária de ecossistemas aquáticos. Tal fato se deve à tendência de formar compostos insolúveis associados a argilas e cátions metálicos (Ferreira *et al.*, 2005). Concentrações de ortofosfato menores que $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ são consideradas limitantes (Reynolds, 2006).

O comportamento sazonal do ortofosfato na Zeu é apresentado na figura 08-c. As concentrações de ortofosfato no P1/2007 apresentaram uma distribuição homogênea ao longo da Zeu da estação M1, principalmente nas camadas mais profundas.

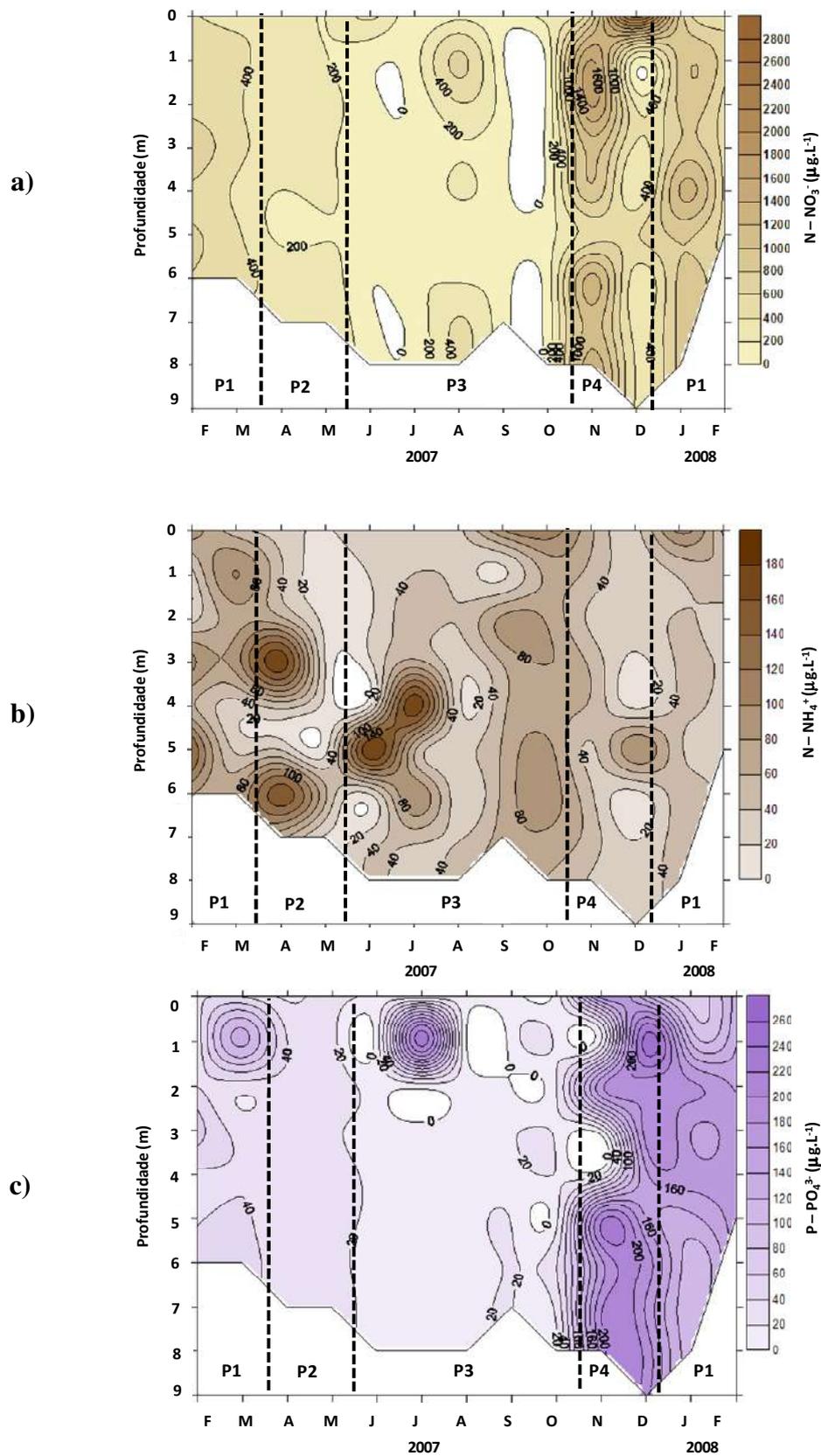


Figura 08: Concentração de nitrato (a), amônia (b) e ortofosfato (c) na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008).

Esse padrão se estendeu até outubro (P3). Durante este período os valores médios de ortofosfato na Zeu variaram de 50,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em março e 9,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em agosto. Exceto o mês de julho, em que foi registrada uma concentração elevada de ortofosfato (230 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1 m), durante todo o P3 foram encontradas baixas concentrações de ortofosfato, agosto, setembro e outubro, apresentaram concentrações médias de 9,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 14,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Novamente com o início das chuvas (P4/enchente) as concentrações de ortofosfato aumentaram. Em novembro o valor médio da Zeu foi de 131,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, concentração seis vezes maior do que a registrada no P3. Com o estabelecimento do período de águas altas (P1/2008) a concentração de ortofosfato permaneceu elevada.

Morris & Lewis (1988) apud Kosten *et al*, (2009), sugeriram que em razões molares entre nitrogênio inorgânico dissolvido e ortofosfato (NID:P) menores que 13:1, o crescimento fitoplanctônico estaria limitado por nitrogênio e acima de 50:1 seria limitado por ortofosfato.

De acordo com Salas & Martino (1991), a maioria dos lagos tropicais da América do Sul apresentam condições limitantes de teores de fósforo. Reynolds (2006) atribuiu como concentração limitante de ortofosfato para crescimento do fitoplâncton o valor de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Apesar de apenas no mês de agosto a média de ortofosfato na Zeu ter sido 9,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, durante o P2, os meses de julho a novembro, apresentaram concentrações de ortofosfato menores que a concentração limitante, em alguma camada da Zeu, indicando que no P2 a comunidade fitoplanctônica esteve moderadamente limitada por P.

Em termos de concentração de NID ($\mu\text{g.L}^{-1}$), ambientes com concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ estariam limitados por nitrogênio (Reynolds, 1999). Se adotássemos neste estudo que ambientes com razões molares abaixo de 13:1 teriam o crescimento fitoplanctônico limitado por nitrogênio (Morris & Lewis, 1988 apud Kosten *et al*, 2009), 77% do período estudado (considerando os valores médios de NID e ortofosfato da Zeu) estaria limitado por NID, incluindo os meses de chuva (P1) que tiveram concentrações de NID superiores a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Por esta razão, adotamos a concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NID como limitante. Desta forma o P3 também esteve moderadamente limitado por nitrogênio.

Assim como para o nitrato e o amônio, ficou claro para o ortofosfato que apesar de serem encontrados valores mais elevados destes nutrientes nos meses de maior vazão (P1/2007 e P1/2008), os mesmos foram assimilados pelo fitoplâncton de forma mais eficiente

nos meses que se seguiram, principalmente no P2 e P3, quando verificou-se seu consumo refletido nos maiores valores de clorofila *a*. A figura 09 apresenta os valores de clorofila *a* obtidos na Zeu da estação M1. Os menores valores foram encontrados entre o período de outubro (média de 2,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, P3) a fevereiro (média de 1,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, P1/2008). Neste período os valores de clorofila *a* estiveram distribuídos de forma homogênea na Zeu. Os maiores valores médios foram registrados no P3 entre junho (média de 5,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e setembro (média de 6,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$) acompanhando os dados de biomassa, que também foram mais elevados nesse período (figura 10-a, b). Foi possível observar também que os maiores valores de clorofila *a*, não foram encontrados na superfície da Zeu, mas sim nas camadas mais profundas, a maior concentração de clorofila *a* obtida no período estudado, por exemplo, foi encontrada em setembro (8,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$) a 3 m de profundidade.

Os dados de clorofila *a*, somados aos dados de nitrato, amônia e ortofosfato mostraram claramente que o desenvolvimento do fitoplâncton não dependeu apenas da presença de macronutrientes e micronutrientes no ambiente, fatores como estabilidade da coluna d' água e aumento da transparência, advindos da diminuição das chuvas intensas, foram importantes para o desenvolvimento desta comunidade.

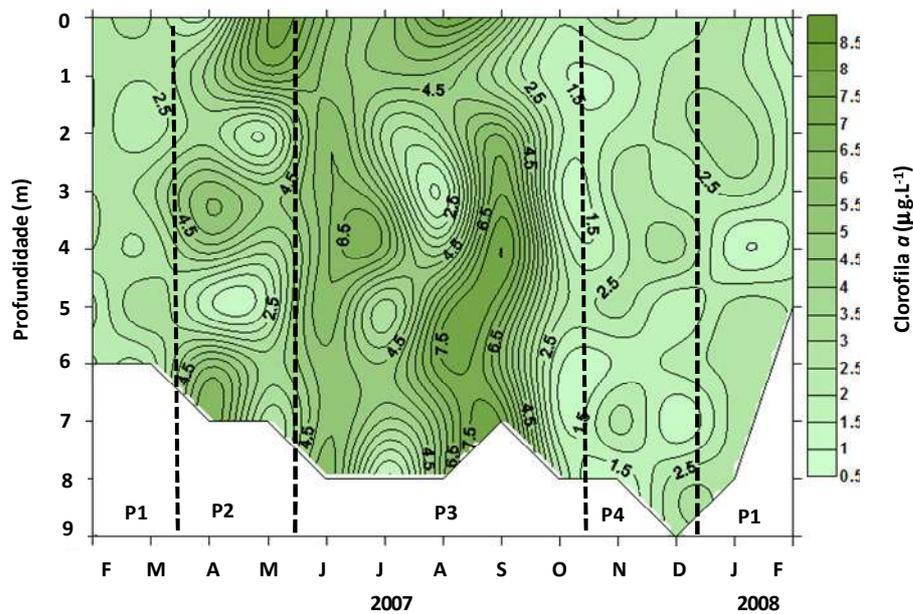


Figura 09: Concentração de clorofila *a* na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008).

Como consequência do maior tempo de retenção, em períodos de menor vazão afluente, a coluna d' água tornou-se menos turbulenta. Somado à presença de nutrientes oriundos do período de águas altas, o fitoplâncton passou a se desenvolver melhor e, como colocado por Huszar (2000), recuperou sua biomassa. Essa idéia é suportada pelos maiores valores de biomassa (figura 10) e clorofila *a* encontrados no P2 e P3, mostrando a importância da estabilidade física do sistema para o crescimento fitoplanctônico.

É importante ressaltar que a menor biomassa fitoplanctônica no P1 também pode estar relacionada à perda de biomassa em decorrência do menor tempo de residência da água neste período. Apesar desta variável não ter sido calculada para o período estudado, de acordo com as normas operacionais das barragens, ao atingir a cota máxima permitida para operação do reservatório, que em Samuel é de 87,4 metros (ELETRONORTE, 1998), há a abertura dos vertedouros visando controlar o nível da água do reservatório (Kelman *et al.*, 2006).

O contrário ocorre em período de menor vazão, como o período de águas baixas (P3), quando o tempo de residência é maior, de forma que houve um acúmulo de biomassa fitoplanctônica na estação M1, em decorrência desta estar situada a apenas 1,5 km da barragem. Os valores de clorofila *a* encontrados no presente estudo estão próximos aos valores encontrados em outros reservatórios de usinas hidrelétricas da Amazônia. Fortes e Pereira (2000), no reservatório de Tucuruí (Pará) encontraram valor médio de clorofila *a* no período de águas baixas de $8,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, valor mínimo de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ e máximo de $15,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. A tabela 03 apresenta os valores médios, mínimos e máximos das variáveis ambientais estudadas mensalmente na Zeu no período de fevereiro/07 a fevereiro/08.

Já é bem estabelecido que a dominância de uma determinada espécie, ou uma composição particular fitoplanctônica, é resultado da combinação de fatores ambientais multidimensionais (Reynolds, 1984). No intuito de entender por que certas espécies fitoplanctônicas se desenvolvem em certas condições ambientais e prever sua distribuição ao longo dos gradientes ambientais, estudos ecológicos desta comunidade são necessários (Litchman *et al.*, 2010). Na região amazônica, apesar dos crescentes esforços, são poucas as publicações sobre a estrutura da comunidade fitoplanctônica (Huszar e Giani, 2004). Desta forma, o presente capítulo também visa contribuir para preencher esta lacuna, principalmente em decorrência da área de estudo constituir um ambiente de águas claras, os quais são menos estudados no que tange à comunidade fitoplanctônica (Camargo e Miyai, 1988).

Tabela 03: Valores médios, máximos e mínimos das variáveis limnológicas estudadas na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel nos períodos de águas altas (P1/2007 e P1/2008), vazante (P2), águas baixas (P3) e enchente (P4), fevereiro/2007 a Fevereiro/2008.

	P1/2007			P2			P3			P4			P1/2008		
	Méd	Máx	Mín	Méd	Máx	Mín	Méd	Máx	Mín	Méd	Máx	Mín	Méd	Máx	Mín
pH	6,9	7,1	6,7	7,1	7,4	6,2	6,6	6,8	6,1	-	-	-	6,4	6,5	6,1
Alcalinidade (mgCaCO ₃ .L ⁻¹)	9,1	10,0	9,0	10,6	11,5	9,5	9,9	14,0	8,5	-	-	-	10,1	10,5	9,5
Temperatura (°C)	29,8	30,6	28,9	29,3	30,7	28,5	30,1	31,0	29,2	30,1	30,7	29,8	28,4	29,0	28,3
Oxigênio Dissolvido (mg.L ⁻¹)	6,3	7,6	5,3	6,0	7,3	4,1	6,5	9,2	4,8	6,6	7,6	6,0	5,8	6,1	5,4
Nitrato (µg.L ⁻¹)	498,0	766,7	341,2	253,2	361,1	151,1	119,4	647,5	13,3	859,3	2.664,0	144,2	732,8	1.223,4	516,6
Nitrito (µg.L ⁻¹)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Amônio (µg.L ⁻¹)	72,0	139,1	31,3	49,0	172,7	11,1	57,2	174,1	16,3	38,6	96,0	14,6	44,2	104,5	28,3
Ortofosfato (µg.L ⁻¹)	46,0	125,7	27,3	30,6	40,1	17,0	17,8	230,4	8,7	156,2	248,4	18,1	145,4	183,2	66,5
Ferro Dissolvido (µg.L ⁻¹)	100,3	243,0	16,1	52,0	80,6	23,6	33,3	274,5	<20	<20	<20	<20	222,0	327,0	86,1
Ferro Total (µg.L ⁻¹)	184,3	247,0	114,5	400,5	759,4	88,5	245,5	390,0	<20	58,7	110,2	20,6	733,0	990,5	543,3
Zinco Dissolvido (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Zinco Total (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Manganês Dissolvido (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Manganês Total (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Cobalto Dissolvido (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Cobalto Total (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Cobre Dissolvido (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Cobre Total (µg.L ⁻¹)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Clorofila <i>a</i> (µg.L ⁻¹)	2,7	3,3	1,8	4,0	7,4	1,6	4,7	8,0	1,6	2,2	3,2	1,1	2,1	3,3	0,4

Segundo Huzsar e Silva (1999), em estudos que visam compreender os fatores que regulam a biomassa total da comunidade fitoplanctônica ou a dominância de grupos taxonômicos/associações/populações, os dados devem ser expressos em biovolume ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) ou peso fresco ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), visto que assim é eliminada a marcada variabilidade de tamanho das algas (10 a $10^3 \mu\text{m}$). A figura 10 (a, b) apresenta os dados de biomassa (biovolume) e a porcentagem relativa dos grupos fitoplanctônicos encontrados na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel.

Durante os meses de fevereiro/07 a fevereiro/08, foram encontradas 66 espécies fitoplanctônicas, entre clorofíceas (34 espécies, incluídas as zygnemafíceas, também denominadas desmídeas), cianobactérias (15 espécies), criptofíceas (5 espécies), bacilariofíceas (7 espécies), dinofíceas (2 espécies), crisofíceas (2 espécies) e euglenofíceas (1 espécie), sendo estas duas últimas agrupadas como *outras*. É importante enfatizar que dentre as 66 espécies fitoplanctônicas encontradas apenas 22 espécies apresentaram, ao longo do período estudado, um percentual de biomassa igual ou superior a 5% dentro da amostra (mês), com base em dados de biovolume. A relação destas espécies é apresentada na tabela 04.

As clorofíceas dominaram a comunidade fitoplanctônica, no período de junho a janeiro/2008, com maiores valores de biomassa obtidos no P3. As clorofíceas apresentaram melhor desenvolvimento no P3, período com menor concentração de nutrientes, condição encontrada principalmente em agosto, setembro e outubro. A maior biomassa foi obtida em agosto ($0,57 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$). Este grupo foi o que apresentou maior riqueza de espécies, sendo encontradas 34 espécies distribuídas em 25 gêneros. É válido ressaltar que o bom desenvolvimento do fitoplâncton registrado nos meses que apresentaram baixas concentrações de nutrientes nos períodos de menores vazões, indica que tais nutrientes encontram-se na fase particulada, ou seja, constituindo a biomassa.

As desmídias constituem um grupo importante em ambientes amazônicos em termos de diversidade e biomassa, visto que a maioria das espécies é apta a sobreviver em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (Brook, 1981 apud Huzsar, 2000). A importância deste grupo na composição do fitoplâncton de ambientes amazônicos é demonstrada por alguns autores (Lopes e Bicudo, 2002; Melo e Souza, 2009). No presente trabalho foram encontradas 8 espécies de desmídeas, com duas espécies, *Cosmarium sp* e *Staurodesmus*

spapresentando elevada contribuição na biomassa anual de clorofíceas, 14,3% e 13,0%, respectivamente.

Tabela 04: Relação das 22 espécies que contribuíram com biomassa igual ou superior a 5% na amostra (mês), evidenciando a contribuição que cada espécie apresentou dentro de seu grupo taxonômico, e a contribuição de cada espécie para a biomassa fitoplanctônica total obtida no período de fevereiro/07 a fevereiro/08.

	Contribuição para a biomassa anual do grupo (%)	Contribuição com a biomassa fitoplanctônica total (%)	Grupo
<i>Coelastrum reticulatum</i>	32,2	15,6	Chlorophyceae (Clorofíceas)
<i>Cosmarium</i> sp	14,3	7,0	
<i>Staurodesmus</i> sp	13	6,3	
Chlorococcales sp 1 (nid)	8,8	4,3	
<i>Chlorella homosphaera</i>	6,2	3,0	
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	44,6	13,0	Cyanobacteria (Cianobactérias)
<i>Merismopedia pundacta</i>	15,0	4,3	
<i>Microcystis panniformes</i>	10,5	3,0	
<i>Aphanocapsa holsatica</i>	9,5	2,7	
<i>Merismopedia tenuissima</i>	8,7	2,5	
<i>Lemmermaniella parva</i>	5,1	1,5	Dinophyceae (Dinofíceas/Dinoflagelados)
<i>Peridinium</i> sp2	57,8	2,7	
<i>Peridinium</i> sp1	42,2	3,8	
<i>Cryptomonas</i> sp	55,4	3,0	Cryptophyceae (Criptofíceas)
<i>Cryptomonas brasiliensis</i>	20,8	1,1	
<i>Chroomonascf acuta</i>	18,2	1,0	
Cryptophyceae (nid)	5,5	0,3	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	100	0,2	Euglenophyceae (Euglenofíceas)
<i>Cyclotella</i> sp	55,5	2,4	Bacillarioceae (Bacilariofíceas/Diatomáceas)
<i>Eunotia</i> sp	24,8	1,1	
<i>Urosolenia</i> sp	8,3	0,4	
<i>Cromulina</i> sp	97,2	0,5	Crysophyceae(Crisofíceas)

As cianobactérias constituíram o segundo grupo de maior representatividade em termos de biomassa (figura 10) e riqueza de espécies: 15 espécies distribuídas em 10 gêneros (figura 11-a, b).

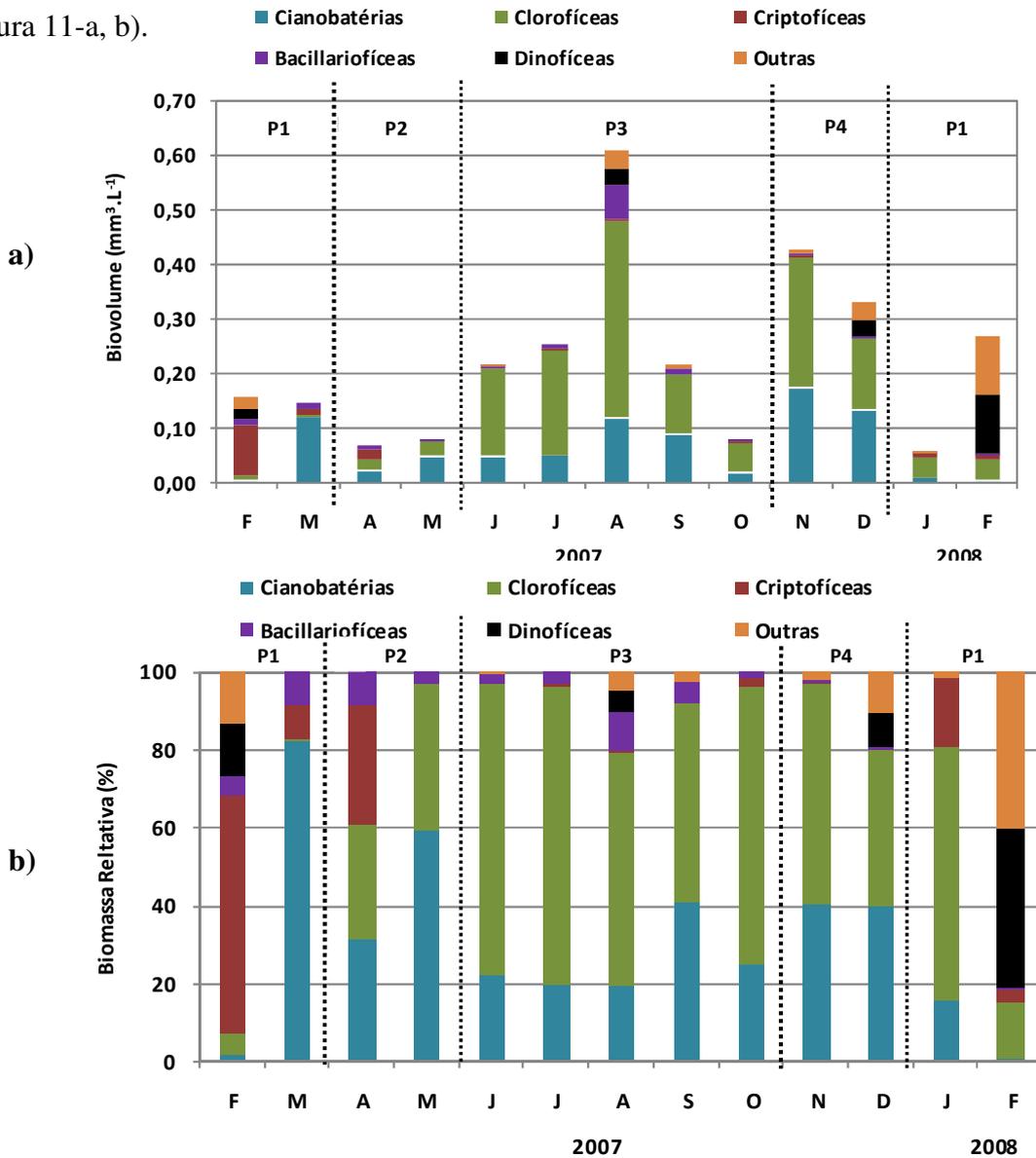


Figura 10: Biovolume (a) e biomassa relativa (b) dos grupos fitoplânctônicos encontrados na Zeu (amostra integrada) da estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel (Fevereiro/07 a Fevereiro/08).

As cianobactérias apresentaram bom desenvolvimento nos meses de maior vazão (P1 e P2), mais precisamente em março e maio, e em novembro e dezembro (P4), período de maior precipitação. A biomassa de cianobactérias diminuiu significativamente em fevereiro/2007, janeiro e fevereiro/2008, meses de elevadas intensidades pluviométricas. Em outubro ocorreu diminuição de biomassa não apenas de cianobactérias, mas de todos os grupos

fitoplanctônicos. Esta queda certamente está relacionada com as baixas concentrações de nutrientes dissolvidos em decorrência da menor vazão (final do P3). Em outubro/2007 as concentrações de nutrientes já estavam consideravelmente baixas (figuras 8-a,b,c) condições estas que não favoreceram o desenvolvimento de cianobactérias (Chen, 2009). Ao contrário, o aumento da biomassa fitoplanctônica, incluindo as cianobactérias, em novembro e dezembro provavelmente ocorreu devido à entrada de nitrogênio e fósforo no reservatório em decorrência do aumento da vazão.

A espécie *Synechocystis cf parvula*, apesar da baixa biomassa (1% da biomassa de cianobactérias ao longo do período estudado), foi a única presente em praticamente todos os meses, exceto março. A espécie *Planktolyngbya limnetica* apresentou as maiores biomassas, destacando-se os meses de novembro e dezembro/2007. Os meses de maior riqueza de cianobactérias foram maio, com 7 espécies e o período entre junho e dezembro com 11 espécies (figura 11-a, b).

As 6 espécies de cianobactérias com maior contribuição na biomassa deste grupo estão relacionadas na tabela 04. Em termos de contribuição ao fitoplâncton total ao longo de todo o período estudado, a espécie com maior destaque foi *Planktolyngbya limnetica* com 13,0% (tabela 4).

A instabilidade física e química gerada na coluna d' água em decorrência dos meses de maior pluviosidade (janeiro e fevereiro) acarretou uma diminuição acentuada na biomassa de clorofíceas e principalmente de cianobactérias. Com isso, houve a oportunidade para que outros grupos com espécies adaptadas a ambientes com maiores concentrações de nutrientes, baixa intensidade luminosa e condições de mistura se desenvolvessem (Reynolds, 2006), a exemplo das dinofíceas, terceiro grupo em termos de contribuição de biomassa anual no fitoplâncton (6,5%). As dinofíceas foram representadas pelas espécies *Peridinium sp1* e *sp2*(tabela 04).O quarto grupo com maior contribuição na biomassa fitoplanctônica total ao longo do período estudado foram as criptofíceas (5,4%). Dentre as 4 espécies encontradas (tabela 04), se destacaram as espécies *Cryptomonas spe Cryptomonas brasilliensis*, as quais contribuíram com 55,4% e 21,0% da biomassa de criptofíceas, respectivamente.

As euglenofíceas foram representadas por uma única espécie, *Trachelomonas volvocina*, presente apenas em novembro, e com contribuição de biomassa ao fitoplâncton de

5,4% ao longo do período estudado. As diatomáceas (Bacilariofíceas) contribuíram com 4,4% da biomassa total do fitoplâncton. A espécie *Cyclotella* sp, foi a única presente em praticamente todos os meses de coleta, exceto janeiro/2008, mostrando sua plasticidade adaptativa ao longo da sazonalidade. As crisofíceas representadas pelas espécies *Mallomonas* sp e *Chromulina* sp contribuíram com apenas 0,5% da biomassa total fitoplanctônica. No entanto, *Chromulina* sp, contribuiu com 97,5% da biomassa de crisofíceas (tabela 04).

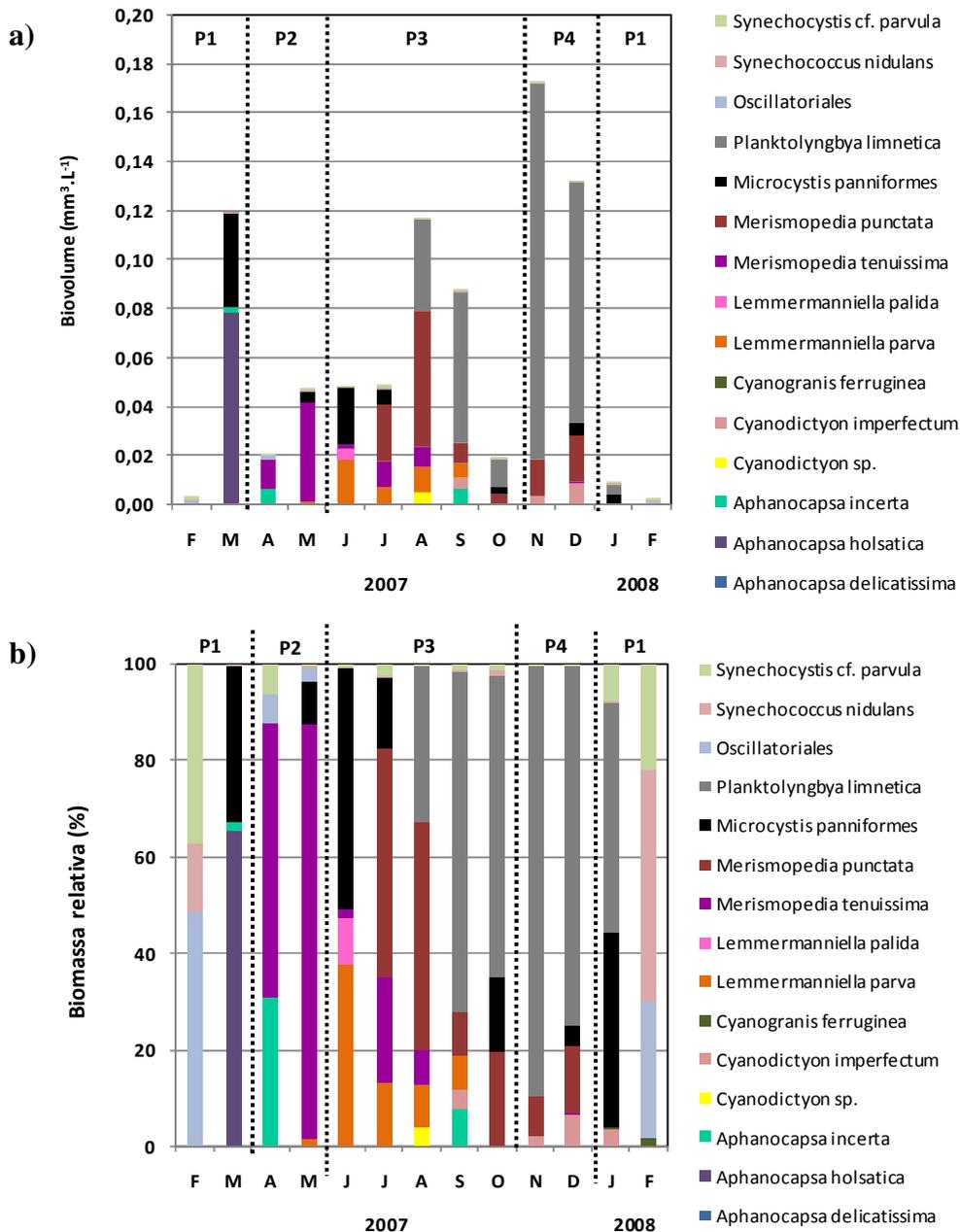


Figura 11: Biovolume (a) e biomassa relativa (b) das espécies de cianobactérias encontradas na Zeu (amostra integrada) da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008).

Análise Multivariada das variáveis ambientais e das espécies fitoplanctônicas

Com o objetivo de verificar a correlação existente entre as variáveis ambientais (limnológicas) analisadas e as 22 espécies fitoplanctônicas descritoras do ambiente, ou seja, aquelas que apresentaram contribuição igual ou maior que 5% para a biomassa relativa em cada mês ao longo do período estudado, foram aplicadas aos dados duas técnicas multivariadas: Análise de correspondência não tendenciosa (DCA) e Análise de Correspondência Canônica (CCA).

A DCA apresentou autovalores de 6,9 refletindo uma distribuição multimodal dos dados e neste caso indica-se a aplicação da Análise de Correspondência Canônica (CCA). Também foi conduzido na CCA o teste de permutação de Monte Carlo, o qual informa através do valor de p se o teste estatístico foi significativo.

A CCA apresentou uma explicação total da variabilidade dos dados igual a 45,9%, com 21,5% no eixo 1 e 24,4% no eixo 2. Apesar do teste de Monte Carlo ter indicado que a análise não foi significativa ($p > 0,05$), em decorrência do baixo número de amostras (meses), observou-se a formação de 3 grupos fitoplanctônicos (figura 12). As correlações são apresentadas na tabela 05.

Os resultados obtidos através da CCA foram discutidos com base no sistema de classificação do fitoplâncton desenvolvido por Reynolds (2002, 2006), denominado grupos funcionais. Cada grupo funcional é constituído por espécies fitoplanctônicas que apresentam respostas semelhantes a uma dada condição ambiental. São apresentados 32 grupos funcionais, os quais foram codificados alfa numericamente, e geralmente esses grupos são polifiléticos (Reynolds *et al.*, 2002; 2006).

Em decorrência de algumas das 22 espécies trabalhadas não estarem incluídas na lista de espécies proposta por Reynolds (2002; 2006), foram utilizadas outras referências bibliográficas (Huszar *et al.*, 2000; Padisak *et al.*, 2009), e também foram consideradas as características morfológicas e os períodos em que as espécies apresentaram melhor desenvolvimento.

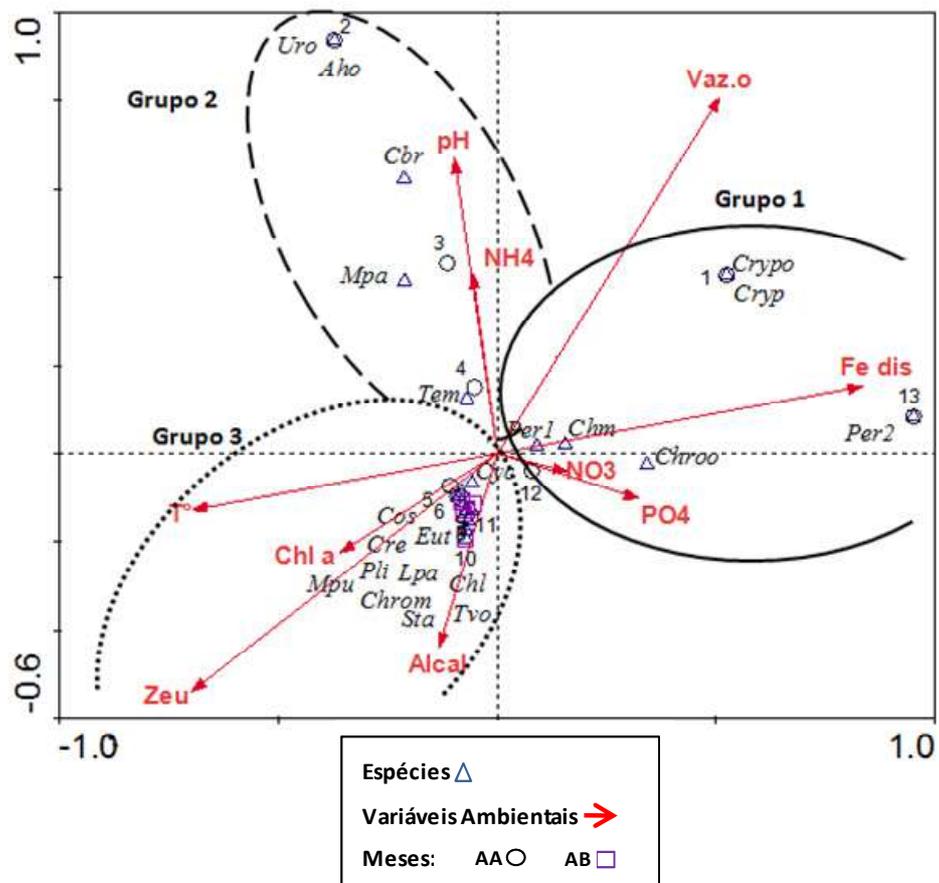


Figura 12: Projeção do resultado da Análise de Correspondência Canônica (CCA). AA: águas altas; AB: águas baixas; 1: fevereiro, 2: março, 3: abril, 4: maio, 5: junho, 6: julho, 7: agosto, 8: setembro, 9: outubro, 10: novembro, 11: dezembro (2007), 12: janeiro e 13: fevereiro (2008). Uro: *Uosolenia sp*, Aho: *Aphanocapsa holsatica*, Cbr: *Cryptom brasilliensis*, Mpa: *Microcystis panniformes*, Tem: *Merismopedia tenuissima*, Cyc: *Cyclotella sp*, Cos: *Cosmarium sp*, Eut: *Eunotia sp*, Cre: *Coelastrum reticulatum*, Pli: *Planktolyngbya limnetica*, Lpa: *Lemmermanniella parva*, Mpu: *Merismopedia punctata*, Chrom: *Cromulina sp*, Sta: *Stauradesmus sp*, Tvo: *Trachelomonas volvocina*, Chl: Chlorococcales, Per 1: *Peridinium sp1*, Chroo: *Chroomonas cf acuta*, Chm: *Chlorella homosphaera*, Per2: *Peridinium sp2*, Cryp: Chryptophyceae, Crypo: *Cryptomonas sp*.

Tabela 05: Correlação das variáveis ambientais e das espécies nos eixos 1 e 2 resultantes da Análise de Correspondência Canônica (CCA).

Variáveis	Abreviações	Eixo 1	Eixo 2
Nitrato	NO3	0.1612	-0.0410
Amônio	NH4	-0.0562	0.4096
Fósforo solúvel reativo	PO4	0.3234	-0.1027
Temperatura	T°	-0.6965	-0.1277
pH	pH	-0.0982	0.6686
Alcalinidade	Alcal	-0.1333	-0.4396
Clorofila a	Chl a	-0.3590	-0.2239
Ferro dissolvido	Fe dis	0.8338	0.1525
Vazão	Vaz	0.5078	0.8080
Zona eufótica	Zeu	-0.6983	-0.5397

O primeiro grupo, posicionado mais próximo ao eixo 1 (figura 12), esteve correlacionado com os maiores valores de ferro dissolvido e de vazão afluyente, bem como com a diminuição da zona eufótica, variáveis estas relacionadas ao período de águas altas da região (P1). Este grupo foi composto por espécies usualmente pequenas e com bom desenvolvimento em ambientes com concentrações de nutrientes elevadas e tolerantes a baixa intensidade luminosa. São elas, as dinofíceas, *Peridinium sp1 e sp2*, e criptofíceas, como *Cryptomonas sp* e *Chroomonas cf acuta* (Y). Também esteve presente no grupo 1, a clorofícea *Chlorella homosphaera* (XI).

O segundo grupo formado pela CCA, posicionado do lado esquerdo do eixo 2 (figura 12), teve melhor desenvolvimento quando a Zeu se encontrava com pH neutro e com maiores concentrações de amônio, características registradas principalmente nos meses de março e abril (P1). No grupo 2, encontram-se as cianobactérias *Aphanocapsa holsatica* (K), *Microcystis panniformes* (M) e *Merismopedia tenuissima* (Lo), todas espécies coloniais. *A. holsatica* e *M. panniformes*, se desenvolvem melhor em ambientes eutróficos, misturados e com baixa intensidade luminosa, característicos do período de cheia, o que corresponde ao melhor desenvolvimento deste grupo no P1 e P2 (vazante).

As cianobactérias do grupo 2, foram correlacionadas com valores de pH mais elevados. O pH é uma variável importante para o desenvolvimento das cianobactérias. Estudo

realizado por Giraldez-Ruiz *et al.*, (1999) demonstrou que este grupo pode assimilar bicarbonato como fonte de carbono. Em decorrência dessa aptidão fisiológica, as cianobactérias podem ter seu crescimento favorecido quando presentes em ambientes com pH entre 7,5 e 10. Uma vez que a fração de CO₂ diminui com o aumento do pH, cianobactérias em geral tendem a ser boas competidoras em condições de pH neutro e baixas concentrações de CO₂, já que possuem mecanismos para sequestrar o carbono em uma variedade de formas (Badger e Pricer, 2003).

As cianobactérias do grupo 2 (*M. panniformes*, *M. tenuissima* e *A. holsatica*) apresentaram melhor crescimento quando as concentrações de amônio na Zeu foram maiores. A preferência por esta forma nitrogenada pelo fitoplâncton decorre do fato de ser a forma mais reduzida de nitrogênio inorgânico encontrada, cuja assimilação requer menor gasto energético (Muro-Pastor *et al.*, 2005). Moisander *et al.*, (2009), demonstraram através de experimento de enriquecimento em mesocosmos, que o crescimento de *Microcystis sp* foi favorecido quando a fonte de nitrogênio inorgânico adicionada continha uma proporção maior de amônia em relação ao nitrato, Pearlet *al* (2011) em experimentos de enriquecimento também observaram este comportamento, tendo em vista diferentes espécies de *Microcystis* serem boas competidoras por amônia (Kappers, 1980 apud Pearlet *al*, 2011).

Dentre as cianobactérias do grupo 2, a espécie *M. tenuissima* (Lo) posicionou-se próximo ao grupo 3 (P3), devido ao fato de pertencer a um grupo funcional de espécies de ambientes mesotróficos e quentes, visto que foram registradas temperaturas mais altas no P3 (águas baixas). Também constituiu o grupo 2 a diatomácea *Urosolenia sp* (A).

O grupo 3 (figura 12) foi o grupo mais diverso, constituído por clorofíceas, cianobactérias, diatomáceas e euglenofíceas, as quais se desenvolveram melhor no período águas baixas (P3). Compuseram este grupo: as desmídeas *Cosmarium sp* e *Sataurodesmus sp* pertencentes ao grupo funcional N, características de ambientes mesotróficos; a clorofícea *Coelastrum reticulatum* (J) com habitat em ambientes ricos em nutrientes; e a diatomácea *Cyclotella sp* (A), tolerante à ambientes com deficiência de nutrientes. Também compôs este grupo a euglenofícea *Trachelomonas volvocina* (W₂), de ambientes mesotróficos.

Dentre as cianobactérias, as espécies com melhor desenvolvimento P3 foram as espécies coloniais *Merismopedia punctata* e *Lemmermanniella parva* (Lo), características de

ambientes mesotróficos e quentes, e a cianobactéria filamentosa de ambientes túrbidos *Planktolyngbia limnetica* (S₁).

É fato que a diminuição dos índices de pluviosidade e conseqüentemente da vazão, refletem em uma menor entrada de nutrientes alóctones. No entanto, é no período de águas baixas que os nutrientes advindos do período de águas altas serão utilizados de forma mais eficiente pelo fitoplâncton, hipótese esta suportada pelos valores mais elevados de clorofila *a* e de biomassa no P3. Este resultado mostra a importância de um ambiente menos turbulento para o desenvolvimento do fitoplâncton. Resultado semelhante foi encontrado por Perbiche-Neves *et al.*, (2011), com as maiores biomassas ocorrendo no período de seca, em decorrência também da maior deposição do material particulado, que refletiu no aumento da transparência da água em diferentes pontos do rio Iguaçu (Curitiba/PR). No Lago tropical Tana (Etiópia) a maior estabilidade da coluna d'água também foi decisiva para o crescimento fitoplanctônico (Wondie *et al.*, 2007).

Uma vantagem que as cianobactérias têm sobre os demais grupos fitoplanctônicos, principalmente em períodos de competição por nutrientes, é o fato de serem capazes de estocar fósforo na forma de polifosfatos (Murr, 1999). É possível que as espécies que apresentaram bom desenvolvimento no período de seca, contivessem grânulos de polifosfato, estocados principalmente no período de cheia.

Apesar da espécie *Microcystis panniformes* ter tido uma contribuição à bioamassa total de cianobactérias ao longo do período estudado de apenas 12,8%, esta foi a única espécie da qual foi possível isolar uma linhagem visando experimentos laboratoriais (capítulo 3). Por esta razão, a discussão dos fatores ambientais que regem o crescimento desta espécie foram aprofundados.

Em decorrência da área do reservatório de Samuel ser constituída principalmente por latossolos, cuja característica são os elevados teores de ferro, além deste micronutriente (juntamente com a vazão) ter contribuído para explicar a distribuição das espécies fitoplanctônicas na CCA, este aspecto foi levado em consideração. A figura 13 traz a relação entre a vazão e as concentrações de ferro dissolvido (a) e variação da densidade de *M. panniformes* obtidos nos planos de ordenação do primeiro e segundo eixo da CCA(b). Através

da representação foi possível observar que as maiores densidades de *M. panniformes* foram obtidas em períodos com baixa concentração de ferro dissolvido.

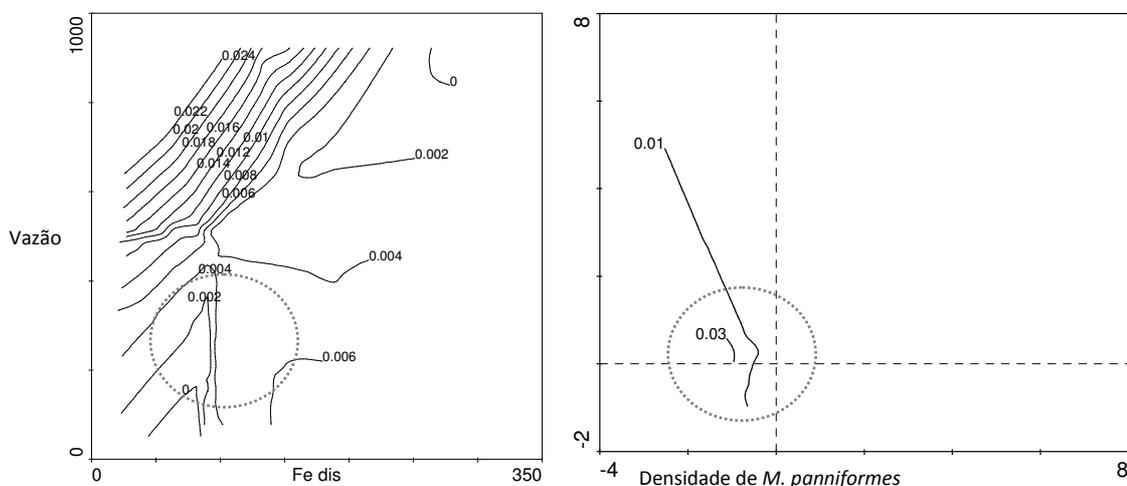


Figura 13: Relação entre vazão e ferro dissolvido obtida a partir do resultado da CCA (a) e variação da densidade de *M. panniformes* obtidos nos planos de ordenação do primeiro e segundo eixo da CCA. As isolinhas foram geradas pelo CANODRAW com base na regressão usando um modelo linear geral (GLM).

Tem sido cada vez mais frequentes os estudos que relacionam o crescimento de diferentes espécies de *Microcystis* e a produção de microcistinas ao micronutriente ferro (Lukac & Aegerter, 1993; Utkilen e Gjolme, 1995, Amé e Wunderlin, 2005, Xing *et al.*, 2007; Nagai *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009, Alexova *et al.*, 2011). Estudos com linhagens de *Microcystis*sp realizados em laboratório (Lukac & Aegerter, 1993; Kasakowska *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007), tem demonstrado que o *déficit* de ferro no meio de cultura, acarreta um menor crescimento celular. Entretanto, em decorrência de outros estudos demonstrarem que *Microcystis*sp é capaz de estocar ferro intracelularmente (Utkilen & Gjolme, 1995; Xing *et al.*, 2007), é possível que as células de *M. panniformes* do presente estudo apresentassem concentrações de ferro intracelulares suficientes para um bom crescimento.

Dentre os 9 gêneros em que se distribuem as 15 espécies de cianobactérias encontradas na Zeu ao longo do período estudado, 4 gêneros (*Synechocystis*, *Synechococcus*, *Aphanocapsa* e *Microcystis*) e 1 ordem (*Oscillatoria*), possuem espécies já registradas como produtoras de cianotoxinas (Sivonen e Jones, 1999; Sant'Anna & Azevedo, 2000; Williams *et*

al., 2001). Dentre estas, diferentes espécies do gênero *Microcystis* são produtoras de microcistinas (Sivonen e Jones, 1999; Williams *et al.*, 2001)).

Com relação aos valores de microcistina total nas amostras de água total da Zeu (figura 14) foi possível observar que os maiores valores foram encontrados no período P1/7 e P1/8). A concentração de microcistina total ao longo de cada metro de profundidade da Zeu foi heterogênea nos meses de março/07 e fevereiro/08. Como exemplo desta heterogeneidade, cita-se o mês de fevereiro/08, quando foi encontrado valor máximo 35x maior ($1,26\mu\text{g.L}^{-1}$) que o valor mínimo ($0,036\mu\text{g.L}^{-1}$) em profundidades distintas, 1 m e 3 m, respectivamente. Certamente este resultado é decorrente do fato de a maior concentração da microcistina encontrada na água ser intracelular e a maior concentração de células estarem na superfície.

Os valores de microcistinas na água encontrados na estação M1 do reservatório de Samuel são similares aos valores encontrados por Vieira *et al.*, (2005) no Lago Bolonha em Belém, Pará, em estudo temporal realizado entre julho/1999 e junho/2000. O Lago Bolonha constitui um lago artificial destinado ao abastecimento público, mas por estar localizado em região metropolitana recebe constantemente efluentes domésticos sem tratamento. Desta forma, nos pontos em que estes lançamentos ocorrem, há o maior crescimento de cianobactérias, principalmente *M. fernandoi* e conseqüentemente maior concentração de microcistina na água. O maior valor encontrado por estes autores foi de $1,25\mu\text{g.L}^{-1}$, registrado no período de seca (agosto/1999), coincidindo com o maior crescimento de *Microcystis fernandoi* ($20.000\text{ células.mL}^{-1}$). No período de cheia (março/2000) os valores foram menores que $0,14\mu\text{g.L}^{-1}$ e a densidade de *M. fernandoi* igual a $2.615\text{ células.mL}^{-1}$.

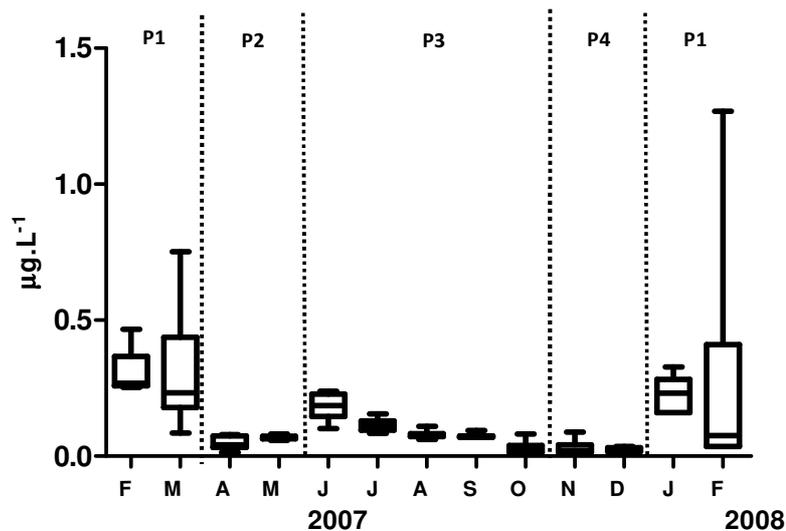


Figura 14: Boxplot mostrando os valores de microcistina total encontrados na Zeu da estação M1 do reservatório da U.H.E. Samuel (Fevereiro/2007 a Fevereiro/2008). As caixas representam o interquartil (25-75%), as barras o intervalo de variação e as linhas horizontais representam os valores medianos.

No reservatório de Samuel, em março/07, quando houve maior crescimento de *M. panniformes*, sua densidade foi de $1.030 \text{ células.mL}^{-1}$ e a concentração de microcistina na superfície da água foi igual a $0,75 \mu\text{g.L}^{-1}$. No Lago Bolonha, no período de maior crescimento de *M. fernnandoi* a densidade foi de $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ e a contração de microcistina na superfície foi igual a $1,25 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ao comparar estes dados, nota-se que o potencial de produção de microcistina no reservatório de Samuel é maior. Esta diferença pode estar relacionada com o fato de serem espécies distintas, possuírem características genéticas relacionadas à produção de microcistinas distintas ou mesmo por estarem em ambientes diferentes. Como comparação, amostras de água bruta oriundas de uma floração constituída por *Anabaenasp* (principalmente) e *Microcystis sp* no rio Tapajós, Pará, apresentaram concentrações de microcistina variando de $0,23\text{-}0,55 \mu\text{g.L}^{-1}$, a densidade de células de *Anabaena sp* e *Microcystis sp* não foi mencionada por Vieira (2005). Reservatórios tropicais hipereutróficos, como o reservatório Kranji, Singapura, com elevada densidade de *Microcystis sp* ($10^7 \text{ celular.ml}^{-1}$), apresentaram concentrações de microcistina na água variando de $0,50\text{-}14,40 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Te e Jin, 2011).

Normalmente se verifica que as variáveis ambientais estão relacionadas tanto ao desenvolvimento das cianobactérias como à produção de cianotoxinas. É cada vez maior o número de trabalhos que objetivam verificar esta questão, sejam através de estudos com cepas em laboratório (Jiang *et al.*, 2008; Jähnichen *et al.*, 2011) ou no ambiente natural (Joung *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Com este mesmo objetivo, foram realizadas análises de correlação de Pearson entre as variáveis nitrato, amônia, ortofosfato, temperatura, pH e ferro dissolvido e a concentração de microcistina total obtida na água bruta. Apesar das baixas correlações obtidas (tabela 06), pode-se observar que o nitrato, o ortofosfato e o ferro dissolvido apresentaram correlações significativas ($p < 0,05$).

Tabela 06: Resultado das correlações de Pearson (r^2) entre as concentrações de microcistina total e as variáveis ambientais encontrados na Zeu na estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel (Fevereiro/07-Fevereiro/08).

Variáveis	Índice de correlação	Valor de P
Nitrato	0,369	<0,05
Amônio	0,078	>0,05
Fosfato	0,319	<0,05
Temperatura	-0,131	>0,05
pH	0,067	>0,05
Ferro dissolvido	0,226	<0,05

O nitrato apresentou melhor correlação com a concentração de microcistina na água total. Estudos têm demonstrado (Vézie *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2009) que as linhagens tóxicas de *Microcystis* sp tem uma exigência maior de nitrogênio do que as linhagens não tóxicas. Certamente, tal comportamento decorre do fato de a molécula de microcistina ser rica em nitrogênio, bem como as enzimas que atuam em sua síntese (O'Neilet *et al.*, 2012). A concentração de microcistina-LR na população natural de um ambiente tropical, Lagoa Durgakund, Índia, foi analisada ao longo de uma série temporal por Srivastava *et al.*, (2012) e correlacionada com diferentes variáveis ambientais. Apesar dos baixos coeficientes (r^2) obtidos, a variável com melhor correlação positiva foi o período de chuva ($r^2=0,534$), o que se atribui à entrada de nutrientes, tal qual observado neste estudo. Diferentes espécies de cianobactérias, principalmente *Microcystis* sp, tem sido associadas a ambientes eutróficos e hipereutróficos e com maiores densidades nos períodos de chuva (Okello *et al.*, 2010). A

síntese de microcistina tem sido positivamente correlacionada com compostos inorgânicos nitrogenados (Downing, 2005, Daiet *et al.*, 2008). No presente estudo a CCA mostrou o desenvolvimento de *M. panniformes* correlacionado com altos valores de amônia. O pH foi outra variável importante ao desenvolvimento de *M. panniformes*, variável esta correlacionada com a seleção de genótipos produtores de microcistina em populações naturais de *Microcystis* (Xu *et al.*, 2011).

Apesar de *M. panniformes* ter apresentado bom desenvolvimento em baixas concentrações de ferro, a exemplo de março e junho/07, é possível que o aumento da síntese de microcistina tenha ocorrido em decorrência do uso de ferro anteriormente estocado nas células (Utkilen e Gjome, 1995; Nagai *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Outros estudos sugerem que baixas concentrações de ferro no meio estimulariam a síntese de microcistina (Sevilla *et al.*, 2008) e que a toxina funcionaria com um quelante mantendo o ferro na fase dissolvida (Lukac e Agerter, 1993).

Em suma, no reservatório de Samuel, entre fevereiro de 2007 e fevereiro de 2008, as cianobactérias dominaram os demais grupos fitoplanctônicos em apenas 15% do período estudado (março e maio), as clorofíceas constituíram o grupo com melhor desenvolvimento, 61%. Alterações nas características limnológicas da água ao longo do ciclo hidrológico permitiram que as seis principais espécies de cianobactérias apresentassem bom desenvolvimento em diferentes períodos do ciclo hidrológico. Em meses de maior vazão as espécies *Aphanocapsa holsatica*, *Microcystis panniformes* e *Merismopedia tenuissima* apresentaram bom desenvolvimento. Tais espécies tiveram maior contribuição no período em que as cianobactérias dominaram o fitoplâncton (março e maio), especialmente *A. holsatica* e *M. panniformes* e estiveram relacionadas a valores de pH neutros e a maiores concentrações de amônia. Em meses de menor vazão as principais espécies de cianobactérias foram *Lemmermanniella parva*, *Merismopedia punctata*, associada a temperaturas mais altas e *Planktolyngbya limnetica*, associadas a ambientes túrbidos.

Quanto à relação entre as variáveis ambientais e as concentrações de microcistina na água (fração dissolvida+seston), apesar da baixa correlação, as variáveis nitrato, ortofosfato e ferro dissolvido foram significativamente correlacionadas às concentrações de microcistina dissolvida. Durante maior parte do período estudado, as concentrações de microcistina na água bruta foram menores que $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, concentração máxima permitida para água tratada destinada ao consumo humano estipulada pela portaria 2.914/MS/2011, exceção para fevereiro/2007.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS-ANA. Disponível em: <http://www2.ana.gov.br/Paginas/default.aspx>. Acesso: 05/04/12

AGRAWAL, A. A., 1998. Algal defense, grazers, and their interactions in aquatic trophic cascades. Acta Oecologica-International Journal of Ecology, 19: 331–337.

ALEXOVA, R.; FUJII, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WAITE, T. D.; FERRARI, B. C.; NEILAN, B. A., 2011. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. Environmental Microbiology. 1-11p.

ALMEIDA, F. P. 2008. Fitoplâncton de um Lago de inundação amazônico (Lago Catalão, Amazonas – Brasil): Estrutura da comunidade, flutuações espaciais e temporais. Dissertação. Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Universidade Federal do Amazonas-UFAM. 95p.

AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A., 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* populations. Water, Air and Soil Pollution, 168: 235-248.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA, 937p.

APRILE, F.M.; MERA, P.A.S.; 2007. Phytoplankton and phytoplankton of a black-waters river from North Peripheral Amazon, Brazil. Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, 11 (2): 1-14.

BADGER, M. R.; G. D. PRICE, 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. Journal of Experimental Botany 54: 609–622.

BUTTERWICK, C., HEANEY, S.I., TALLING, J.F., 2005. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. Journal of Freshwater Biology 50: 291-300.

CAMARGO, A. F. M.; MIYAI, R. K., 1988. Caracterização limnológica do Lago Curuçá: lago de várzea do Rio Trombetas (águas claras), Pará. Acta Limnológica Brasiliensis, 2:153-180.

CÂNDIDO, L. A.; MANZI, A. O.; TOTA, J.; SILVA, P. R. T.; SILVA, F. S. M.; SANTOS, M. N.; CORREIA, F. W. S., 2007. O clima atual e futuro da Amazônia nos cenários do IPCC: a questão da savanização. Ciência e Cultura, 59 (3): 44-47.

CENTRAIS ELÉTRICAS DO NORTE DO BRASIL, 1998. Relatório técnico. 85p.

- CHEN, H.; BURKE, J. M.; MOSINDY, T., FEDORAK, P. M.; PREPAS, E. E., 2009. Cyanobacteria and microcystin-LR in a complex Lake system representing a range in trophic status: Lake of the Woods, Ontario Canada. Journal of Plankton Research, 31 (9): 993-1008.
- COLE, G., 1994. Textbook of limnology. 2nd ed. Saint Louis : The C.V. Mosby. 283 p.
- DAI, R.; LIU, H.; QU, J.; ZHAO, X.; RU, J.; HOU, Y., 2008. Relationship of energy charge and toxin content of *Microcystis aeruginosa* in nitrogen-limited or phosphorous-limits cultures. Toxicon, 51: 649-658.
- DAVIS, T.W., BERRY, D.L., BOYER, G.L., GOBLER, C.J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. Harmful Algae, 8: 715–725.
- DOWNING, T. J.; MEYER, C.; GEHRINGER, M. M.; VENTER, VAN DE VENTER, M., 2005. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. Environmental Toxicology, 20: 257-262.
- FIGUEROA, S.N.; NOBRE, C., 1990. Precipitations distribution over Central and Western Tropical South America. Climanálise - Boletim de Monitoramento e Análise Climática, 5 (6): 36-48.
- FISHER, T.R., 1976. Plankton and Primary Production in Aquatic Systems of the Amazon Central Basin. Comp. Bount Physiology, 62A: 31-38.
- FULTON, R. S., H. W. PAERL, 1987. Toxic and inhibitory effects of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* on herbivorous zooplankton. Journal of Plankton Research, 9:837–855.
- GIRALDEZ-RUIZ, N.; BONILLA, I.; FERNANDEZ-PIÑAS, F., 1999. Role of external calcium in homeostasis of intracellular pH in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC7120 exposed to low pH. New Phytologist, 141: 225-230.
- GOMES, L. N. L.; OLIVEIRA, S. M. A. C.; GIANI, A.; VON SPERLING, E., Association between biotic and abiotic parameters and the occurrence of cyanobacteria in a Brazilian reservoir. Environment Assess, 184: 4635-4645.
- GOULDING, M.; R. BARTHEM.; E. FERREIRA., 2003. Atlas of the Amazon. Smithsonian Books. Washington – London. 23-39p.
- HAANDER, S.; ROHRLACK, T.; SEMYALO, R.; AL BRETTUM, P.; EDVARDSEN, B.; LYCHE-SOLHEIM, A.; SØRENSEN, K.; LARSSON, P.; 2011. Phytoplankton dynamics and cyanobacterial dominance in Murchison Bay of Lake Victoria (Uganda) in relation to environmental conditions. Limnologica, 41: 20–29.
- HAVENS, K. E.; JAMES, R. T.; EAST, T. L.; SMITH, V. H., 2003. N:P ratios, light

limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. Environmental Pollution, 122: 379–390.

HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C.D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, D.; ZOHARY, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal Phycology, 35: 403–424.

HUSZAR, V. L. M.; GIANI, A. 2004. Amostragem da comunidade planctônica em águas continentais: reconhecimento de padrões espaciais e temporais. In: Bicudo e Bicudo (orgs.), Amostragem em Limnologia. 133 - 147pp.

HUSZAR, V. L. M.; SILVA, L. H. S.; MARINHO, M.; DOMINGOS, P.; SANT'ANNA, C. L., 2000. Cyanoprokariote assemblage in eight productive tropical Brazilian. Hydrobiologia, 424: 67-77.

HUSZAR, V. L. M.; SILVA, L. H. S. 1999. A estrutura da comunidade fitoplanctônica no Brasil: cinco décadas de estudo. Limnotemas, v. 2. 32p.

JÄHNICHEN, S.; LONG, B. M.; PETZOLDT, T., 2011. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa*: direct regulation by multiple environmental factors. Harmful Algae, 12: 95-104.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H., 2008. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium – *Microcystis aeruginosa*. Harmful Algae, 7: 127-136.

JOUNG, S. H.; OH, H. M.; KO, S. R.; AHN, C. Y., 2011. Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea. Harmful Algae, 10:188-193.

JUNK, W. J.; PIEDADE, M. T. F., 1997. Plant life in the floodplain with special references to herbaceous plantas. In: The Central Amazon Floodplain, Ecology of a pulsing system.

JUNK, W.J. 1983., As águas da Região Amazônica. In: Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia. Salati, E.; Junk, W.J.; Shubart, H.O.R. & Oliveira, A.E. (eds). Editora Brasiliense & Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. pp 45-100.

JUNK, W.J.; BAYLEY, P.B.; SPARKS, R.E., 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D.P. (ed). Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Public Fish Aquatic Science, 106: 110-127.

KOSAKOWSKA, A.; NEDZI, M.; PENPKOWIAK, J., 2007. Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. Plant Physiologya and

Biochemistry, 45: 365-370.

KOSTEN, S.; HUSZAR, V. L. M.; MAZZEO, N.; SCHEFFER, M.; STERNBERG, L. S. L. JEPPESEN, E., 2009. Lake and watershed characteristics rather than climate influence nutrient limitation in shallow lakes. Ecological Applications, 7: 1791-1804.

LI, H.; MURPHY, T.; GUO, J., PARR, T.; NALEWAJKO, C., 2009. Iron-stimulated growth and microcystin production of *Microcystis novacekii* UAM 250. Limnologica, 39: 255-259.

LITCHMAN, E.; PINTO, P. T.; KLAUSMEIER, C. A.; THOMAS, M. K.; YOSHIYAMA, K., 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. Hydrobiologia, 653: 15–28.

LIU, X.; LU, X.; CHEN, Y., 2011. The effects of temperature and nutrients ratios on *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China: An 11 year investigation. Harmful Algae, 10:337-343.

LOPES, M. R. M.; BICUDO, C. E. M., 2002. Desmideoflórula de um lago de planície de inundação do rio Acre, Estado do Amazonas, Brasil. Acta Amazonica, 33 (2): 167-212.

LUKAC, R.; AEGERTER, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 31 (3): 293-305.

LUND, J.W.G.; KIPLINGNG, C.; LE CREN, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimating by counting. Hydrobiologia, 11: 143-170.

MARTINS, M. L. N.; VON SPERLING, E., 1997. Dinâmica do ferro e do manganês no hipolímio do reservatório Serra Azul em Minas Gerais. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1525-1538.

MELO, S.; SOUZA, K. F., 2009. Flutuação annual e interannual da riqueza de espécies de desmídeas (Chlorophyta-Conjugatophyceae) em um lago de inundação amazônico de águas pretas (Lago Cutiauí, Estado do Amazonas, Brasil). Acta Scientiarum Biological Sciences, 31 (3): 235-243.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011. Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2012. 32p.

MOISANDER, P. H.; OCHIAI, M.; LINCOFF, A., 2009. Nutrient limitation of *Microcystis aeruginosa* in northern California Klamath River reservoirs. Harmful Algae, 8:889-897.

MORRIS, D. P.; LEWIS, W. M., 1988. Phytoplankton nutrient limitation in Colorado mountain lakes. Freshwater Biology, 20: 315-327.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. In I. Chorus & J. Bartram (Eds.), Toxic cyanobacteria in water: a guide to public health

consequences, monitoring and management London: World Health Organization, 15–40.

MURO-PASTOR, M. I.; REYES, J. C.; FLORENCIO, F. J.; 2005. Ammonium assimilation in cyanobacteria. Photosynthesis Research, 83: 135-150.

NAGAI, T.; IMAI, A.; MATSUSHIGE, K.; FUKUSHIMA, T., 2007. Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. Limnology. 8: 262-270.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae, 14: 313–334.

OKELLO, W, OSTERMAIER, V., PORTMANN, C.; GADEMANN, K.;KURMAYER, R., 2010. Spatial isolation favours the divergence in microcystin net production by *Microcystis* in Ugandan freshwater lakes. Water Research, 44: 2803-2814.

ONDERKA, M., 2007. Correlations between several environmental factors affecting the bloom events of cyanobacteria in Liptovska Mara reservoir (Slovakia)—A simple regression model. Ecological Modeling, 209: 412–416.

PADISA'K, J.; CROSSETTI, L.O.; NASELLI-FLORES, L., 2009. Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. Hydrobiologia, 621: 1–19.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J., 2008. Climate - blooms like it hot. Science, 320: 57-58.

PAERL, H. W.; PAUL, V. J., 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. Water Research, 46 (5): 1349-1363.

PERBICHE-NEVES, G.; FERRAREZE, M. F.; SERAFIM-JÚNIOR, M.; MADALENA, T. S.; PATRÍCIA, E. D., 2011. Lagos. Influence of atypical pluviosity on phytoplankton assemblages in a stretch of a large sub-tropical river (Brazil). Versita Section Botany, 66/1: 33-41.

PINILLA, G.A., 2006. Vertical distribution of phytoplankton in a clear water lake of Colombian Amazon (Lake Boa, Middle Caqueta). Hydrobiologia, 568: 79–90.

REICHWALDT, E. S.; GHADOUANI, A., 2012. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. Water Research, 46: 1372-1393.

REYNOLDS, C. S. 1984., Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. Freshwater Biology, 14: 111-142

REYNOLDS, C. S. 1987., Cyanobacterial water blooms. Pp. 67-143. *In*: J. Callow (ed.)

Advances in botanical research, Academic Press, London. 376p.

REYNOLDS, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, 550p.

REYNOLDS, C.S., 1984. Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. Freshwater Biology, 14: 111-142.

REYNOLDS, C.S., HUSZAR, V., KRUK, C., NASELLI-FLORES, L., MELO, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. Journal of Plankton Research, 24 (5): 417-428.

SÁ, L. L. C.; VIEIRA, J. M. S.; MENDES, R. A.; PINHEIRO, S. C. C.; VALE, E. R.; ALVES, F. A. S.; JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O.; COSTA, V. B., 2010. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do rio Tapajós, no município de Santarém (Pará, Brasil). Revista Pan-Amazônica Saúde, 1 (1): 159-166.

SALAS, H. J.; MARTINO, P. A., 1991. Simplified phosphorus trophic state model for warm-water tropical lakes. Water Research, 25 (3): 341-350.

SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P., 2000. Contribution to knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. Nova Hedwigia, 71: 359-385.

SANTIAGO, R. T.; KEPPELER, E. C., 2011. Fitoplâncton de um trecho do rio Japiim em Mâncio Lima-AC. Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, 15 (5): 91-08

SEVILLA, E.; MARTIN-LUNA, B.; VELA, L.; BES, M. T.; FILLAT, M. F.; PELEATO, M. L., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. Environmental Microbiology, 10 (10): 2476-2483.

SILVA, I.G.; MOURA, A.N.; DANTAS, E.W.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C., 2010. Structure and dynamics of phytoplankton in an Amazon lake, Brazil. Revista de Biologia Tropical, 58 (4): 1421-1436.

SIOLI, H., 1984. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. Amazoniana, 1:74-83.

SIVONEN, K.; JONES, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds, Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management, London, Spon Press, pp. 41–111.

SMITH JR, W. O.; DEMASTER, D. J., 1996. Phytoplankton biomass and productivity in the Amazon river plume: correlation with seasonal river discharge. Continental shelf Research, 16 (3): 291-318.

SMITH, P. T. 1996., Light and nutrients effects on the relative biomass of blue-green algae in

lake phytoplankton. Canadian Journal Fish and Aquatic Sciences, 43: 148-153.

SMITH, V. H. 1983., Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science, 221: 669-671

SOITO, J. L. S; FREITAS, M. A. V., 2011. Amazon and the expansion of hydropower in Brazil: Vulnerability, impacts and possibilities for adaptation to global climate change. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15: 3165– 3177.

SOMMER, U., 1984. The paradox of the plankton: fluctuations of the phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. Limnology and Oceanography, 29: 633-636.

TAYLOR, W. D.; WETZEL, R.G., 1998. Phytoplankton community dynamics in Lawrence Lake of southwestern Michigan. Archiv für Hydrobiologie, 81(4): 491-532.

TE, S. H.; GIN, K. Y. H., 2011. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. Harmful Algae, 10: 319-329.

TUNDISI, J. G., 2003. A crise da água: eutrofização e suas consequências. In: Água no século XXI: Enfrentando a escassez. Editora: Rima, São Carlos-SP. 67-82p.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M.; ABE, D. S.; ROCHA, O.; STARLING, F., 2005. Limnologia de águas interiores: impactos, conservação e recuperação de ecossistemas aquáticos. p.203-237. In: Águas Doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação. Org. REBOUÇAS, A. D. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. 3º ed. Ed. Escrituras, São Paulo, 748p.

UHELINGER, V. 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Archives des Sciences, 17: 121-123.

UTERMÖHL, H., 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton - methodik. Mitt. int. ver. Limnol., 9: 1-38.

UTKILEN, H.; GJOLME, N., 1995. Iron simulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Applied Environmental Microbiology, 61 (2): 797-800.

VÉZIE, C.; RAPALA, J.; VAITOMAA, J.; SEITSONEN, J.; SIVONEN, K., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. Microbiology Ecology. 43, 443–454.

VIEIRA, J. M. S.; AZEVEDO, M. T. P.; AZEVEDO, S. M. F. O. HONDA, R. Y.; CORRÊA, B., 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazon region. Toxicon, 45: 901-909.

VIEIRA, J. M. S.; VIEIRA, A. B. R.; 2003. Floração de *Microcystis* sp (Cianobacteria) em uma praia de rio da Região Amazônica do Brasil [resumos]. In: 22º Congresso Brasileiro de

Microbiologia, Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2003.

VIERS, J.; BARROUX, G.; PINELLI, M.; SEYLER, P.; OLIVA, P.; DUPRÉ, B.; BOAVENTURA, G. R., 2005. The influence of the Amazonian foodplain ecosystems on the trace element dynamics of the Amazon River mainstem (Brazil). Science of Total Environment, 339: 219-232.

WETZEL, R.G., 1993. Limnologia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 905p.

WILLIAMS, C. D, BURNS, J., CHAPMAN, A., FLEWELLING, L., PAWLOWICZ, M., CARMICHAEL, W. W., 2001. Assessment of Cyanotoxins in Florida's Lakes, Reservoirs, and Rivers. Palatka, FL: St. Johns River Water Management District.

WONDIE, A.; MENGISTU, S.; VIJVERBERG, J.; DEJEN, E., 2007. Seasonal variation in primary production of a large high altitude tropical lake (lake Tana, Ethiopia): effects of nutrient availability and water transparency. Aquatic Ecology, 41: 195-207.

WU, S. K.; XIE, P.; LIANG, G. D.; WANG, S. B.; LIANG, M., 2006. Relationships between microcystins and environmental parameters in 30 subtropical shallow lakes along the Yangtze River, China. Freshwater Biology, 51: 2309-2319.

XIAO, T.; FANXIANG, K.; QINFEI, Z.; HUASHENG, C.; SHANQIN, Q.; MIN, Z., 2009. Seasonal variation of *Microcystis* in Lake Taihu and its relationships with environmental factors. Journal of Environmental Sciences, 21: 892-899.

XING, W.; HUANG, W. M.; LI, D. H.; LIU, Y. D., 2007. Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. Current Microbiology. 55: 94-98.

XING, W.; HUANG, W. M.; LI, D. H.; LIU, Y. D., 2007. Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. Current Microbiology. 55: 94-98.

XU, Y.; YANG, F.; LIU, Y.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, G.; LI, R., 2011. Genetic diversity of *Microcystis* populations in a bloom and its relationship to the environmental factors in Qinhuai River, China. Microbiological Research, 167: 20-26.

XU, Y.; YANG, F.; LIU, Y.; WANG, Z.; WANG, J.; WANG, G.; LI, R., 2011. Genetic diversity of *Microcystis* populations in a bloom and its relationship to the environmental factors in Qinhuai River, China. Microbiological Research, 167: 20-26.

ZOEAMENTO SÓCIO-ECONÔMICO ECOLÓGICO DE RONDÔNIA-ZSEE-RO. (2002). Governo do Estado de Rondônia, Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral (SEPLAN/RO). 2ª Aproximação do Zoneamento Sócio-Econômico e Ecológico de Rondônia.

CAPÍTULO II

Efeitos da adição de nutrientes sobre a comunidade fitoplanctônica (ênfase em Cyanobactéria) do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel: estudo em microcosmos.

INTRODUÇÃO

O aumento das concentrações dos nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) nos ambientes aquáticos causa mudanças na estrutura, dinâmica (Tilman, 1982) e biomassa (Järvinen, 1999; Gonzáles, 2000) da comunidade fitoplanctônica. Mudanças na biomassa são representadas, por exemplo, por florações de cianobactérias (Anderson *et al.*, 2002, Carpenter, 2008; O'Neil *et al.*, 2012). Entretanto, não apenas o aporte de nutrientes causa mudança na estrutura e biomassa de uma comunidade fitoplanctônica, mas também outros fatores ambientais tais como luz (Carter, *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2011), temperatura (Reay, 2001), predação (Tijdens *et al.*, 2008), mistura vertical (Liu *et al.*, 2012), além das necessidades nutricionais inerentes a cada espécie (Reynolds, 2006).

Com relação aos macronutrientes N e P, alguns autores sugerem que nos ambientes de água doce o crescimento do fitoplâncton, incluindo cianobactérias, é limitado pela disponibilidade de P (Likens, 1972; Shindler, 1977, Schindler *et al.*, 2008). Quando comparado a outros elementos importantes para o metabolismo fitoplanctônico, como o carbono e o nitrogênio, o fósforo é menos abundante. O fósforo inorgânico dissolvido, forma química assimilada pelos produtores primários, constitui menos de 5% do P presente em ambientes de água doce livres de fontes antrópicas, demonstrando sua rápida assimilação pelos produtores primários (Wetzel, 1993).

Aproximadamente 90% encontra-se na forma orgânica como constituinte celular ou adsorvido a partículas inorgânicas (Wetzel, 1993), sendo os minerais fosfatados, presentes em rochas e solos da bacia de drenagem, uma importante fonte de P. Logo sua disponibilidade em águas naturais é baixa (Reynolds, 2006). O P é considerado por alguns autores como o nutriente regulador da formação de florações de cianobactérias,, pois elevadas concentrações de P podem favorecer florações constituídas por espécies de cianobactérias capazes de fixar N atmosférico por meio de células diferenciadas denominadas heterocitos, capazes de suprir seu

requerimento por este nutriente (Smith, 1990; Golden & Ho-Sung, 1998; Shindler *et al.*, 2008).

Apesar da abundância do nitrogênio na atmosfera, a crosta terrestre apresenta baixas concentrações deste elemento. Fontes naturais importantes das principais formas inorgânicas de nitrogênio assimiladas pelo fitoplâncton (nitrato, nitrito e amônia) são a conexão do ambiente aquático com o terrestre e a reciclagem do N dentro do próprio sistema (Reynolds, 2006). Sendo assim, a produtividade primária também pode ser limitada por N (Heck *et al.*, 1993; Pedrosa *et al.*, 2007, Pearl, 2011). Condições de limitação de N favorecem uma pequena parcela de fotoautotróficos (cianobactérias fixadoras de N₂), enquanto que o excesso de N em um corpo d' água pode favorecer o crescimento de espécies de cianobactérias não fixadoras de N₂, a exemplo de *Microcystis* sp (Pearl *et al.*, 2011).

Quando as concentrações de P e de N encontram-se abaixo do mínimo necessário ao crescimento fitoplanctônico, que corresponde a 10 µg.L⁻¹ de P e 130 µg.L⁻¹ de nitrogênio inorgânico dissolvido, considerando a razão molar N:P 13:1 a co-limitação pode ocorrer (Reynolds, 2006, Morris & Lewis, 1988 apud Kosten *et al.*, 2009). Smith, (1983) e Smith e Bennet, (1999) propuseram que baixas razões N:P podem favorecer a dominância de cianobactérias por estas serem melhores competidoras por N em situações de escassez, situação que pode ocorrer quando há um aumento do suprimento de P no corpo d' água. No entanto, concentrações elevadas de ambos, N e P, também podem regular o crescimento fitoplanctônico bem como as florações de cianobactérias, sejam simultaneamente ou isoladamente, favorecendo diferentes espécies ao longo do tempo (Xu *et al.*, 2010; Pearl *et al.*, 2011).

Experimentos adicionando nutrientes tais como P, N, Fe, Si etc, seja simultaneamente ou isoladamente, já foram realizados, sobretudo em ambientes temperados, para elucidar questões acerca da limitação de nutrientes para o fitoplâncton (Järvinen *et al.*, 1999, Zohary *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2012) e também para verificar os efeitos da eutrofização sobre esta comunidade (Piehler *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011). O aporte destes nutrientes pode resultar na incidência de florações, principalmente de cianobactérias potencialmente tóxicas (Codd, 2000; Howard, 2008). Estudos que identifiquem fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento de cianobactérias nos sistemas aquáticos são importantes, pois podem contribuir para a prevenção e o controle de florações (Elke & Claudia, 2007; Dai *et al.*, 2008).

O reservatório de Samuel apresenta, principalmente em sua margem esquerda, extensas áreas desmatadas utilizadas para agricultura e principalmente para a pecuária (vide tópico caracterização ambiental da sub-bacia do rio Jamari). No entanto, não seria adequado inferir que o reservatório está em processo de eutrofização nos moldes dos ambientes aquáticos da região Sudeste, por exemplo, que recebem elevadas cargas de nutrientes decorrentes principalmente dos efluentes domésticos e industriais (Tundisi & Matsumura-Tundisi, 1990). Sabe-se que o solo desprotegido acarreta a maior entrada de nutrientes nos sistemas aquáticos, sejam eles provenientes de fontes naturais ou antrópicas, como o uso de fertilizantes (Mortatti *et al.*, 1997; Bonilla, 2005).

No ambiente marinho, além de estudos experimentais acerca das respostas do fitoplâncton frente à adição de P e N (Hein *et al.*, 1995; Schlüter, 2008; Larato *et al.*, 2010), outros trabalhos tem evidenciado a importância do ferro (Fe) para o crescimento do fitoplâncton (Vuorio *et al.*, 2005; Timmermans *et al.*, 2005; Petrou *et al.*, 2011; Buesseller, *et al.*, 2012), visto que em sistemas pelágicos marinhos este micronutriente é considerado limitante (Martinet *et al.*, 1990; Martin, *et al.*, 2004, Boyd *et al.*, 2007). Entretanto, são raras as pesquisas experimentais (North *et al.*, 2007) acerca do efeito do enriquecimento ou limitação do ferro em ambientes aquáticos continentais. Tal fato justifica-se pois nestes ambientes concentrações mais elevadas de Fe são observadas, na ordem de ppb (Martins *et al.*, 1997; Duckworth, *et al.*, 2009) ou ppm em ambientes poluídos (Madruga *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2009). Já em algumas regiões dos oceanos estas concentrações podem ser encontradas na ordem de ppt (De Barr *et al.*, 1990; Buma *et al.*, 1991). No ambiente terrestre, as maiores concentrações de ferro encontram-se nas rochas e solos (Canfield *et al.*, 2005; Zouet *et al.*, 2011). Os latossolos caracteristicamente apresentam elevados teores de ferro (Campos *et al.*, 2003) e constituem o grupo de solos mais representativo na sub-bacia do rio Jamari (ZSSE-RO, 2002). De fato, o ferro em sua forma dissolvida foi detectado durante o estudo de campo (capítulo I) neste trabalho.

No intuito de verificar o efeito da adição de nutrientes assim como de ferro sobre a composição do fitoplâncton, com especial atenção às populações cianobactérias de um reservatório amazônico (reservatório da U.H.E. de Samuel), e verificar se este aporte pode favorecer a dominância deste grupo neste ambiente, um estudo em microcosmos foi realizado, configurando o capítulo II desta tese.

MATERIAL E MÉTODOS

Montagem do experimento

Para a montagem do experimento de adição de nutrientes foram coletados 100L de água na superfície da estação M1 do reservatório de Samuel no dia 01/09/10. A água coletada foi levada para a sala de cultivo de microalgas do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental/Universidade Federal de Rondônia, local onde o experimento foi montado e executado.

A água coletada para a realização do experimento foi filtrada em rede de 160 μm , com o objetivo de retirar parte do zooplâncton e assim minimizar o efeito da predação, principalmente por parte de copépodes calanóides frequentemente encontrados com elevada densidade na estação M1 (Nascimento, 2006). Optou-se pela filtração em rede de 160 μm também a fim de evitar a remoção das colônias de *Microcystis panniformes* observadas na água coletada. Coletas preliminares evidenciaram a remoção de aproximadamente 70% das colônias quando utilizada a rede de 65 μm recomendada para a coleta de zooplâncton.

As concentrações de nutrientes adicionadas nos microcosmos foram definidas com base em trabalhos experimentais de adição de nutrientes realizados em reservatórios brasileiros (Gomes, 2005; Delazari-Barroso, 2007) (tabela 01), e também nos maiores valores médios de nutrientes encontrados na Zeu durante o estudo de campo (Capítulo I). O maior valor médio de nitrato na Zeu durante o estudo de campo (capítulo I) correspondeu a 1.145 $\mu\text{g.L}^{-1}$ /novembro, de ortofosfato foi de 181 $\mu\text{g.L}^{-1}$ /dezembro, de amônia correspondeu a 78 $\mu\text{g.L}^{-1}$ /fevereiro/07 e ferro dissolvido foi de 297 $\mu\text{g.L}^{-1}$ /fevereiro/08. (tabelas 01 e 02). Assim, de acordo com o critério adotado, as concentrações dos nutrientes adicionados foram expressivamente maiores que as encontradas na água no momento da coleta para montagem do experimento (tabela 02).

Tabela 01: Comparação entre as concentrações totais de nutrientes adicionados em outros trabalhos experimentais realizados no Brasil e aquelas utilizadas no presente estudo.

		Concentração total adicionada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	Ambiente	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ³⁻	Fe
Delazari-Barroso (2007)	Reservatório Duas Bocas (ES)	6.635	396	478	-
Gomes (2005)	Reservatório de Ribeirão das Lajes (RJ)	1.070		18	-
Presente estudo	Reservatório de Samuel (RO)	2.500	150	250	350

(-) Elemento não adicionado.

Tabela 02: Concentrações de nutrientes ($\mu\text{g.L}^{-1}$) encontradas na água do reservatório utilizada no experimento, concentrações de nutrientes adicionadas à mesma, e concentração de nutrientes no início do experimento.

	N-NO ₃	N-NH ₄ ⁺	P-PO ₄ ³⁻	Fe
Água reservatório em 01/09/10	146	18	50	100
Concentração adicionada	2.500	150	250	350
Concentração início experimento	2646	168	300	450

O experimento foi realizado em balões de fundo chato de 5 L e em triplicata (figura 01). Em cada balão foi adicionada água do reservatório e a solução de nutrientes correspondente a cada tratamento (soluções estas preparadas com água do reservatório). O volume inicial do experimento foi de 4 L. O experimento incluiu 5 diferentes grupos, sendo 1 grupo controle e 4 grupos referentes aos tratamentos: nitrogênio, fósforo, ferro ou os três nutrientes citados adicionados simultaneamente, como descrito a seguir:

- Controle: água do reservatório. As concentrações dos nutrientes já presentes na água são apresentadas na tabela 02.
- Tratamento N: água do reservatório com adição de nitrogênio apenas (NO₃⁻ e NH₄⁺), conforme tabela 02.

- Tratamento P: água do reservatório com adição de fósforo apenas (PO_4^{3-}), conforme tabela 02.
- Tratamento Fe: água do reservatório com adição de ferro apenas, conforme tabela 02.
- Tratamento N+P+Fe: água do reservatório com adição simultânea de nitrogênio (N-NO_3^- e N-NH_4^+), fósforo (PO_4^{3-}) e ferro, conforme tabela 02.

Os sais utilizados nas soluções enriquecidas foram, nitrato de sódio (NaNO_3), cloreto de amônio (NH_4Cl), potássio de fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e cloreto férrico hexa-hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). O experimento foi realizado com aeração contínua, (como apresentado na figura 01) temperatura de $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12h. O experimento teve a duração de 35 dias.



Figura 01: Experimento microcosmos.

Análise dos parâmetros físicos, químicos e biológicos da água

Os parâmetros físicos, químicos e biológicos da água analisados durante o experimento foram: temperatura, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido, concentrações de nitrato, nitrito, amônia, ortofosfato, ferro dissolvido, clorofila *a*, e composição da comunidade fitoplanctônica.

Para a análise dos parâmetros citados, o conteúdo dos balões era previamente homogeneizado, em seguida eram retirados 200 ml de água por sucção com o uso de uma mangueira de silicone. Nos 15 primeiros dias os parâmetros físicos, químicos e biológicos foram analisados a cada 3 dias. A partir de então, os parâmetros foram analisados no 24° e 35° dia (término do experimento).

Temperatura da água, condutividade elétrica, pH, oxigênio dissolvido: a determinação destes parâmetros foi realizada com o uso de uma sonda multiparâmetros, modelo U22XD (HORIBA).

Nutrientes: as concentrações de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_4^+) e ortofosfato (PO_4^-) foram determinadas por cromatografia de íons, utilizando-se cromatógrafo modelo 882 Compact IC (Metrohm). A análise dos ânions NO_3^- , NO_2^- e PO_4^- , ocorreu sob as seguintes condições cromatográficas: coluna Metrosep A Supp 5, com supressão de condutividade por supressora MSM II-Metrohm Suppressor Module. O eluente utilizado foi uma solução aquosa com 1,0 mM de bicarbonato de sódio e 3,2 mM de carbonato de sódio. Para a análise de cátions, amônia (NH_4^+) as condições cromatográficas foram: coluna C-4, 150 mM e eluente constituído de uma solução aquosa com 0,7 mM de ácido dipicolínico e 1,7 mM de ácido nítrico.

Ferro dissolvido: as amostras para as análises de ferro dissolvido provenientes dos microcosmos foram filtradas em membranas de 0,45 μm e acidificadas com HNO_3 (concentração final 5%) e mantidas resfriadas. Posteriormente, um volume de 50 mL foi concentrado por evaporação em bloco de aquecimento (100°C), com posterior abertura química com ácido nítrico e ácido clorídrico e foi realizada uma extração química (APHA, 1998). A determinação das concentrações de ferro dissolvido foi realizada com auxílio de Espectrofotômetro de Absorção Atômica por Chama, modelo GBC/AVANTA.

Clorofila a: as amostras de água destinadas à análise de clorofila *a* foram filtradas em laboratório com o uso de filtros de microfibras de vidro GF/C (Whatman), os quais foram preservados congelados até o momento da análise. A concentração de clorofila *a* foi obtida por espectrofotometria, seguindo a metodologia descrita em APHA (1998).

Fitoplâncton: as amostras destinadas à análise da comunidade fitoplanctônica foram fixadas com solução de lugol. As populações sempre que possível foram identificadas a nível de espécie. A densidade fitoplanctônica (indivíduos.ml⁻¹) foi estimada segundo o método de sedimentação (Utermöhl, 1958) em microscópio invertido IX50 (Olympus), em aumento de 400x. O volume sedimentado foi definido de acordo com a concentração de algas e/ou detritos. O tempo de sedimentação foi de pelo menos três horas para cada centímetro de altura da câmara (Margalef, 1983). Os indivíduos (células, colônias, filamentos) foram enumerados em campos aleatórios (Uhelinger, 1964), em número suficiente para alcançar 100 indivíduos da espécie mais frequente, sendo o erro inferior a 20%, a um coeficiente de confiança de 95% (Lund *et al.*, 1958) ou pela curva de estabilização das espécies, obtida a partir da adição de espécies novas adicionadas com o número de campos contados. O biovolume (mm³.L⁻¹) foi estimado multiplicando-se as densidades de cada espécie pelo volume médio dos organismos, sempre que possível considerando as dimensões médias de pelo menos 30 indivíduos. O volume de cada organismo foi calculado a partir de modelos geométricos aproximados à forma dos indivíduos (Hillebrand *et al.*, 1999).

Tratamento Estatístico

Para verificar as diferenças existentes entre as variáveis ambientais avaliadas nos diferentes tratamentos, foi realizada uma análise de variância com medidas repetidas (Repeated-measures ANOVA). As variações com diferenças significativas foram submetidas ao teste de comparação múltipla de Tukey. Para este tratamento estatístico foi utilizado programa SPSS® 17.0.

RESULTADOS

Variáveis abióticas: temperatura, condutividade elétrica, pH e oxigênio dissolvido

A temperatura da água encontrada no reservatório no momento da coleta para a montagem do experimento foi 31,3°C, já a temperatura da sala de experimento foi programada para 28±2°C. No entanto a temperatura nos microcosmos variou ao longo do

experimento entre 26,7°C e 28,5°C. As oscilações de temperatura verificadas foram decorrentes de variação na temperatura da sala do experimento.

A condutividade elétrica da água coletada no reservatório foi 31 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Durante o experimento a condutividade oscilou ao longo do tempo no controle e nos tratamentos ($p < 0,05$), mas os valores se mantiveram entre 24 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ e 32 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ até o 24º dia (fig. 2.a). O controle e o tratamento Fe se comportaram de forma similar ao longo do experimento, apresentando valores mais baixos de condutividade. Os tratamentos N e N+P+Fe, nos quais houve a adição de NO_3^- , NH_4^+ ou PO_3^- , apresentaram maiores valores de condutividade, reflexo dos nutrientes adicionados.

O pH da água no reservatório se encontrava neutro (7,2) no momento da coleta, já nos microcosmos (fig. 2.b) esta variável oscilou no controle e nos tratamentos ao longo do experimento ($p < 0,05$). Valores mais baixos de pH foram obtidos no 1º dia de experimento no controle e nos tratamentos. Em seguida os valores tenderam a aumentar no controle e nos tratamentos e até o 12º dia o pH se encontrava com valores aproximados de 6,5 a 7,2. No 15º dia foi observada uma diminuição nos valores de pH para 6,0 em todos os casos. Problemas no eletrodo de pH, impossibilitaram a medição no 15º dia e no 24º dia. No 35º dia os valores variaram de 6,0 (controle) até 6,5 (tratamento Fe).

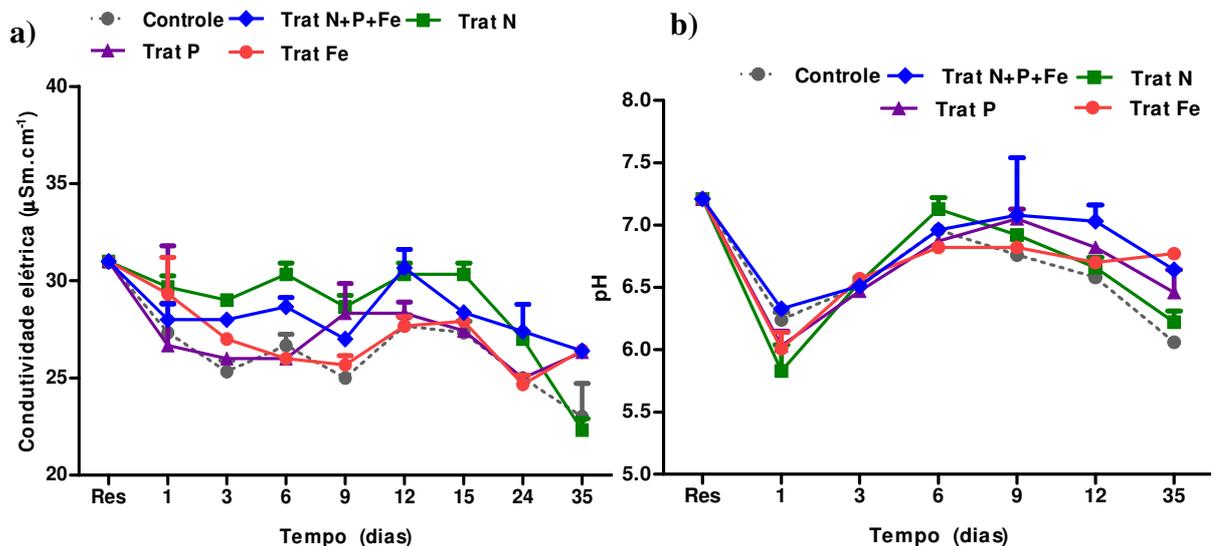


Figura 02: Variação da condutividade elétrica (a) do pH (b) no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média e desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

A concentração de oxigênio dissolvido registrada na água do reservatório no momento da coleta foi de 7,6 mg.L⁻¹. Os teores de oxigênio dissolvido nos microcosmos se mantiveram aproximadamente com este mesmo valor ao longo do experimento em todas as condições em decorrência da aeração contínua utilizada no experimento.

Variáveis abióticas - nutrientes: macronutrientes (nitrato, nitrito, amônia e ortofosfato) e micronutriente (ferro)

Com relação aos resultados de nutrientes, já no primeiro dia de amostragem do experimento foi verificada uma diminuição acentuada das concentrações de nitrato, amônia e ortofosfato em todos os tratamentos nos quais estes nutrientes foram adicionados.

As concentrações de nitrato variaram significativamente no controle e nos tratamentos ($p < 0,05$) no decorrer do experimento. Partindo-se de uma concentração inicial de 2.646 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no 1º dia de amostragem no tratamento N a concentração de nitrato foi de 1.165 $\mu\text{g.L}^{-1}$, refletindo um consumo de 56% deste elemento (fig. 3. a). No tratamento N+P+Fe a concentração de nitrato registrada no primeiro dia foi de 559 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mostrando que houve o consumo de 79% do nitrato presente na água, maior se comparado ao consumo de nitrato observado no tratamento N. Em ambos os tratamentos em que houve a adição de nitrato, a concentração deste nutriente foi diminuindo gradativamente, mas é válido ressaltar que no tratamento N+P+Fe esta diminuição ocorreu de forma mais acentuada. Apesar das diferenças entre os valores médios de nitrato nos tratamentos N e N+P+Fe, os mesmos não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), certamente em decorrência dos elevados desvios padrão encontrados no tratamento N. O controle e os tratamentos P e Fe tiveram o mesmo comportamento ao longo do experimento ($p < 0,05$), com baixas concentrações de nitrato em função daquela observada na água do reservatório (146 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

A partir do 12º dia as concentrações de NO_3^- no tratamento N+P+Fe diminuíram significativamente (atingindo valores em torno de 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$), entretanto ainda foram encontrados elevados valores de biomassas (7,73 $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}/12^\circ$ dia, 6,71 $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}/15^\circ$ dia e 4,01 $\text{mm}^3.\text{L}^{-1}/24^\circ$ dia) os quais chegaram a ser 5 vezes maiores em relação ao controle no mesmo período. No controle e no tratamento P, também foi observada tendência de aumento de biomassa no 35º dia. Este aumento de biomassa no final do experimento pode estar

relacionado à liberação de nutrientes decorrente de morte celular ou da excreção do zooplâncton, como relatado no caso do fósforo presente na biomassa fitoplanctônica que após ser liberado no meio pode em parte ser reabsorvido pelo fitoplâncton (Neowbold *et al.*, 1981, Addy *et al.*, 1993).

Quando comparada ao nitrato, observou-se que o amônio presente nos tratamentos Ne N+P+Fe foi assimilada mais rapidamente (figura 3. b). No 1º dia, o tratamento N apresentou concentração de 16,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e o tratamento N+P+Fe de 12,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o que equivale a um consumo da amônia presente na amostra de 90,5% e 93%, respectivamente. No decorrer do experimento as concentrações de amônia nestes tratamentos variaram ($p < 0,05$) entre 20,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (N+P+Fe, 6º dia) e 54,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (N, 9º dia).

As concentrações de nitrito (figura 3. c) no controle e nos tratamentos apresentaram uma variação significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$). Do 1º ao 15º dia de experimento, as concentrações variaram entre 35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1º dia) a 28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (15º dia) e se mantiveram próximas a da água do reservatório (28 $\mu\text{g.L}^{-1}$). A partir do 24º dia observou-se um aumento das concentrações de nitrito no controle e nos tratamentos, e no 35º dia esse aumento foi mais expressivo no controle (80,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e no tratamento P (69,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O aumento nas concentrações de nitrito pode estar relacionado à presença de formas orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (em decorrência do aumento de biomassa) as quais foram convertidas por ação bacteriana a formas mais reduzidas, como o nitrito (Wetzel, 1993).

O ortofosfato adicionado aos tratamentos P e N+P+Fe também foi rapidamente consumido nas primeiras 24 horas do experimento (fig. 3. d) e variou de forma significativa ($p < 0,05$) ao longo do experimento. No primeiro dia de amostragem, as concentrações encontradas no tratamento P e N+P+Fe, que iniciaram com 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$, foram de 35,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 57,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, retornando, portanto a valores próximos ao encontrado na água do reservatório (50 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

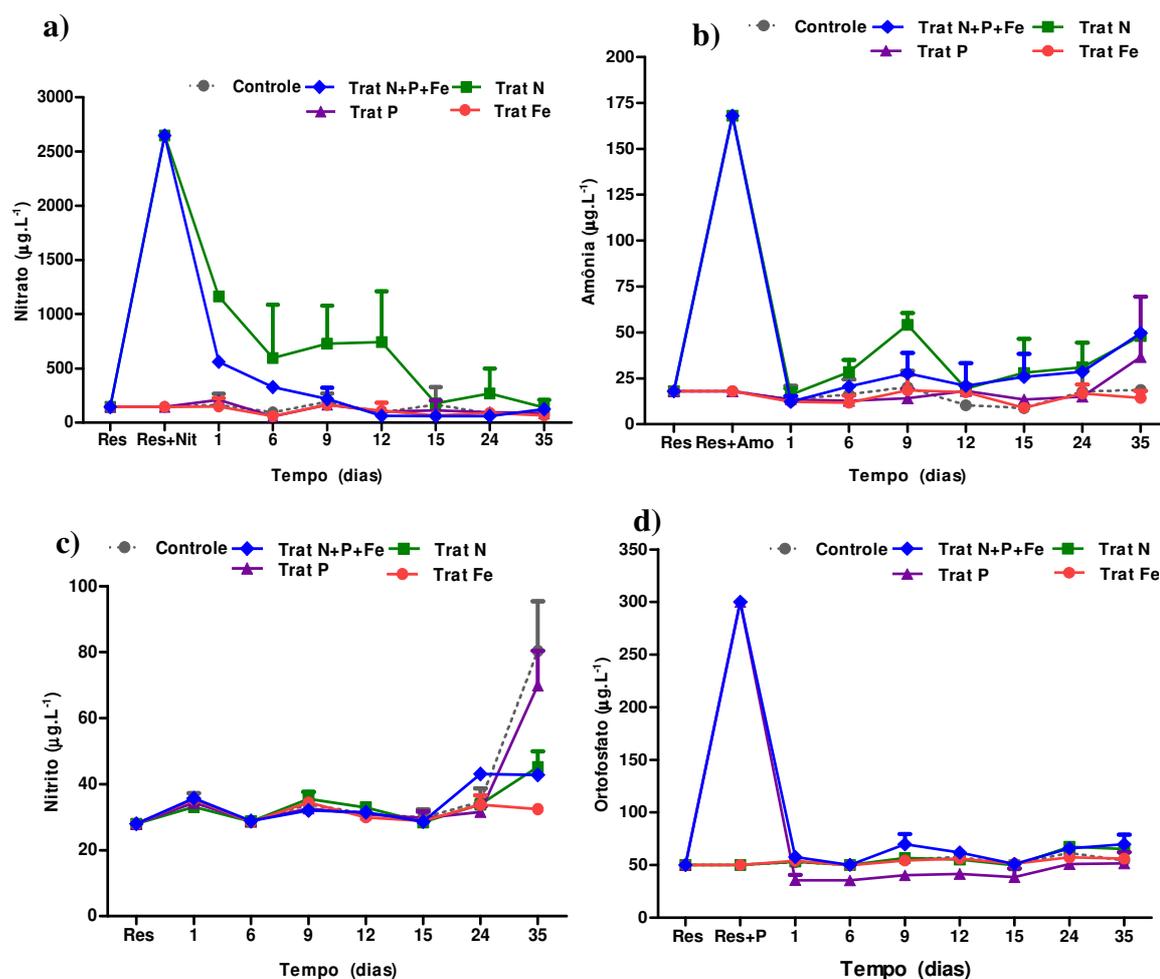


Figura 03: Variação das concentrações de nitrato (a), amônio (b), nitrito (c) e ortofosfato (d), no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

O consumo de ortofosfato no tratamento N+P+Fe (considerando o ortofosfato já presente na água do reservatório) foi de 81% e no tratamento P foi de 88%. Do 1° ao 35°, o controle e os tratamentos N+P+Fe, N e Fe se comportaram de forma similar ($p > 0,05$). Já o tratamento P continuou apresentando as menores concentrações de ortofosfato ao longo do experimento, se diferenciando dos demais do 1° ao 12° dia.

Como esperado, nos tratamentos em que foi adicionado N foram alcançadas razões N/P mais altas que as originalmente presentes na água do reservatório (4:1). As maiores

razões N/P foram obtidas no tratamento N (23, 1º dia), visto que neste tratamento não foi adicionado ortofosfato, o que resultaria em um balanço refletindo em menores razões N/P, como verificado no tratamento N+P+Fe (10, 1º dia) (fig. 4).

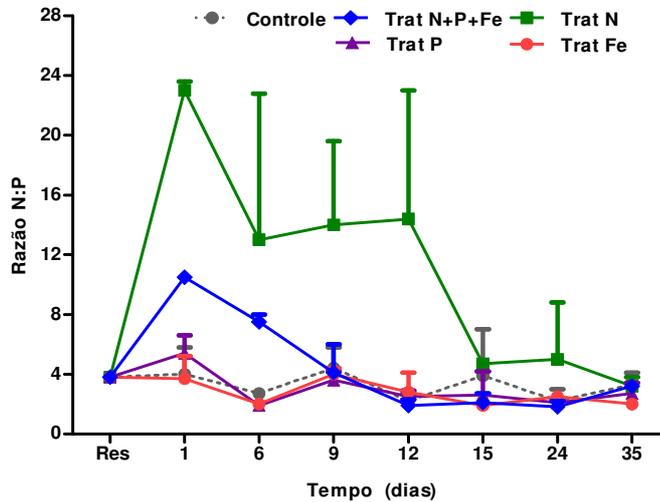


Figura 04: Variação da razão N/P no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Para os macronutrientes não foram apresentados os dados do 3º dia de experimento, visto que durante a análise cromatográfica, as amostras deste tempo amostral apresentaram alguns íons não passíveis de identificação pela técnica utilizada, fato que não permitiu a observação dos picos de NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} e NH_4^+ .

No tratamento N+P+Fe as concentrações de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} e Fe diminuíram expressivamente já no 1º dia de amostragem, o que refletiu um significativo aumento da biomassa total (de $1,63 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ no inóculo para $7,90 \pm 1,24 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$). Também no tratamento N a comunidade fitoplanctônica assimilou o NO_3^- de forma imediata, porém menos expressiva, e no 1º dia o aumento de biomassa total em relação ao original (de $1,63 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ no inóculo para $3,64 \pm 2,35 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) foi menor do que no tratamento N+P+Fe. No tratamento N, do 6º ao 12º dia, apesar de ainda terem sido registrados valores elevados de nitrato (valores médios na ordem de $600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) a biomassa total diminuiu ($0,62 \pm 0,08 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ / 6º dia, $0,80 \pm 0,19 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ / 9º dia e $1,16 \pm 0,14 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ / 12º dia). No 9º dia também foi observado

no tratamento N maior concentração de amônia ($54,2 \mu\text{g.L}^{-1}$), em relação ao controle e demais tratamentos. Este aumento paralelo à queda na biomassa pode ter refletido uma decomposição da biomassa que se desenvolveu no 1º e 3º dia de experimento. Resultado semelhante foi verificado por Crossetti e Bicudo (2005) em experimento com mesocosmos.

O fósforo adicionado nos tratamentos N+P+Fe e P, também foi rapidamente assimilado pela comunidade fitoplanctônica, tendo em vista as baixas concentrações de PO_4^{3-} encontradas nestes tratamentos. Concentrações ainda mais baixas foram encontradas no tratamento P.

Assim como os macronutrientes adicionados aos diferentes tratamentos foram rapidamente absorvidos, o micronutriente Fe também foi rapidamente assimilado nos tratamentos em que este foi adicionado (fig. 5). Houve variação significativa ($p < 0,05$) da concentração deste elemento durante o experimento. Após a adição de Fe na concentração de $450 \mu\text{g.L}^{-1}$, já no primeiro dia a concentração de ferro encontrada no tratamento Fe foi de $79,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ e no tratamento N+P+Fe foi de $101,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, o que equivale a uma absorção do ferro presente na água de 82% e 77%, respectivamente. Portanto, a partir do 1º dia, todos os tratamentos e o controle apresentavam concentrações de Fe equivalentes às originais presentes na água do reservatório ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Valores médios mais baixos foram observados no 24º dia, que corresponde ao último dia em que este elemento foi determinado.

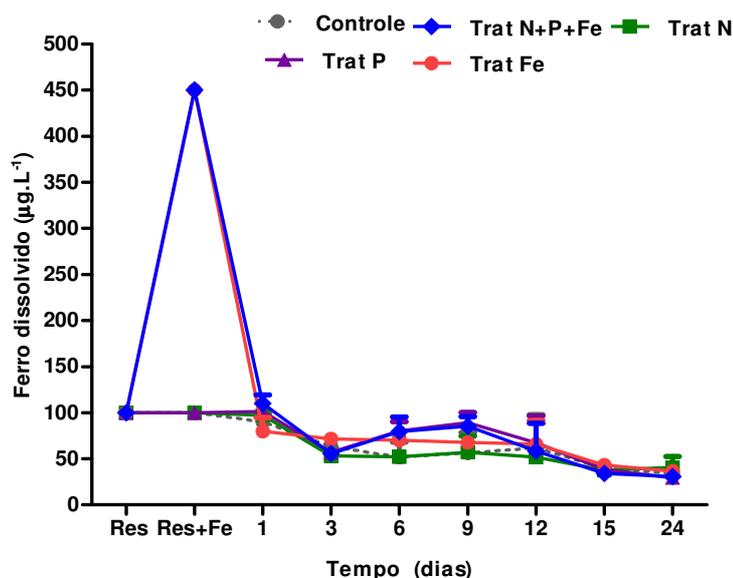


Figura 05: Variação da concentração de ferro dissolvido no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Variáveis bióticas: clorofila *a* e biomassa total

As concentrações de clorofila *a* (fig. 6. a) variaram significativamente ($p < 0,05$) no decorrer do experimento de microcosmos, no entanto foram encontrados elevados desvios padrão, de forma que não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$) entre controle e tratamentos. Entretanto, observando tendências ao longo do tempo, a partir do 6° em diante os valores médios de clorofila *a* no controle e nos tratamentos N e Fe foram baixos, não ultrapassando $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ enquanto que valores médios mais elevados foram observados no tratamento N+P+Fe chegando a $4,9 \mu\text{g.L}^{-1}$ no 35° dia. Quanto ao tratamento P, entre o 3° e o 12° os valores médios de clorofila *a* se mantiveram baixos, mas a partir do 15° dia aumentaram atingindo no 35° dia de experimento $4,0 \pm 2,3 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Assim como a clorofila *a*, a biomassa total (fig. 6. b) também variou ao longo do tempo no controle e nos tratamentos ($p < 0,05$). Porém, em decorrência dos elevados desvios padrão, em poucos casos houve diferenças significativas entre as condições testadas, como por exemplo, os maiores valores médios de biomassa total ($p < 0,05$) no tratamento N+P+Fe no 1° e 3° dias de experimento se comparado ao controle e ao tratamento P e no 12° dia de experimento ($p < 0,05$) se comparado ao controle e aos demais tratamentos. Ainda assim puderam ser observadas algumas tendências, de forma geral, ao longo do experimento foram verificados valores de biomassa equivalentes aquele encontrado no reservatório, exceto como citado, no caso do tratamento N+P+Fe, no qual maiores valores de biomassa foram observados até o 35° dia ($8,8 \pm 4,2 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$, a maior média registrada). A partir do 24° dia o controle apresentou um aumento de biomassa chegando a $5,5 \pm 3,3 \text{ mm}^3.\text{L}^{-1}$ no último dia do experimento.

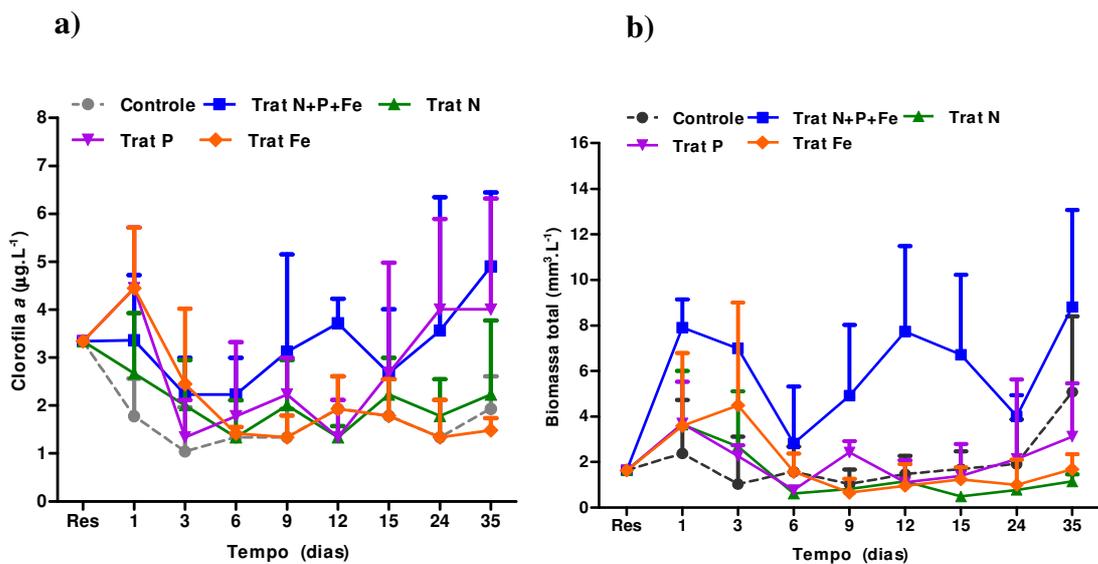


Figura 06: Variação da concentração de clorofila a (a) e biomassa total (b) no controle e nos tratamentos durante o experimento (valores de média de desvio padrão). Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Variáveis bióticas: biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos

Na amostra do reservatório, as principais classes de algas registradas foram clorofíceas, bacilariofíceas e cianobactérias. Uma vez que as clorofíceas já eram o grupo dominante na água do reservatório no momento da coleta para a montagem do experimento, esta dominância foi observada no controle (fig. 7. a, b) e nos tratamentos (fig. 8. a, b; fig. 9. a, b; fig. 10. a, b; fig. 11. a, b) no 1º dia do experimento. Durante praticamente todo o experimento, a dominância de clorofíceas se manteve nos microcosmos controle e tratamentos N+P+Fe, N e Fe.

O tratamento N foi o único em que no 1º dia observou-se biomassa acentuada de outro grupo fitoplanctônico, diatomáceas (fig. 9. a, b). De forma geral, as diatomáceas se desenvolveram melhor nos tratamentos em que o N foi adicionado. No tratamento N+P+Fe isso ficou mais evidente a partir do 9º dia. Entretanto, a composição florística das espécies de diatomáceas no controle e nos tratamentos foi similar, as espécies *Cyclotella* sp.1, *Cyclotella* sp.2, *Fragilaria* sp. e *Fragilaria cf. parva*, foram as mais importantes em termos de biomassa durante o experimento.

No controle (fig. 7. a, b) e no tratamento Fe (fig. 11. a, b) as dinofíceas foram o segundo grupo (após as clorofíceas) mais importante em termos de biomassa. No controle, no 3° dia de experimento as dinofíceas representaram 31% da biomassa fitoplanctônica, e do 9° ao 35° dia se mantiveram como um grupo importante. No tratamento Fe, no 6° dia as dinofíceas constituíram 43% da biomassa e se mantiveram como um grupo importante até o final do experimento. No controle e nos tratamentos as dinofíceas foram representadas por um único táxon, *Peridinium* sp.

O terceiro grupo que contribuiu para a biomassa fitoplanctônica foi o das cianobactérias. No controle e nos tratamentos N+P+Fe, N e Fe sua biomassa foi inferior a 10% (fig. 8, 9, 11). O tratamento P foi o único em que este grupo foi importante (fig. 10. a, b). No 24° e 35° dias a biomassa de cianobactérias atingiu valores médios de 1,9 mm³.L⁻¹ e 2,6 mm³.L⁻¹, correspondendo, respectivamente a 90% e 85% da biomassa fitoplanctônica.

Espécies de crisofíceas e criptofíceas não apresentaram bom desenvolvimento no controle e nos tratamentos enriquecidos ao longo do experimento. Quando presentes, as crisofíceas foram representadas pelas espécies *Chromulina* sp. e *Pseudostaurastrum* sp. e as criptofíceas por *Cryptomonas brasiliensis* e *Cryptomonas* cf. *mansoni*.

Ao longo do experimento no controle e nos tratamentos enriquecidos foram identificados 106 táxons: 60 táxons de clorofíceas (46 espécies e 14 gêneros), 24 táxons de cianobactérias (17 espécies, 6 gêneros e 1 família), 17 táxons de diatomáceas (10 espécies e 7 gêneros), 2 táxons de crisofíceas (2 gêneros), 2 táxons de criptofíceas (2 espécies) e 1 táxon de dinofíceas (1 gênero).

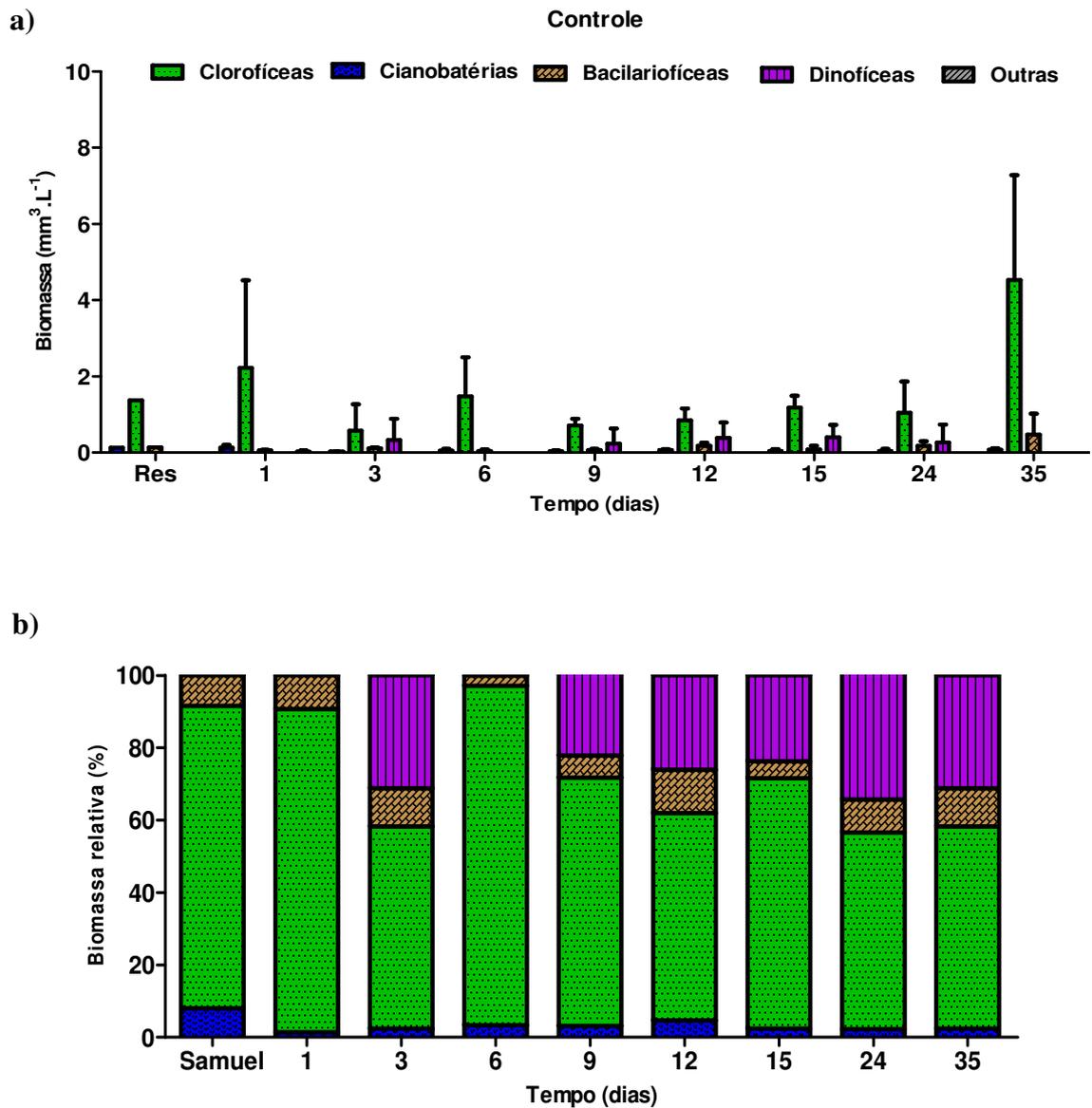


Figura 07: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no controle (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

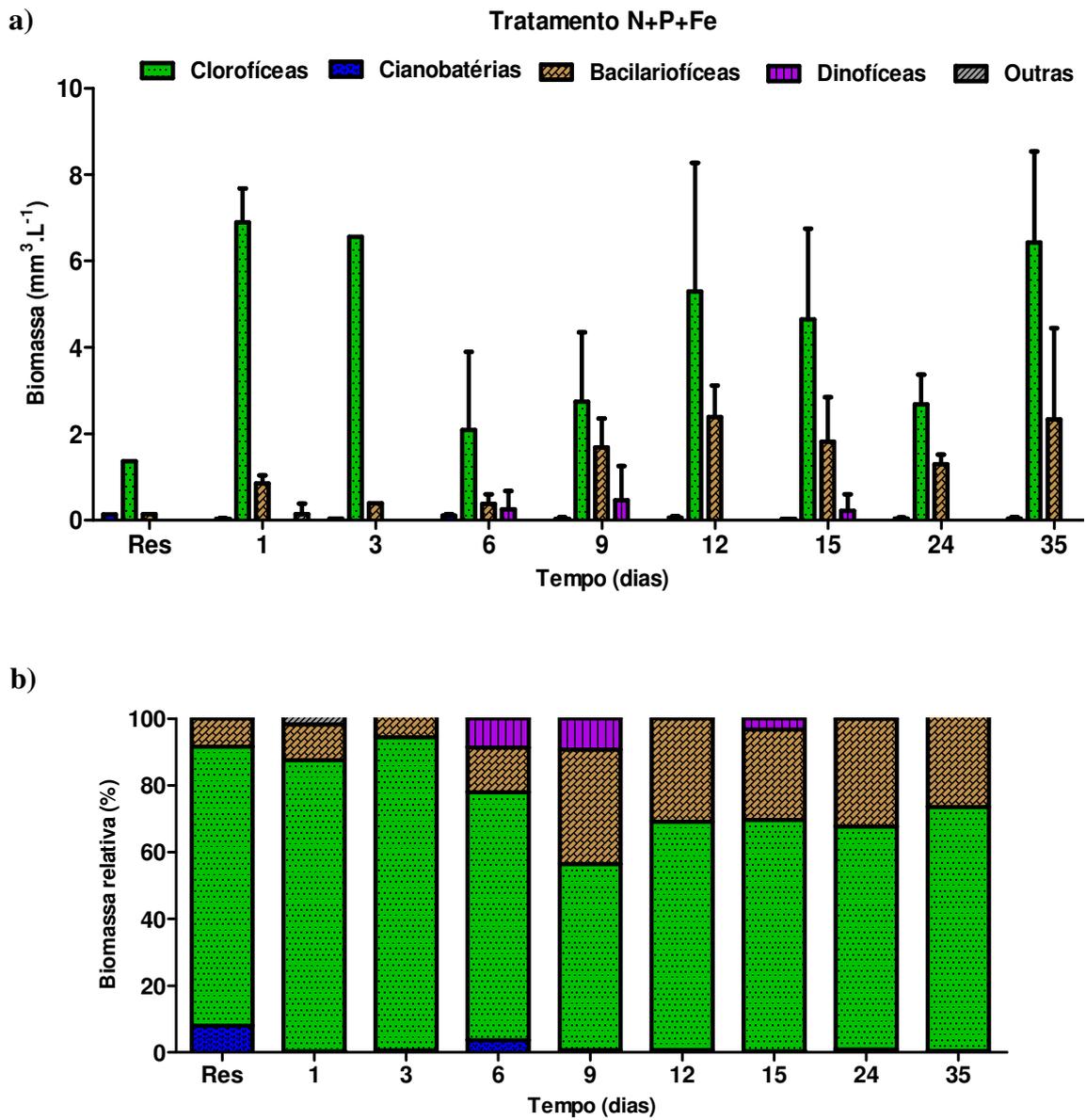


Figura 08: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento N+P+Fe (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

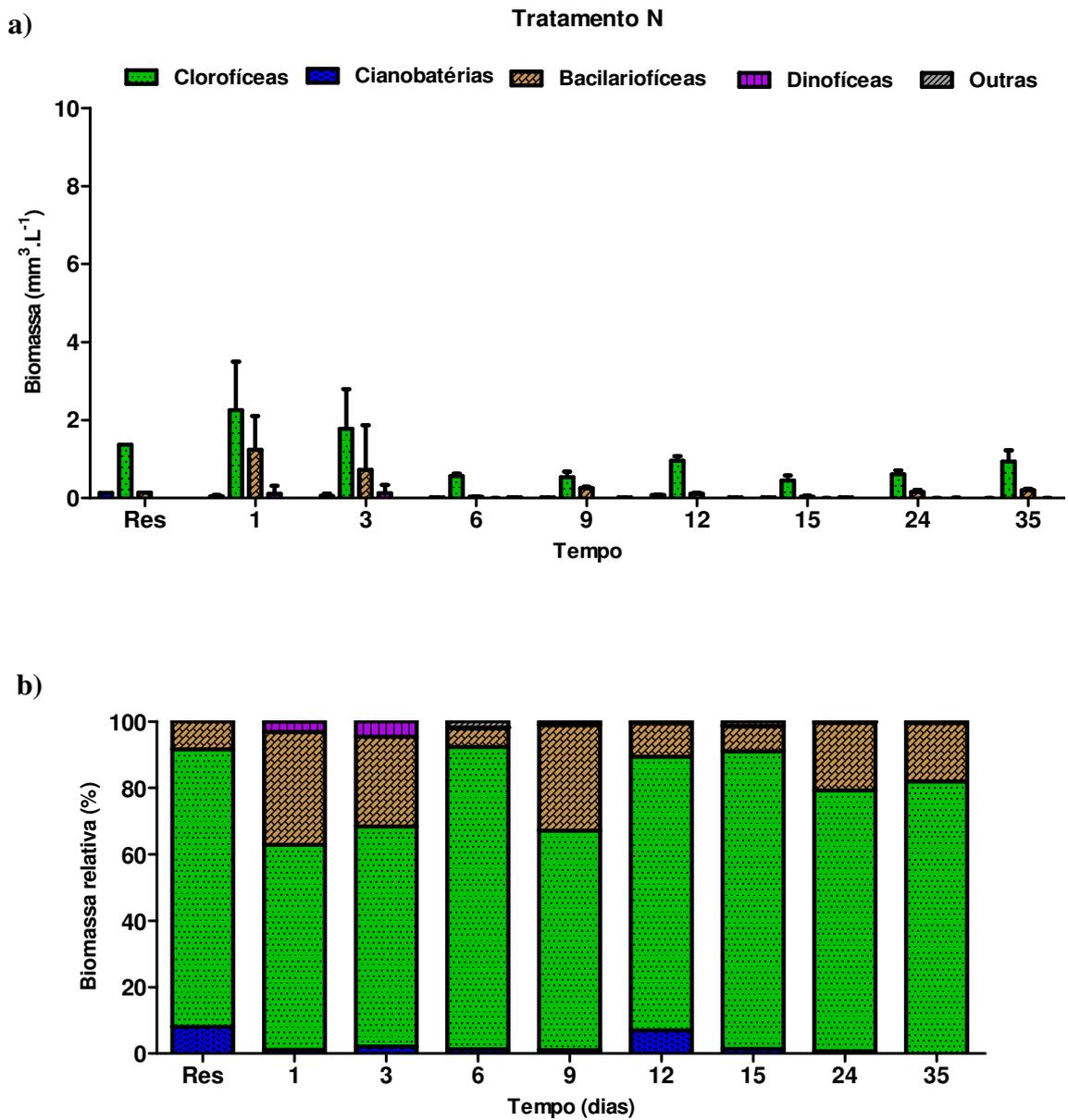


Figura 09: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento N (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

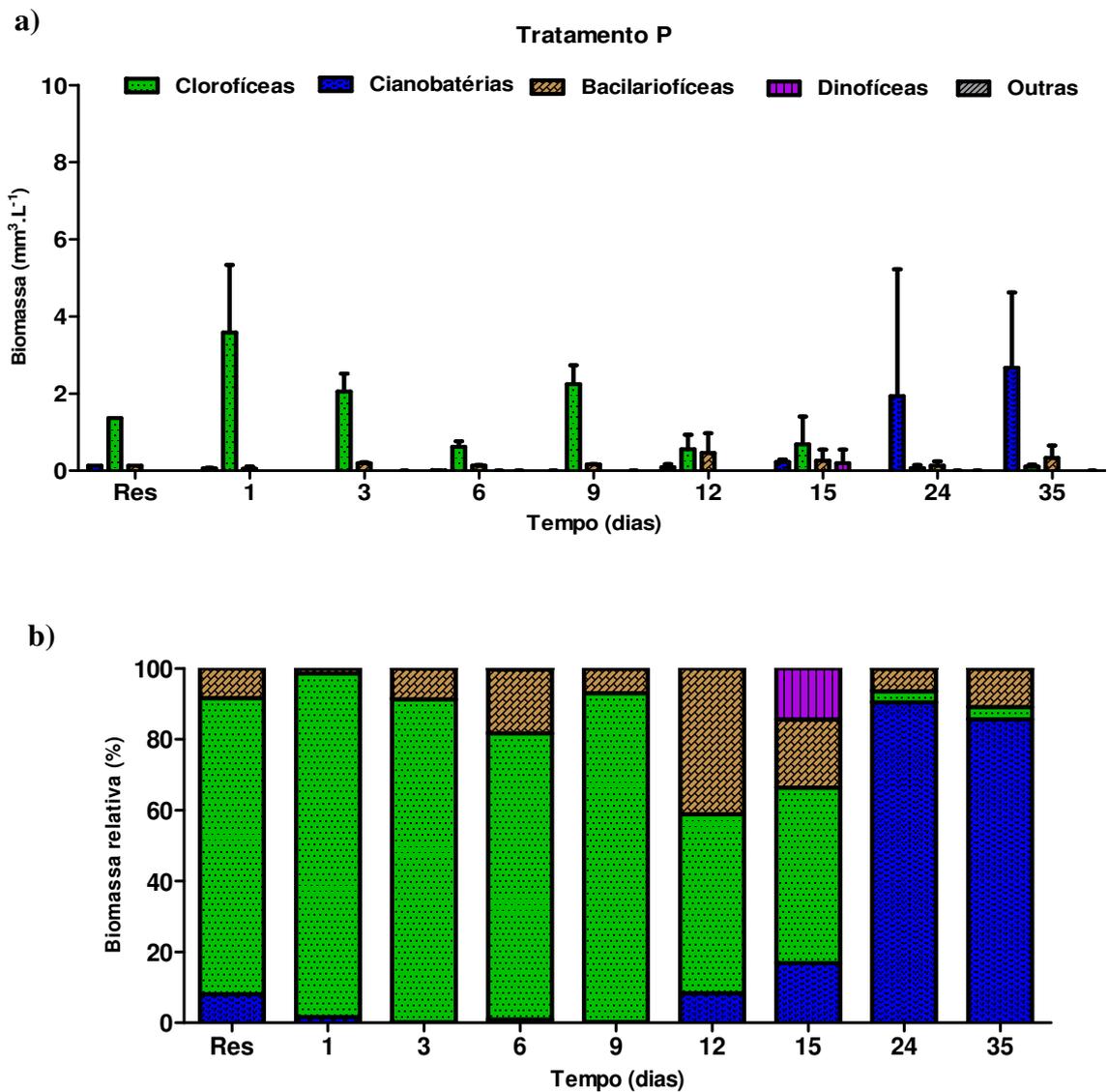


Figura 10: Variação da biomassa dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento P (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

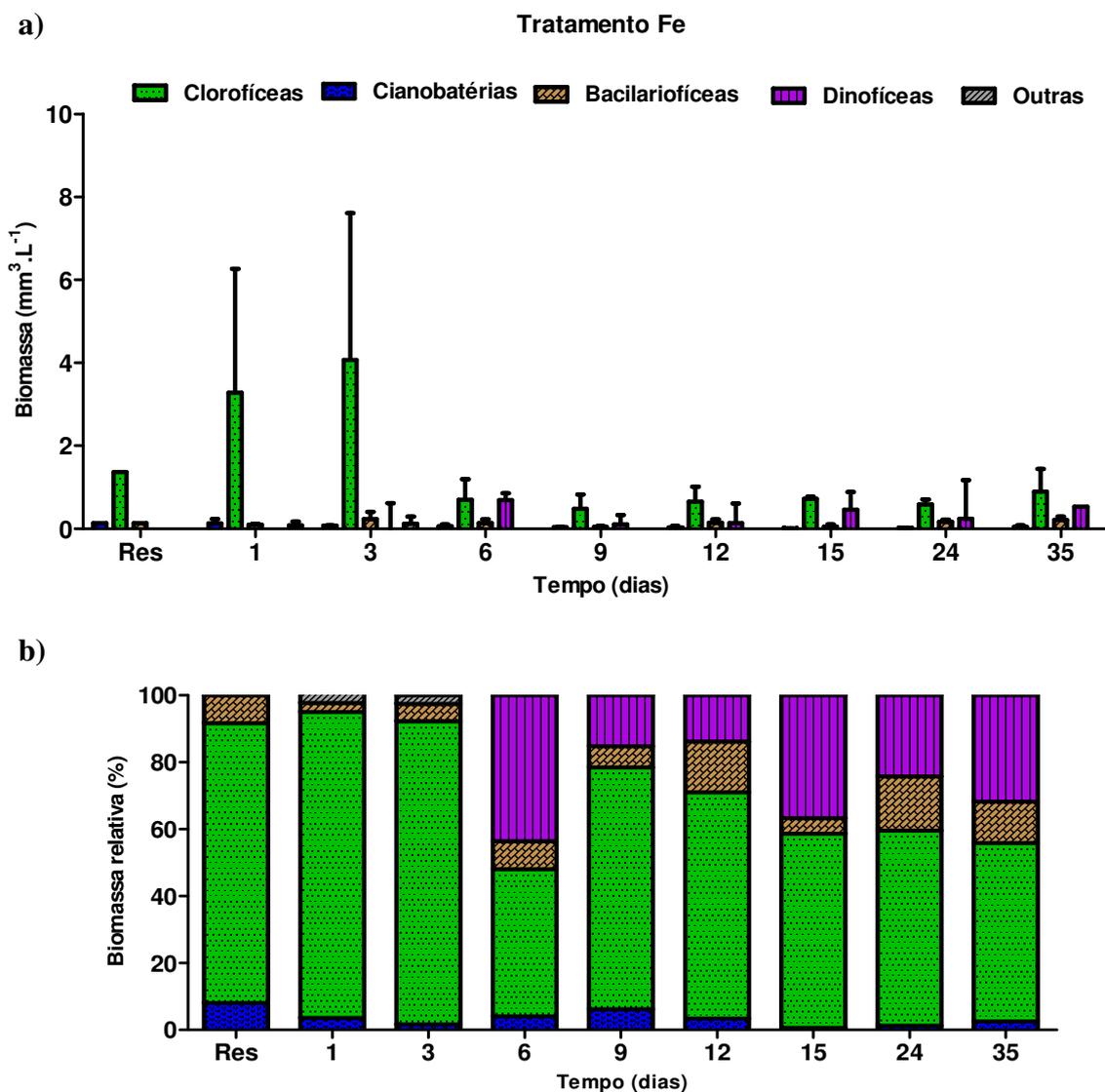


Figura 11: Variação da biomassa (a, b) dos principais grupos fitoplanctônicos no tratamento Fe durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Principais táxons de clorófitas

Os dois gêneros de clorófitas que apresentaram as maiores biomassas no controle e nos tratamentos foram *Coelastrum* e *Staurastrum* (fig. 12. a 16). O gênero *Coelastrum* também foi dominante na amostra do reservatório. Durante o experimento este gênero foi representado por 2 espécies, *C. reticulatum* e *C. pseudomicroporum*. O gênero *Staurastrum* foi

representado por 7 espécies, *S. johnsoni*, *S. dilatatum*, *S. leptocladum*, *S. iversenii*, *S. leptocanthum*, *S. excavatum* e *S. tetracerum*. As duas últimas espécies apresentaram as maiores biomassas no controle e nos tratamentos. O gênero *Cosmarium* também teve uma importante contribuição no tratamento N a partir do 15º dia. Este foi representado pelas espécies *C. asphaerosporum* e *C. lagoense*. Ressalta-se que nem todos os microcosmos apresentaram todas as espécies citadas durante o experimento.

Quanto à dominância dos gêneros *Coelastrum* e *Staurastrum*, foram observadas algumas tendências. Nos microcosmos controle (fig. 12. a, b), tratamento N+P+Fe (fig. 13. a, b) e Fe (fig. 16), a biomassa de *Staurastrum* começou a aumentar a partir do 6º dia de experimento. No controle foi dominante já neste dia, com uma biomassa relativa de 83%. Principalmente nos tratamentos N+P+Fe e Fe foi observado crescimento de *Staurastrum* até o último dia de experimento. As espécies *S. excavatum* e *S. tetracerum* apresentaram as maiores biomassas no controle e tratamentos N+P+Fe e Fe. Ressalta-se que no tratamento N+P+Fe a espécie *S. johnsoni* teve importante contribuição em termos de biomassa deste gênero, neste tratamento também foi encontrado o maior número de espécies de *Staurastrum*, totalizando 6 espécies.

Nos tratamentos N e P foram observados padrões diferentes com relação à dominância de espécies de *Coelastrum* e *Staurastrum*. No tratamento N, *Staurastrum* se desenvolveu bem no início (73%/1º dia e 54%/3º dia) e nos últimos dias de experimento (15º ao 35º dia), representado principalmente por *S. excavatum* e *S. tetracerum*. Já no tratamento P, este gênero se desenvolveu melhor a partir do 12º dia, com dominância no 15º dia (71%), sendo ainda importante até o 24º dia. *Coelastrum*, representado principalmente por *C. reticulatum*, dominou por um período maior no tratamento P apenas no 15º e 24º dias esta dominância foi quebrada por *Staurastrum*, com 71% e 54%, respectivamente.

De uma forma geral foi observado um padrão de alternância da dominância das espécies de *Coelastrum* e *Staurastrum*.

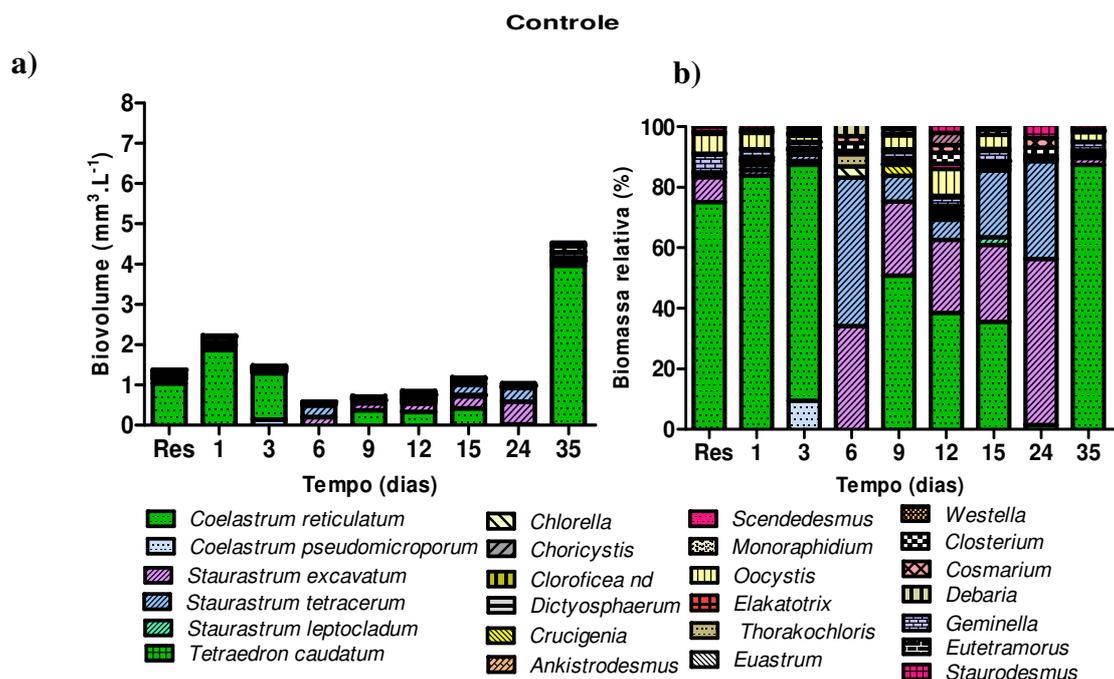


Figura 12: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorófitas no durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

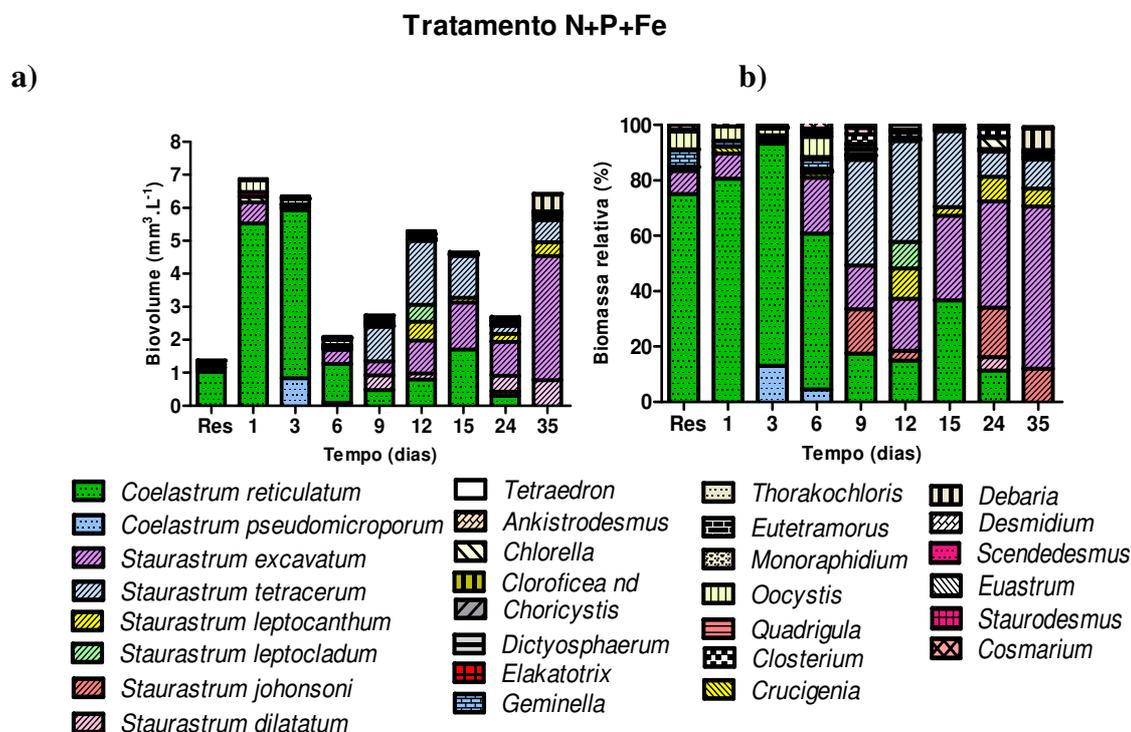


Figura 13: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorófitas no tratamento com adição de nitrogênio, fósforo e ferro durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Tratamento N

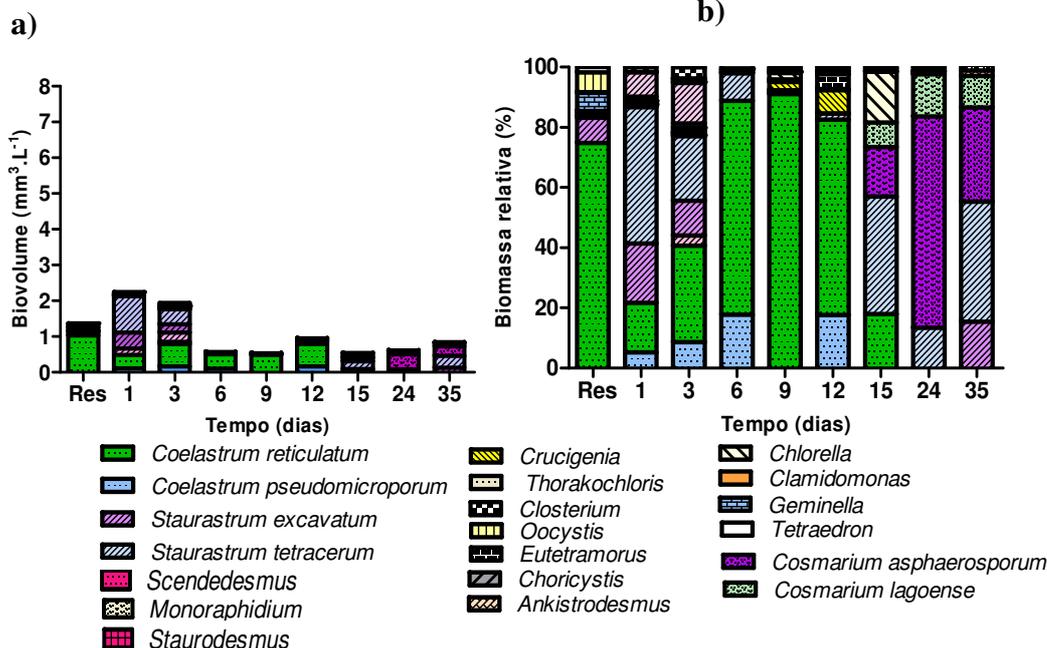


Figura 14: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorófitas no tratamento com adição de nitrogênio durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Tratamento P

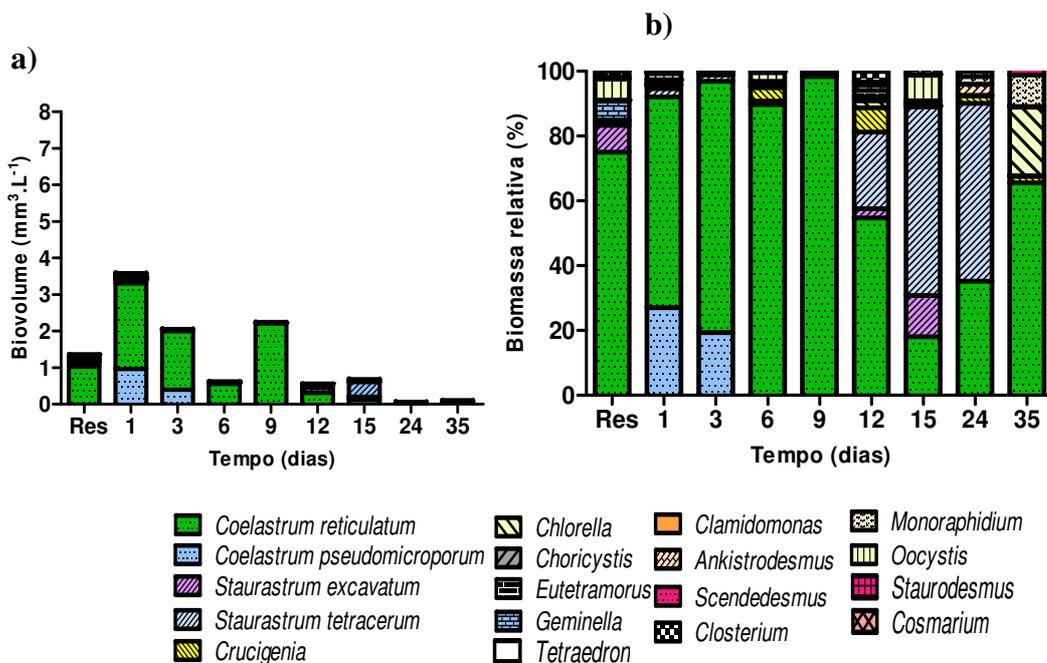


Figura 15: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de clorófitas no tratamento com adição de fósforo durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

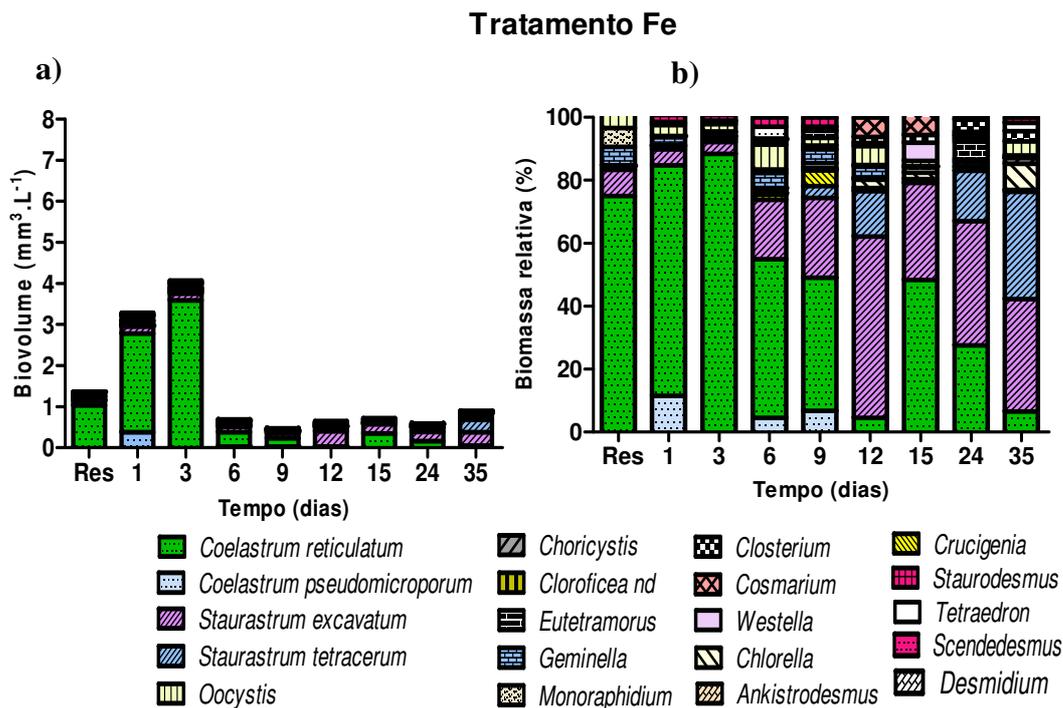


Figura 16: Variação do biovolume e da biomassa relativa de clorófitas no tratamento com adição de ferro (a, b) durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

Principais táxons de cianobactérias

A espécie que apresentou maior contribuição para a biomassa de cianobactérias nos microcosmos durante maior período foi *Planktolyngbya limnetica*, a qual também foi dominante na água do reservatório utilizada nos microcosmos (fig. 17 a 21). Outros táxons importantes encontrados nos microcosmos durante o experimento, apresentando dominância, foram: Pseudanabaenaceae (controle/24° dia, tratamento N+P+Fe/24° dia e tratamento N/ 35° dia), *Geitlerinemaamphibium* (tratamento Fe e N+P+Fe /15° dia), *Synecocystis parvula* e *Leptolyngbia perelegans* (tratamento P/12° dia) e *Dolichospermum solitarium* (tratamento P/24° e 35° dias).

No 1° dia de experimento, ao comparar o biovolume de cianobactérias no reservatório ($0,132 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), ao biovolume no controle ($0,128 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) e nos tratamentos N+P+Fe ($0,031 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), N ($0,042 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), P ($0,060 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) e Fe ($0,127 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) não foi observado aumento, ou seja, não houve crescimento de cianobactérias 24 horas após a adição de

nutrientes. Nos tratamentos N+P+Fe, N e P foi observada uma queda do biovolume, enquanto que no tratamento Fe esta diminuição não foi observada, estando equivalente ao controle (figs. 17 a 21).

No 3º dia de experimento foi observada uma diminuição expressiva de biovolume em relação ao 1º dia tanto no controle ($0,024 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) quanto no tratamento P ($0,007 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) e o tratamento Fe ($0,073 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) (figs. 17, 20, 21). A partir do 9º dia de experimento foram verificadas menores oscilações e menores biovolumes de cianobactérias no controle (valores abaixo de $0,07 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), tratamento N+P+Fe (valores abaixo de $0,05 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$), tratamento Fe (valores menores que $0,04 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) e no tratamento N (menores que $0,008 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$). Este último correspondeu ao tratamento que teve as menores biomassas de cianobactérias em todo o período de experimento (fig.19).

Para o tratamento P foi observado um comportamento diferente em relação ao controle e demais tratamentos a partir do 12º dia, ocorrendo uma recuperação do biovolume de cianobactérias ($0,047 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) (figs. 17 e 21). Esta recuperação foi representada principalmente por *Leptolyngbya perelegans*. No 15º dia foi observado um aumento ainda mais expressivo de biovolume ($0,207 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) constituído principalmente por *Synechocystisparvula* e *Planktolyngbya limnetica*. Já no 24º dia foi observado um elevado biovolume ($1,935 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) da espécie *Dolichospermumsolitarium*, que aumentou no 35º dia ($2,667 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$).

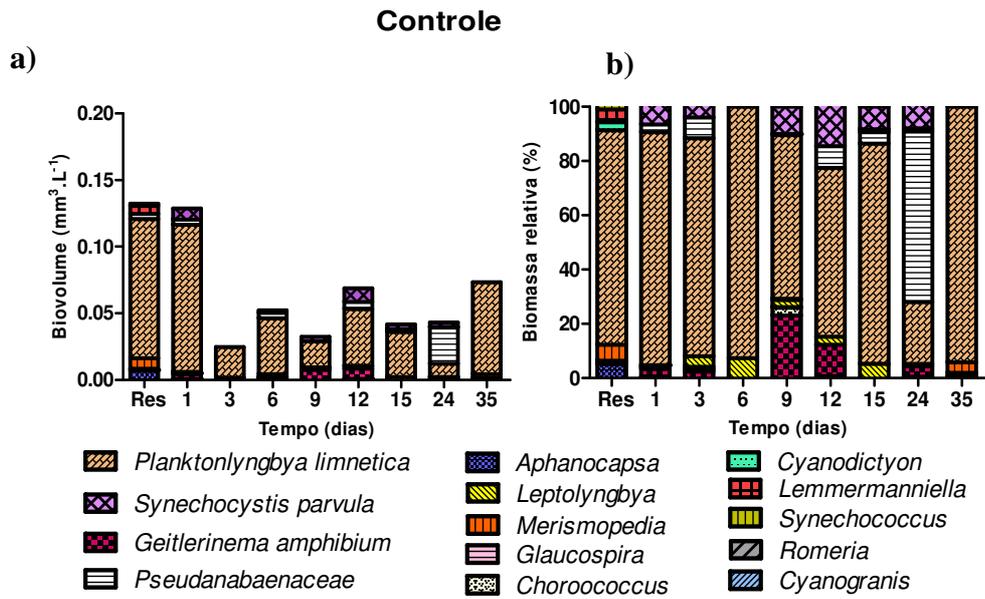


Figura 17: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no controle durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

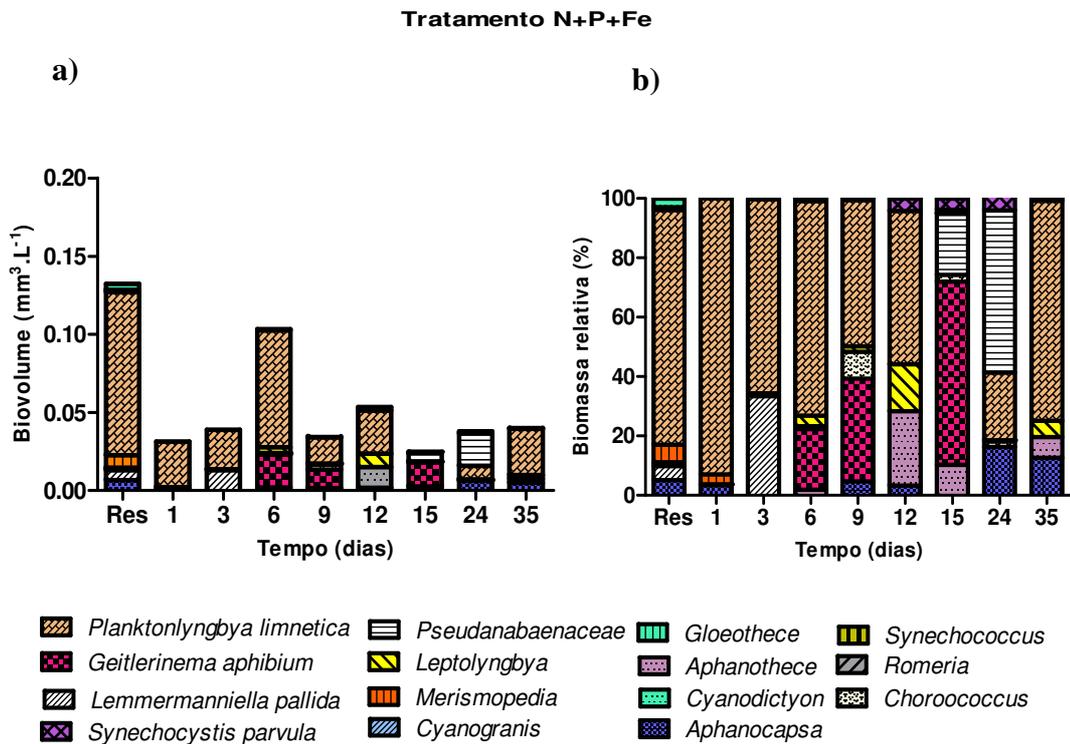


Figura 18: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de nitrogênio, fósforo e ferro durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

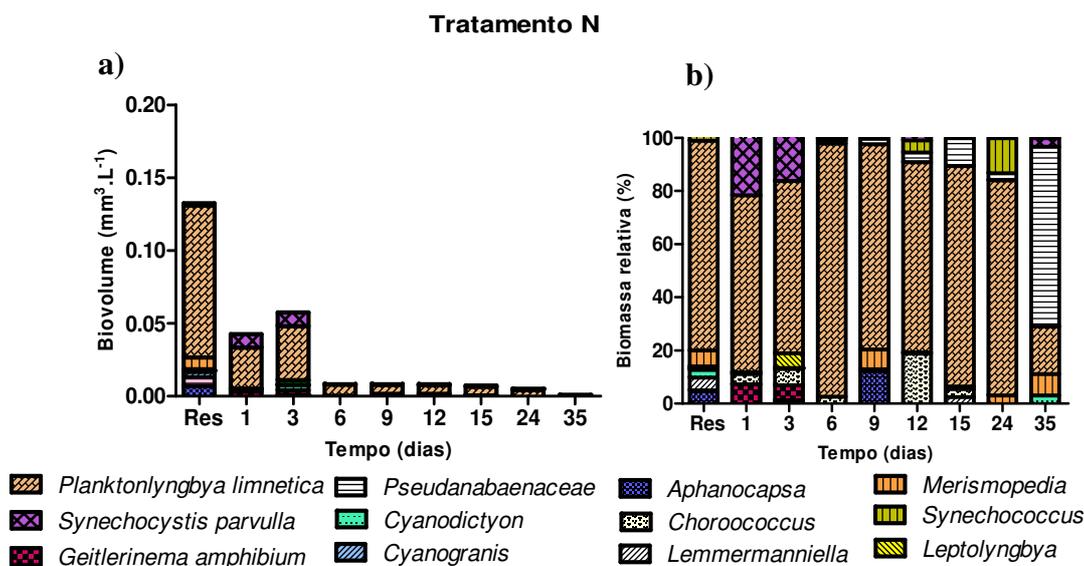


Figura 19: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de nitrogênio durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

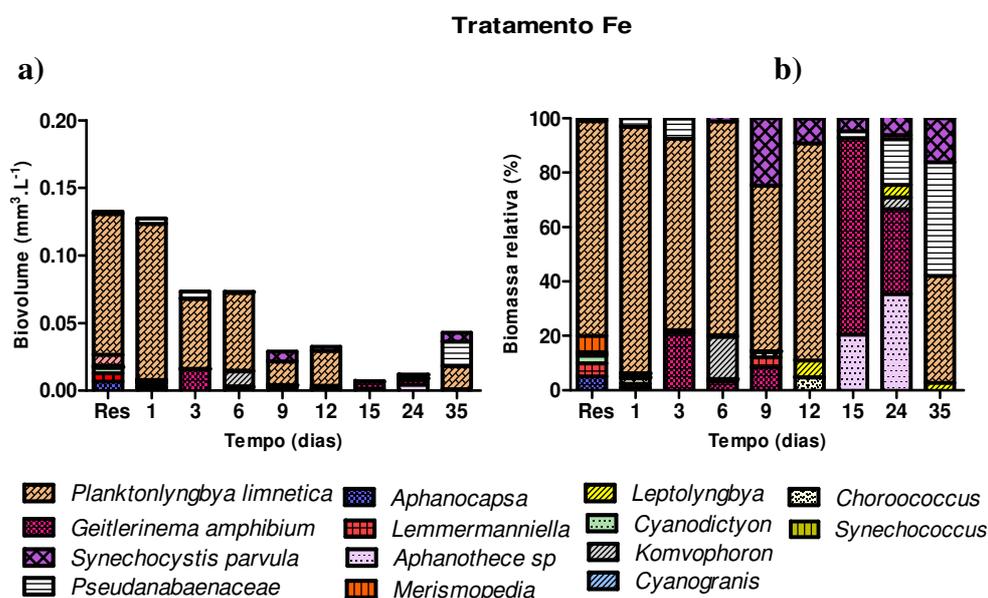


Figura 20: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de ferro durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

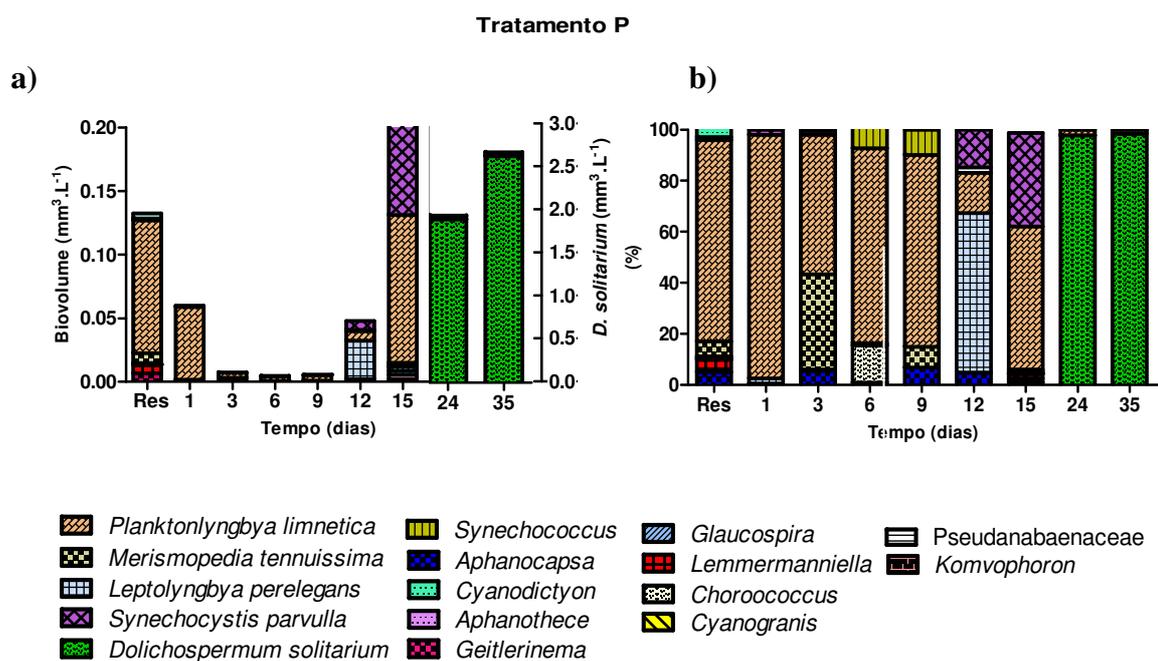


Figura 21: Variação do biovolume (a) e da biomassa relativa (b) de cianobactérias no tratamento com adição de fósforo durante o período do experimento. Res, valores registrados na água do reservatório no momento da coleta para início do experimento.

DISCUSSÃO

O pH possui uma íntima relação com o desenvolvimento fitoplanctônico. Durante a fotossíntese o CO_2 é removido (juntamente com o bicarbonato) pelo fitoplâncton, elevando o pH da água (Tundisi & Tundisi, 2008). Entretanto, as variações dos valores de pH da água dos microcosmos não pareceram estar correlacionadas ao desenvolvimento da biomassa fitoplanctônica em cada condição, visto que o controle e tratamentos apresentaram o mesmo padrão de variação deste parâmetro. A partir do 3º dia de experimento os valores de biomassa foram diferentes no controle e nos tratamentos, mas o pH apresentou valores muito próximos.

A condutividade elétrica da água está relacionada com a concentração de íons no meio (Wetzel, 1993), apesar das oscilações ao longo do tempo, este parâmetro parece ter acompanhado a concentração de nutrientes no meio, visto que valores mais elevados foram obtidos nos tratamentos N e N+P+Fe, nos quais foram adicionados $2.500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NO_3^- . Já

os menores valores de condutividade ao longo do experimento foram registrados no controle e tratamento Fe.

A rápida absorção (menos de 24 horas) pelo fitoplâncton dos nutrientes adicionados isoladamente (tratamentos N, P e Fe) ou simultaneamente (tratamento N+P+Fe) refletiu o aumento de biomassa verificado principalmente no 1° e 3° dia em todos os tratamentos. A rápida absorção de nitrogênio e fósforo foi observada por outros autores em experimentos similares (Pizarro *et al.*, 2002; Scinto & Reddy, 2003; Wolf & Lind, 2010).

Durante o experimento foram encontrados elevados desvios padrão nos valores de clorofila *a* e biomassa total no controle e nos tratamentos, o que significa que a comunidade fitoplanctônica respondeu de forma diferente entre as réplicas. Estas diferenças certamente refletem a variabilidade das populações naturais, visto que mesmo com os esforços para garantir a reprodutibilidade na montagem de cada microcosmo, não se obteve inóculos idênticos, diferente do que ocorre com experimento com linhagens puras. Este fato ficou evidente a partir da análise da composição de biomassa relativa de clorófitas e cianobactérias nos inóculos dos diversos microcosmos, que não foi exatamente a mesma. Mesmo assim foi possível observar algumas tendências, por exemplo, maiores valores de biomassa total foram obtidos no tratamento enriquecido simultaneamente com nitrogênio, fósforo e ferro (tratamento N+P+Fe), durante praticamente todo o período do experimento. As maiores médias de clorofila *a* ($4,90 \pm 1,54 \mu\text{g.L}^{-1}$) e biomassa total ($8,80 \pm 4,25 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$) neste tratamento foram obtidas no 35° dia.

Os elevados desvios padrão encontrados nos dados de biomassa dificultaram a interpretação do efeito da adição de nutrientes sobre o fitoplâncton no presente experimento. No 1° dia amostrado, o próprio confinamento da água propiciou um aumento de biomassa da comunidade fitoplanctônica, assim como encontrado por Delazari-Barroso (2007). Entretanto, houve uma tendência de maiores valores de biomassa no tratamento N+P+Fe durante o período do experimento. Biomassas bem menores foram registradas no tratamento N, no tratamento P, e no tratamento Fe, indicando que a comunidade fitoplanctônica do reservatório de Samuel é limitada por N e P. A concentração de ortofosfato na água do reservatório foi de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, ou seja, se encontrava acima da concentração sugerida por Reynolds (2006) como concentração limitante que é de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já a concentração de NID foi de $164 \mu\text{g.L}^{-1}$, desta forma a razão molar N/P na água do reservatório (igual a 4) pode estar indicando uma

limitação por nitrogênio, em função do baixo valor de NID. Com exceção do tratamento N, a razão molar encontrada no controle e nos tratamentos N+P+Fe, P e Fe, a partir do 6° dia de experimento foi inferior a 7. Há estudos que demonstram que um ambiente com razão molar abaixo de 13 são considerados limitados por N (Morris & Lewis, 1988; Guidford *et al.*, 2000). Lagos com razões N/P superiores a 23, como verificado no tratamento N no 1° dia de experimento, foram considerados limitados por P (Hecky *et al.*, 1993).

De uma forma geral a composição florística no controle e nos tratamentos foi similar, com exceção para o tratamento P, no 24° e 35° dia, período em que a espécie *Dolichospermum solitarium* dominou a comunidade. Para as clorófitas, no controle e nos tratamentos houve uma oscilação na dominância de espécies *Coelastrum pseudomicroporum* e *Coelastrum reticulatum* (esta com maior biomassa) e 7 espécies do gênero *Staurastrum*: *S. dilatatum*, *S. leptacanthum*, *S. leptocladum*, e *S. iversenii*, *S. Jhonsonii*, *S. excavatum* e *S. tetracerum*. Estas duas últimas espécies apresentaram maiores biomassas. No tratamento N espécies *Cosmarium asphaerosporum* e *Cosmarium lagoense* também foram importantes. A adição de nutrientes no tratamento N+P+Fe ocasionou o aumento expressivo de biomassa de clorófitas. As espécies que apresentaram maior crescimento foram *Coelastrum reticulatum*, *Staurastrum excavatum* e *Staurastrum tetracerum*. *Coelastrum reticulatum* já era dominante na amostra do reservatório.

Outros trabalhos experimentais também relataram o aumento de clorófitas frente à adição de nutrientes (Vuorio *et al.*, 2005; Kanget *al.*; 2012). Condições em que houve a adição de P causaram um expressivo aumento de clorófitas, incluindo desmídeas do gênero *Staurastrum*, constituindo um importante grupo desde ambientes oligotróficos a ambientes eutróficos (Coesel, 1982; Coesel 1996).

Com relação às cianobactérias, a espécie *Planktolyngbya limnetica* apresentou maior biomassa no controle e nos tratamentos durante praticamente todo o período do experimento, (exceto tratamento P). Esta espécie também era dominante na amostra do reservatório. Em alguns momentos esta dominância foi quebrada e outras espécies tiveram uma contribuição importante em termos de biomassa. Citam-se a família Pseudoanabaenacea (controle, 24° dia), a espécie *Geitlerinema amphibium* (tratamento N+P+Fe, 15° dia), *Leptolyngbya elegans* (tratamento P, 12° dia) e a espécie *Dolichospermum solitarium* (tratamento P, 24° e 35° dias).

Durante a montagem de experimentos a água foi filtrada em rede de 160 μm no intuito de não retirar as raras e macroscópicas colônias de *Microcystis panniformes* observadas na amostra do reservatório. No entanto, *M. panniformes* não se desenvolveu nos microcosmos e também não foi visualizada na amostra do reservatório, certamente em decorrência do pequeno volume de amostra sedimentado na câmara para contagem (2 mL).

A similaridade das espécies tanto de clorófitas como de cianobactérias e dos demais grupos dominantes no controle e nos tratamentos mostrou que a pressão da herbivoria provavelmente contribuiu para a estrutura da comunidade fitoplânctônica, visto que este é um dos fatores que regulam o crescimento e a estrutura da comunidade (Tijdens *et al.*, 2008). As clorófitas dominantes, gêneros *Coelastrum* e *Staurastrum*, possuem características que podem contribuir para que sejam menos predadas pelo zooplâncton. *Coelastrum* são colônias com diâmetro geralmente superior a 20 μm (Biolo *et al.*, 2009) e as desmídeas do gênero *Staurastrum* são caracterizadas por apresentarem processos longos, ou espinhos regulares de tamanho variado, podendo atingir 40 μm (Lopes & Bicudo, 2003). Este fato também pode ter contribuído para a dominância deste gênero no controle e nos tratamentos em alguns períodos do experimento.

Dados apresentados sobre a estrutura da comunidade zooplânctônica da estação M1 do reservatório de Samuel apresentados por Nascimento (2006), mostraram que os copépodes e os cladóceros apresentam as maiores densidades durante um ciclo hidrológico. Dentre os copépodes, a ordem Calanoida, apresenta maiores biomassas e dentre os cladóceros destacam-se os gêneros *Diaphanosoma*, *Bosmina*, *Bosminopsis* e *Daphnia*. Quanto ao hábito alimentar os copépodes, especialmente os calanóides têm no nanofitoplâncton sua principal fonte de energia (McQUEEN, 1970; Macedo e Pinto-Coelho, 2000). Tendo em vista que rotíferos e cladóceros se alimentam preferencialmente de microalgas entre 1 a 17 μm (Gliwicz, 1969 apud Bonecker *et al.* 2011; Gilbert, 1998), é possível que estes microrganismos tenham exercido algum controle sobre o fitoplâncton de menor tamanho.

A ineficiência energética das cianofíceas filamentosas para o zooplâncton (Gragnani *et al.*, 1999) também pode contribuir para explicar a dominância de *Planktolyngbya limnetica*. O aumento das concentrações de nutrientes também pode produzir a substituição de formas fitoplânctônicas palatáveis por impalatáveis (Lazzaro, 1997; Wolfingbarger, 1999).

A taxa de filtração do zooplâncton aumenta em consequência do aumento da biomassa fitoplanctônica (Vieira *et al.*, 2011). Certamente durante o experimento houve uma resposta de biomassa de outras espécies não incluídas nos gêneros *Coelastrum*, *Staurastrum* e *Planktolyngbia*, no entanto estas espécies provavelmente foram predadas pelo zooplâncton, o que não permitiu a visualização do crescimento das mesmas.

O único tratamento em que as cianobactérias foram dominantes frente aos demais grupos fitoplanctônicos foi aquele em que houve adição de fósforo isoladamente. Foi verificado elevado crescimento da espécie *Dolichospermum solitarium* no 24° e 35° dias de experimento, com 97% e 98% de biomassa relativa, respectivamente. No 24° e 35° dia as razões N/P foram 2 e 3, respectivamente. Baixas razões N/P podem favorecer a dominância de algumas espécies de cianobactérias filamentosas, por exemplo, foi relatada dominância de *Anabaena* em razão N/P igual a 6 (Smith, 1983; Havens *et al.*, 2003). Espécies do gênero *Dolichospermum* são eficientes competidoras por fósforo, sendo capazes de assimilar este nutriente através da síntese de enzimas específicas para captá-lo do ambiente (Huisman *et al.*, 1997, Rai & Sharma, 2006; Tripathi *et al.*, 2012) e se desenvolver em baixas concentrações de NID, devido sua capacidade de fixar N atmosférico em decorrência da presença de células diferenciadas/heterocitos (Huisman *et al.*, 1997, Howarth *et al.*, 2008). O desenvolvimento de *Dolichospermum solitarium* no tratamento P, pode ter se devido à alta afinidade por P, esta espécie pode ter estocado P para crescer em momento oportuno, visto que é comum o crescimento deste grupo em ambientes com baixas concentrações de P (Nobel *et al.*, 1997; Rai & Sharma, 2006; Mateo *et al.*, 2006). O crescimento de *D. solitarium* ocorreu a partir do 24° dia (após 3 semanas do início do experimento), quando as baixas concentrações de NID no tratamento P (em torno de $160\mu\text{g.L}^{-1}$) tornaram-se favoráveis. Apesar do P também ter sido adicionado ao tratamento N+P+Fe, o crescimento desta espécie não foi verificado, pois a mesma não foi capaz de competir com as clorofíceas.

As concentrações de nutrientes adicionadas não proporcionaram o desenvolvimento de cianobactérias, exceto o tratamento P. Experimentos têm demonstrado que a adição nitrogênio e fósforo simultaneamente gera o aumento da biomassa fitoplanctônica (Järvinen *et al.*, 1999; Havens *et al.*, 1999; Kress *et al.*, 2005), mas também tem sido verificado que a dominância de cianobactérias frente às clorofíceas, por exemplo, só ocorre após semanas da adição de nutrientes ter sido realizada (Kang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). Kang *et al.*, (2012) verificaram a dominância de cianobactérias após 4 semanas do início do experimento de

enriquecimento, pois neste período a maior turbidez da água passou a favorecer espécies de cianobactérias com aerótopos.

Desta forma, o presente experimento evidenciou que a entrada no reservatório de nitrogênio, fósforo e ferro simultaneamente, ou nitrogênio e ferro isoladamente, não propiciariam a dominância de cianobactérias. Entretanto, a entrada de fósforo pode ser considerada preocupante, visto que pode favorecer o crescimento de espécies de cianobactérias com sistemas eficientes de captação deste nutriente (a exemplo de *D. solitarium*) e capazes de fixar N₂ quando sua concentração for limitante para o crescimento dos demais grupos fitoplanctônicos, podendo assim comprometer a qualidade da água do reservatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDY, W.; CUKETT, C.; JENSEN, K., 1993. Phosphorus removal from natural waters using controlled algal production. Rest. Ecology, 1: 29–39.

BUMA A. G. J.; DE BAAR, H. J. W.; NOLTING R. F.; VAN BENNEKOM, A. J., 1991. Metal enrichment experiments in the Weddell-Scotia Seas: effects of Fe and Mn on various plankton communities. Limnology and Oceanography, 36, 1865-1877.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA, 937p.

ANDERSON, D.M.; GILBERT, P.M.; BURTHOLDER, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. Estuaries, 25: 704–726.

BIOLO, S.; SIQUEIRA, N. S.; BUENO, N. C., 2009. Chlorococcales (Chlorophyceae) de um tributário do Reservatório de Itaipu, Paraná, Brasil. Hoehnea, 36(4): 667-678.

BONECKER, C. C.; AZEVEDO, F.; SIMÕES, N. R., 2011. Zooplankton body-size structure and biomass in tropical floodplain lakes: relationship with planktivorous fishes. Acta Limnologica Brasiliensia, 23(3): 217-228.

BONILLA, A. L. C. Balanço de nitrogênio em microbacias pareadas (floresta vs. pastagem) no Estado de Rondônia. 2005. Dissertação. Universidade de São Paulo. 87p.

BOYD, P. W., JICKELLS, T., LAW, C. S., BLAIN, S., BOYLE, E. A., BUESSELER, K. O., COALE, K. H., CULLEN, J. J., DE BAAR, H. J. W., FOLLOWS, M., HARVEY, M., LANCELOT, C., LEVASSEUR, M., OWENS, N. P. J., POLLARD, R., RIVKIN, R. B., SARMIENTO, J., SCHOEMANN, V., SMETACEK, V., TAKEDA, S., TSUDA, A., TURNER, S., WATSON, A. J., 2007. Mesoscale iron enrichment experiments 1993–2005: synthesis and future directions. Science 315, 612–617.

BRUCE, L. C.; HAMILTON, D.; IMBERGER, J. O.; GAL, G.; GOPHEN, M.; ZOHARY, T.; HAMBRIGHT, K. D., 2006. A numerical simulation of the role of zooplankton in C, N and P cycling in Lake Kinneret, Israel. Ecological Modelling, 193: 412–436.

BUESSELER, K., 2012. The great iron dump. Nature, 487: 305-306.

CAMPOS, M. L.; PIERANGELI, M. A. P.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; CURI, N., 2003. Baseline concentrations of heavy metals in Brazilian Latosols. Communications in Soil Science Plant Analysis, 34(3e&): 547-557.

CARPENTER, S. R., 2008. Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(32): 11039–11040.

CARTER, C.M.; ROSSA, A.H.; SCHIELB, D.R.; HOWARD-WILLIAMS, C.

- HAYDENA, B., 2005. In situ microcosm experiments on the influence of nitrate and light on phytoplankton community composition. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 326: 1–13.
- CODD, G., 2000. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. Ecological Engineering, 16: 51-60.
- COESEL, P. F. M. 1982. Structural characteristics and adaptations of desmids communities. Journal of Ecology 70:163-177.
- COESEL, P. F. M., 1996. Biogeography of desmids. Hydrobiologia, 336: 41-53.
- CROSSET, L. O.; BICUDO, C. E., 2005. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. Hydrobiologia, 541: 71-85.
- DAI, R.; LIU, H.; QU, J.; ZHAO, X.; RU, J.; HOU, Y., 2008. Relationship of energy charge and toxin limited *Microcysts aeruginosa* in nitrogen limited or phosphorous-limited cultures. Toxicon, 51: 649-658.
- DE BAAR H. J. W.; BUMA, A. G. J.; NOLTING, R. F., CADE, G. C.; JACQUES, G.; TREGUER, P. J., 1990. On iron limitation of the Southern Ocean: experimental observations in the Weddell and Scotia Seas, Marine Ecology Progress Series, 65, 105-122.
- DELAZARIA-BARROSO, A., 2007. Fatores controladores do desenvolvimento do fitoplâncton em um reservatório de abastecimento público no Espírito Santo, com ênfase em cianobactérias. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 112p.
- DOMINGUES, R. B.; ANSELMO, T. P.; BARBOSA, A. B.; SOMMER, U.; GALVÃO, H. M., 2011. Light as a driver of phytoplankton growth and production in the freshwater tidal zone of a turbid estuary. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 91: 526-535.
- ELKE, D.; CALUDIA, W., 2006. Cyanobacterial toxins occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. Mol. Nutr. Food Research, 50: 7-17.
- GILBERT, J. J., 1988. Suppression of rotifer populations by *Daphnia*: A review of the evidence, the mechanisms, and the effects on zooplankton community structure. Limnology Oceanography, 33(6): 1286-1303.
- GLIWICZ, Z., 1969. Share of algae, bacteria and trypton in the food of the pelagic zooplankton of lakes with various trophic characteristics. Bulletin Academia Polonia Sciences, 17: 159-165.
- GOLDEN, J. W.; HO-SUNG, Y., 1998. Heterocyst Pattern Formation Controlled by a Diffusible Peptide. Science, 282(5390): 935-938.

GOMES, A. M. A., 2005. Impacto da atividade de piscicultura intensiva e da adição de nutrientes inorgânicos (N e P) na qualidade da água do reservatório de Ribeirão das Lajes – RJ. Dissertação.. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 92p.

GONZÁLES, E.J., 2000. Nutrient enrichment and zooplankton effects on the phytoplankton community in microcosms from El Andino reservoir (Venezuela). Hydrobiologia,434: 81–96.

GRAGNANI, A.; SCHEFFER, M.; RINALDI, S. 1999. Top-down control of cyanobacteria: a theoretical analysis. American Naturalist, 153:59-72.

GUILDFORD, S. J.; BOOTSMA, H. A.; FEE, E. J.; HECKY, R. E.; PATTERSON, G., 2000. Phytoplankton nutrient status and mean water column irradiance in Lakes Malawi and Superior. Aquatic Ecosystem Health and Management, 3: 35-45.

HAVENS, K. E.; EAST, T. L.; HWANG, S-J.; RODUSKY, A. J.; SHARFSTEIN, B.; STEINMAN, A. D., 1999. Algal responses to experimental nutrient addition in the littoral community of a subtropical lake. Freshwater Biology, 42: 329-344.

HAVENS, K. E.; THOMAS-JAMES, R.; EAST, T.L.; SMITH, V. H., 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. Environmental Pollution, 122: 379–390.

HECKY, R.E.; CAMPBELL, P.; HENDZEL, L.L., 1993. The stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in particulate matter of lakes and oceans. Limnology and Oceanography,38: 709–724.

HEIN, M.; RIEMANN, B., 1995. Nutrient limitation of phytoplankton biomass or growth rate: an experimental approach using marine enclosures. Journal Experimental Marine Biology and Ecology, 188: 167-180.

HILLEBRAND, H.; DÜRSELEN, C. D.; KIRSCHTEL, D.; POLLINGHER, D.; ZOHARY, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal Phycology, 35: 403–424.

HOWARTH, R. W., 2008. Coastal nitrogen pollution: a review of sources and trends globally and regionally. Harmful Algae, 8: 14–20.

HUSMAN, J.; SNOEP, J. L.; MUR, L. R. 1997. Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. Fems Microbiology Ecology, 24 (3) 259-267.

JÄRVINEN, M.; SALONEN, K.; SARVALA, J.; VUORIO, K.; VIRTANEN, A., 1999. The stoichiometry of particulate nutrients in Lake Tanganyika – implications for nutrient limitation of phytoplankton. Hydrobiologia,407: 81–88.

KANG, Y.; SONG, X.; ZHENGWEN, L., 2012. Sediment resuspension dampens the effect of

nutrient inputs on the phytoplankton community: a mesocosms experiment study. Hydrobiologia. *In press*.

KOSTEN, S.; HUSZAR, V. L. M.; MAZZEO, N.; SCHEFFER, M.; STERNBERG, L. S. L. JEPPESEN, E., 2009. Lake and watershed characteristics rather than climate influence nutrient limitation in shallow lakes. Ecological Applications, 7: 1791-1804.

KRESS, N.; THINGSTAD, T. F.; PITTA, P.; PSARRA, S.; TANAKA, T.; ZOHARY, T.; GROOM, S.; HERUT, B.; MANTOURA, R. F. C.; POLYCHRONAKI, T.; RASSOULZADEGAN, F.; SPYRES, G., 2005. Effect of P and N addition to oligotrophic Eastern Mediterranean waters influenced by near-shore waters: A microcosm experiment. Deep-Sea Research II 52: 3054–3073.

LARATO, C.; CELUSSI, M., VIRGILIO, D.; KARUZA, A.; FALCONI, C.; DE VITTOR, C.; DEL NEGRO, P.; UMANI, S. F., 2010. Production and utilization of organic matter in different P-availability conditions: A mesocosmos experiment in the North Adriatic Sea. Journal of Experimental Marine Biology, 391: 131-142.

LAZZARO, X., 1997. Do the trophic cascade hypothesis and classical biomanipulation approaches apply to tropical lakes and reservoirs? Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie, 26: 719–730.

LI, Y.; WAITE, A. M.; GAL, G.; HIPSEY, M. R., 2012. An analysis of the relationship between phytoplankton internal stoichiometry and water column N:P ratios in a dynamic lake environment. Ecological Modelling, *In press*.

LIKENS, G.E., 1972. In: Nutrients and Eutrophication Americ. Soc. Limnol. Oceanogr. Special Symp. 1.

LIU, L.; LIU, D.; JOHNSON, D.M.; YI, Z.; HUANG, Y., 2012. Effects of vertical mixing on phytoplankton blooms in Xiangxi Bay of Three Gorges Reservoir: Implications for management. Water Research, 46: 2121-2130.

LOPES, M. R. M.; BICUDO, C. E. M., 2003. Desmidióflora de um Lago da Planície de Inundação do Rio Acre, Estado do Amazonas, Brasil. Acta mazonica, 33 (2): 167-212.

LUND, J. W. G.; KIPLINGNG, C.; L E CREN, E.D., 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimating by counting. Hydrobiologia, 11: 143-170.

MACEDO, C. F.; PINTO-COELHO, R. M. 2000. Efeito das algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadriculata* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*. Acta Scientiarum, 22: 397-401.

MADRUGA, F. V.; REIS, F. A. G.; MEDEIROS, G. A.; GIRDANO, L. C., 2008. Avaliação da influência do córrego dos macacos na qualidade da água do rio Mogi Guaçu, no município

de Mogi Guaçu – SP. Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia, 5 (2): 152-168.

MARGALEF, R., 1983. Limnología. Ediciones Omega, Barcelona, 1010p.

MARTIN, J. H., 1990. Glacial–interglacial CO₂ change: their on hypothesis. Paleoceanography, 5: 1–11.

MARTIN, J.H.; COALE, K.H.; JOHNSON, K.S.; FITZWATER, S.E.; GORDON, R.M.; TANNER, S.J.; HUNTER, C.N.; ELROD, V.A.; NOWICKI, J.L.; COLEY, T.L.; BARBER, R.T.; LINDLEY, S.; WATSON, A.J.; VANSKOY, K.; LAW, C.S.; LIDDICOAT, M.I.; LING, R.; STANTON, T.; STOCKEL, J.; COLLINS, C.; ANDERSON, A.; BIDIGARE, R.; ONDRUSEK, M.; LATASA, M.; MILLERO, F.J.; LEE, K.; YAO, W.; ZHANG, J.Z.; FRIEDERICH, G.; SAKAMOTO, C.; CHAVEZ, F.; BUCK, K.; KOLBER, Z.; GREENE, R.; FALKOWSKI, P.; CHISHOLM, S.W.; HOGE, F.; SWIFT, R.; YUNGEL, J.; TURNER, S.; NIGHTINGALE, P.; HATTON, A.; LISS, P.; TINDALE, N.W., 2004. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. Nature, 371: 123–129.

MARTINS, M. L. N. VON SPERLING, E., 1997. Dinâmica do Ferro e do Manganês no Hipolimnion do Reservatório Serra Azul em Minas Gerais. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Foz do Iguaçu.

MATEO, P.; DOUTERELO, I.; BERRENDRO, E.; PERONA, E., 2006. Physiological differences between two species of cyanobacteria in relation to phosphorous limitation. Journal Phycology, 42:61–66.

McQUEEN, D. J. 1970. Grazing rates and food selection in *Diaptomus oregonensis* (Copepoda) from Marion Lake. Journal Fish Research, 27: 13-20.

MENEZES, J. M.; PRADO, R. B.; JÚNIOR, G. C. S.; MANSUR, K. L.; OVEIRA, E. S., 2009. Qualidade da Água e sua Relação Espacial com as Fontes de Contaminação Antrópicas e Naturais: Bacia Hidrográfica do Rio São Domingos – Rj. Eng. Agrícola, 29(4): 687-698.

MORRIS, D. P.; LEWIS, W. M., 1988. Phytoplankton nutrient limitation in Colorado mountain lakes. Freshwater Biology, 20: 315-327.

MORTATTI, J.; VICTORIA, R. L.; TARDY, Y., 1997. Balanço de Alteração e Erosão Química na Bacia Amazônica. Geochimica Brasiliensis, 11(1): 1-13.

NASCIMENTO, E. L., 2006. Concentração de Mercúrio no Plâncton e Fatores Ecológicos do Reservatório da U.H.E-Samuel-Amazonia ocidental (Rondônia/Brasil). Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente-Universidade Federal de Rondônia. 122p.

NEWBOLD, J. D.; EL WOOD, J. W.; O'NEILL, R. V.; VAN WINKLE W., 1981. Measuring nutrient spiraling in streams. Canadian Journal Fish Aquatic Science, 38:860–863.

- NOBEL, W. T.; HUISMAN, J.; SNOEP, J. L.; MUR, L. R., 1997. Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. FEMS Microbiology Ecology, 24(3): 259-267.
- NORTH, R.L.; GUILDFORD, S.J.; SMITH, R.E.H., 2007. Evidence for phosphorus, nitrogen, and iron colimitation of phytoplankton communities in Lake Erie. Limnology and Oceanography, 52: 315–328.
- O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; GOBLER, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. Harmful Algae, 14: 313–334.
- PAERL, H. W.; XU, H.; MCCARTHY, M. J.; ZHU, G.; QIN, B.; LI, Y.; GARDNER, W. S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. Water Research, 45: 1973-1983.
- PEDROSA, P.; SOUZA, M. M.; REZENDE, C. E., 2007. Linking major nutrients (C, H, N, and P) to trace metals (Fe, Mn, and Cu) in lake seston in southern Brazil. Limnology, 8:233–242.
- PETROU, K.; HASSLER, C. S.; DOBLIN, M. A.; SHELLY, K.; SHOEMANN, V.; VAN DEN ENDEN, R.; WRIGHT, S.; RALPH, P. J., 2011. Iron limitation and high stress on phytoplankton populations from the Australian Sub-Antarct Zone (SAZ). Deep-Sea Research, 58: 2200-2211.
- PIEHLER, M. F.; TWOMEY, L. J.; HALL, N. S.; PAERL, H. W., 2004. Impacts of inorganic nutrient enrichment on phytoplankton community structure and function in Pamlico Sound, NC, USA. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 61: 197-209.
- PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E.; MULBRY, W., 2002. Nitrogen and phosphorus removal rates using small algal turfs grown with dairy manure. Journal Apply Phycology, 14:469–473.
- RAI, A.K.; SHARMA, N. K., 2006. Phosphate metabolism in the cyanobacterium *Anabaena doliolum* under salt stress. Curr Microbiol, 52:6–12.
- RAI, A. K, SHARMA, N. K., 2006. Phosphate metabolism in the cyanobacterium *Anabaena doliolum* under salt stress. Current Microbiology, 52:6–12
- REAY, D. S.; PRIDDLE, J.; NEDWELL, D. B.; WHITEHOUSE, M. J.; ELLIS-EVANS, J. C.; DEUBERT, C.; CONNELLY, D.P., 2001. Regulation by low temperature of phytoplankton growth and nutrient uptake in the Southern Ocean. Marine Ecology Progress Series, 219: 51–64.
- REYNOLDS, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, 550p.

SCHINDLER, D. W., HECKY, R. E., FINDLAY, D. L., STANTON, M. P., PARKER, B. R., PATERSON M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37 year whole ecosystem experiment. Proc Nat Acad Sci USA, 105:11254–8.

SCHINDLER, D.W., 1977. The evolution of phosphorus limitation in lakes. Science, 195: 260–262.

SCHINDLER, D.W.; HECKY, R.E.; FINDLAY, D.L.; STANTON, M.P.; PARKER, B.R.; PATERSON, M.J.; BEATY, K.G.; LYNG, M.; KASIAN, S.E.M., 2008. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (32): 11254–11258.

SCHLÜTER, L., 2008. The influence of nutrient addition on growth rates of phytoplankton groups, and microzooplankton grazing rates in a mesocosm experiment. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 228: 53–71.

SCINTO, L. J.; REDDY, K. R., 2003. Biotic and abiotic uptake of phosphorus by periphyton in a subtropical freshwater wetland. Aquatic Botanic, 77:203–222.

SMITH, V. H., 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science, 221: 669–671.

SMITH, V. H., 1990. Nitrogen, phosphorus, and nitrogen fixation in lacustrine and estuarine ecosystems. Limnology and Oceanography, 35:1852-1859.

SMITH, V.H., 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue-green algae in lake phytoplankton. Science 221, 669–671.

SMITH, V.H., BENNETT, S.J., 1999. Nitrogen:phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. Archiv für Hydrobiologie 146, 37–53.

TIJDENS, M.; VAN DE WAAL, D. B.; SLOVACKOVA, H.; HOOGVELD, H. L.; GONS, H. J., 2008. Estimates of bacterial and phytoplankton mortality caused by viral lysis and microzooplankton grazing in a shallow eutrophic lake. Freshwater Biology, 53: 1126–1141.

TILAMN, D. 1982. Resource competition and community structure. Monogrf. Pop. Bio. V. 17. Princeton University Press, 296.

TIMMERMANS, K. R.; WAGT, B. V. D.; VELDHUIS, M. J. W.; MAATMAN, A.; DE BAAR, H. J. W., 2005. Physiological responses of three species of marine picophytoplankton to ammonium, phosphate, iron and light limitation. Journal of Sea Research, 53: 109–120.

TRIPATHI, K.; SHARMA, N. K.; RAI, V.; RAI, A. K., 2012. Low cellular P-quota and poor metabolic adaptations of the freshwater cyanobacterium *Anabaena fertilissima* Rao during Pi-

limitationa. Hydrobiologia, *In press*.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. 2008. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos, 632 p.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T., 1990. Limnology and eutrophication of Barra Bonita reservoir, São Paulo State, Southern Brazil. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 33: 661-676.

UHELINGER, V., 1964. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Archives des Sciences, 17: 121-123.

UTERMÖHL, H., 1958. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton - methodik. Mitt. int. ver. Limnol.,9: 1-38.

VUORIO, K.; T, LAGUS, A.; NNIKA LEHTIMAKI, J.M.; SUOMELA, J.; HELMINEN, H., 2005. Phytoplankton community responses to nutrient and iron enrichment under different nitrogen to phosphorus ratios in the northern Baltic Sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 322: 39–52.

WANG, X.; QIN, B.; GAO, G.; LIU, X., 2011. Experimental Simulation of Microcystis Bloom Formation from Natural Phytoplankton Communities. Procedia Environmental Sciences, 10: 1534 – 1539.

WETZEL, R.G., 1993. *Limnologia*. Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisboa, 905p.

WOLFE, J. E.; LIND, O. T., 2010. Phosphorus uptake and turnover by periphyton in the presence of suspended clays. Limnology, 11:31–37.

WOLFINGBARGER, W. C. 1999. Influences of biotic and abiotic factors on seasonal succession of zooplankton in Hugo reservoir, Oklahoma, U.S.A. Hydrobiologia, 400:13-31.

XU, H., PAERL, H. W., QIN, B. Q., ZHU, G. W., GAO, G., 2010. Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake Taihu, China. Limnology and Oceanography 55, 420-432.

ZOEAMENTO SÓCIO-ECONÔMICO ECOLÓGICO DE RONDÔNIA-ZSEE-RO. (2002). Governo do Estado de Rondônia, Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral (SEPLAN/RO). 2ª Aproximação do Zoneamento Sócio-Econômico e Ecológico de Rondônia.

ZOHARY, T.; HERUTB, B.; KROMC, M. D.; FAUZI, R. C.; MANTOURAD, P. P.; PSARRAE, S.; RASSOULZADEGANF, F.; STAMBLERG, N.; TANAKAF, T.; THINGSTADH, T. F.; WOODWARDI, S. M., 2005. P-limited bacteria but N and P co-limited phytoplankton in the Eastern Mediterranean: a microcosm experiment. Deep-Sea Research II, 52: 3011–3023.

ZOU, Y.; JIANG, M.; YU, X.; LU, X.; JOHN L.; DAVID, H., 2011. Distribution and biological cycle of iron in freshwater peatlands of Sanjiang Plain, Northeast China. Geoderma, 164: 238–248.

CAPÍTULO III

Influência do ferro em alguns parâmetros fisiológicos e na síntese de microcistina por uma linhagem de *Microcystis panniformes*(MIRS-4) isolada do reservatório da Usina Hidrelétrica de Samuel.

INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial para o crescimento fitoplanctônico, por ser este micronutriente constituinte enzimático de diversas vias metabólicas, tais como no processo fotossintético, na fixação do nitrogênio e na síntese de clorofila (Kudo *et al.*, 2000; Ferreira & Straus, 1994; Kasakowska, 2004). O conteúdo de ferro nas células fitoplanctônicas varia de 0,03-0,1% na biomassa seca (Reynolds, 2006).

Assim como os demais nutrientes utilizados pelo fitoplâncton, a exemplo do P e N, o ferro para ser absorvido deve encontrar-se em sua forma dissolvida: ferro ferroso (Fe^{2+}) ou ferro férrico (Fe^{3+}). Entretanto o Fe^{2+} tende a ser mais solúvel que o Fe^{3+} , o que o torna a forma de ferro mais preferencialmente assimilável pelo fitoplâncton. O ferro ferroso ocorre principalmente como Fe^{2+} hidratado e íons hidróxidos hidratados, de forma que sua solubilidade é em parte determinada pela solubilidade dos compostos ferrosos, como hidróxido de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), carbonato de ferro (FeCO_3) e sulfeto de ferro (FeS). Em águas naturais oxigenadas, que frequentemente apresentam pH entre 5,0-8,0 e potencial de oxirredução (Eh) entre 0,3-0,5mV, cerca de dois terços do Fe^{2+} são compostos pelo $\text{Fe}(\text{OH})_3$, insolúvel nestas condições e tendem a precipitar, enquanto a fração solúvel pode ser detectada em apenas um terço desta (Wetzel, 1993; Martins & Von Sperling, 1997; Reynolds, 2006).

Porém, é válido ressaltar que apesar das frações superficiais dos corpos d' água naturais tenderem a ter baixa biodisponibilidade de ferro, visto que é a região mais oxigenada, esta, de uma forma geral também é a porção de maior desenvolvimento fitoplanctônico e, como colocado por Reynolds (2006), as concentrações de ferro dissolvido normalmente encontradas são capazes de suprir as necessidades das células fitoplanctônicas.

No ambiente aquático natural, as substâncias húmicas e fúlvicas oriundas da decomposição da matéria orgânica, atuam como um quelante natural de substâncias metálicas, formando complexos estáveis com cátions polivalentes (Fe^{2+} e outros), contribuindo para a

biodisponibilidade de micronutrientes (Rocha & Rosa, 2003). Estas substâncias certamente têm grande contribuição na biodisponibilidade do ferro necessário para o fitoplâncton. Nos meios de cultura utilizados para a manutenção de cepas fitoplactônicas em laboratório, o agente quelante frequentemente utilizado é o ácido etilenodiaminotetracético/EDTA, responsável então pela manutenção das fontes de ferro e outros micronutrientes no meio (Reynolds, 2006).

Em decorrência do papel do ferro no metabolismo fitoplanctônico ser pouco conhecido (Reynolds, 2006; Nagai *et al.*, 2007), é crescente o número de estudos que abordam temas como efeitos da limitação sobre o crescimento e síntese de clorofila *a* (Amé & Wunderlin, 2005; Nagai *et al.*, 2007, Xing *et al.*, 2007) e também o papel deste elemento em outras vias metabólicas, como a síntese de microcistinas (Lukac & Aegerter, 1993; Utkilen & Gjølme, 1995; Lyck *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 2001; Naito *et al.*, 2006, Sevilla, *et al.*, 2008; Alexova *et al.*, 2011).

Com relação à síntese de microcistina, os resultados encontrados por diferentes autores ainda são contraditórios. Utkilen & Gjome (1995) submeteram uma linhagem de *Microcystis aeruginosa* a meios de cultura contendo baixa ($17 \mu\text{g.L}^{-1}$) e alta ($560\mu\text{g.L}^{-1}$) concentração de ferro, e verificaram uma concentração de microcistina 43% maior na cultura exposta a $560\mu\text{g.L}^{-1}$. Entretanto, Lukac & Aegerter (1996) ao submeterem uma linhagem de *Microcystis aeruginosa* a baixa ($84\mu\text{g.L}^{-1}$) e alta ($560\mu\text{g.L}^{-1}$) concentração de ferro, verificaram uma concentração de microcistina 73% maior na cultura exposta a $84\mu\text{g.L}^{-1}$.

No estudo de campo que deu origem ao capítulo I desta tese, o ferro dissolvido foi uma variável que teve uma contribuição importante para os padrões fitoplanctônicos encontrados. *Microcystis panniformis* apresentou maiores densidades nos meses em que foram encontradas concentrações de ferro dissolvido mais baixas (média de $23 \mu\text{g.L}^{-1}$ na Zeu). No entanto, apesar da baixa correlação, verificou-se uma tendência das maiores concentrações de microcistina na água bruta serem obtidas nos meses que aprearam concentrações de ferro mais elevadas (acima de $150 \mu\text{g.L}^{-1}$).

No intuito de compreender qual o papel deste micronutriente em alguns aspectos fisiológicos de uma cepa de *M. panniformis* isolada do reservatório de Samuel, e contribuir para o entendimento da relação do ferro com a síntese de microcistina, foi elaborado e executado o estudo deste terceiro capítulo da tese.

Nesta parte do trabalho nos propusemos a investigar o efeito da disponibilidade de ferro sobre diferentes aspectos fisiológicos de uma cepa de *M. panniformis* isolada do reservatório de Samuel e para tal comparamos três condições de disponibilidade de ferro, 0,

23 e 223 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Tais concentrações foram selecionadas baseadas nas concentrações de ferro dissolvido encontradas na Zeu da estação M1 durante o estudo de campo referente ao capítulo I desta tese. A concentração 223 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (controle) que corresponde ao meio ASM-1 sem alteração, apresenta valor próximo ao maior valor médio de ferro dissolvido obtido na estação M1, que foi de 297,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. O tratamento 23 $\mu\text{g.L}^{-1}$ reflete as menores médias de ferro detectadas na Zeu da estação M1 (22,6; 22,8 e 21 $\mu\text{g.L}^{-1}$). O tratamento 0 foi selecionado em decorrência de a água da estação M1 ter apresentado concentrações abaixo do limite de detecção (20 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e também em decorrência do fato de experimentos pilotos terem demonstrado que a cepa MIIRS-4 apresentou bom desenvolvimento mesmo quando cultivada em meio sem ferro por 7 dias. Este resultado se explica pelo fato de espécies de *Microcystis* serem aptas a estocar ferro (Utklen & Gjølme, 1995; Xing *et al.*, 2007), desta forma desejou-se expor esta cepa a um período maior de ausência de ferro.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo é verificar os efeitos da limitação por ferro sobre o crescimento, concentração de clorofila *a*, conteúdo de microcistina e expressão de genes relacionados ao metabolismo de ferro de uma cepa de *Microcystis panniformis* isolada do reservatório da U.H.E. – Samuel.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e cultivo da cepa de *Microcystis panniformis* (MIRS-4):

A cepa tóxica de *Microcystis panniformis*, produtora de microcistina e codificada como MIRS-4, foi isolada de amostras de fitoplâncton coletadas na superfície da água da estação M1 do reservatório de Samuel, no mês de julho de 2010. O isolamento se deu através do crescimento de colônias de *M. panniformis* em placas *petri* contendo meio ASM-1 solidificado com agar 1%. Após o seu isolamento, a cepa vem sendo mantida em meio de cultura ASM-1 líquido, pH 8,0 (Gorham, 1964), em cultura não axênica, e sob fotoperíodo de 12h, condições controladas de intensidade luminosa ($60\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura ambiente de $24\pm 1^\circ\text{C}$ na sala de cultivo de microalgas do laboratório de Biogeoquímica Ambiental/UNIR e do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias/UFRJ.

Preparo do inóculo da cepa MIRS-4

O inóculo da cepa MIRS-4, utilizado no experimento descrito a seguir, foi mantido em meio ASM-1 sem alteração na composição dos nutrientes, fotoperíodo de 12h e intensidade luminosa igual a $160 \mu\text{mol.fótons.m}^2.\text{s}^{-1}$ até ser atingida a fase exponencial de crescimento ($6,0 \times 10^6$ células/mL no momento da amostragem).

Em seguida, o inóculo foi centrifugado a 6.000 rpm por 20 minutos, 4°C (Centrífuga Hitachi, CR 22GIII). Para a retirada do excesso de meio ASM-1. Após a centrifugação, foi adicionado ao precipitado de células (pellet) 150 mL de meio ASM-1 preparado sem adição de ferro. Após homogeneização do pellet neste meio, o inóculo foi novamente centrifugado a 6.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última “lavagem”, o pellet foi ressuspensão em 1.600 mL de ASM-1 sem ferro. O inóculo foi mantido neste meio de cultivo durante sete dias (pré-adaptação). Este procedimento foi realizado com o objetivo de exaurir as reservas de ferro intracelulares e assim melhor evidenciar os aspectos fisiológicos estudados, como realizado em outros estudos (Utklen & Gjolme, 1995; Xing *et al.*, 2007).

Montagem do experimento

Após a pré-adaptação, o volume do inóculo foi fracionado em três partes. Cada parte foi centrifugada a 6.000 rpm por 20 minutos, a 4°C e ressuspensa em meio ASM-1, modificado, propiciando assim três condições: Controle, com a concentração de ferro usualmente presente no meio ASM-1 ($223 \mu\text{g.L}^{-1}$) e respectivos tratamentos, com redução de dez vezes na concentração de Fe presente no controle ($23 \mu\text{g.L}^{-1}$) e condição com total ausência de Fe dissolvido ($0,0 \mu\text{g.L}^{-1}$). Para o preparo das soluções contendo ferro, utilizou-se o reagente Cloreto Férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$). O inóculo de cada condição foi ressuspensão em um volume de 2L, atingindo uma densidade celular de $5,0 \times 10^5$ células. ml^{-1} . O experimento foi conduzido em triplicata e teve a duração de 8 dias.

Parâmetros fisiológicos analisados

A cada 2 dias, iniciando-se no dia da montagem do experimento, foram retiradas alíquotas das culturas para as seguintes análises: densidade celular, quantificação de transcritos de genes de resposta à limitação de ferro e concentrações de: clorofila *a*,

microcistinas, ferro intracelular e extracelular. As metodologias das análises citadas são descritas a seguir:

Densidade celular: as alíquotas (2,0 mL) das culturas destinadas à análise da densidade celular foram fixadas com solução de Lugol 2% (Wetzel & Likens, 1991). A contagem de células foi realizada utilizando-se hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal e microscópio óptico (Olympus, BX 51).

Clorofila *a*: para análise de clorofila *a*, um volume conhecido (entre 4,0-10,0 mL) das culturas foi filtrado manualmente em filtros de borocilicato (13 mm de diâmetro). A extração da clorofila *a* foi realizada pelo método que utiliza acetona 90% descrito em APHA (1998). As absorbâncias (em 664nm, 665nm e 750nm) foram determinadas através de espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) e utilizadas para o cálculo da concentração desse pigmento de acordo com o método citado acima.

Extração para a análise de microcistinas: foram centrifugados 100 mL de cada condição experimental e em seguida essas alíquotas foram liofilizadas (equipamento LABCONCO). A extração das microcistinas das células liofilizadas foi realizada adicionando-se em cada amostra 20,0 mL de M:B:A (20% Metanol: 5% Butanol: 75% Água Milli-Q). Em seguida, as amostras foram colocadas em mesa agitadora (Nova Técnica NT-145) para agitação por 1 hora. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 minutos, a 4°C (Eppendorf 5804 R) e o sobrenadante resultante foi ressuspensionado em 20 mL de M:B:A e reservado. Este procedimento foi realizado mais 2 vezes com as células precipitadas. Ao término do processo de extração, os volumes dos sobrenadantes de cada amostra foram reunidos e cada extrato final foi submetido à evaporação até aproximadamente de 1/3 do volume (fração metanol/butanol) através de fluxo brando de nitrogênio. O volume final resultante (40,0 mL) foi passado em cartucho de extração em fase sólida C18 (marca Phenomenex, Strata-X 33u Polymeric reversed phase 500mg/6mL) para concentração e purificação parcial das microcistinas. Os cartuchos foram previamente ativados passando-se 20,0 mL de metanol 100% e 20,0 mL de água ultra-pura (Milli-Q). Imediatamente a seguir, a amostra foi passada no cartucho que foi em seguida lavada com 20,0 mL de água, 20,0 mL de metanol 20% (sendo essas frações descartadas), e o material retido no cartucho foi eluído com 30,0 mL de metanol/ácido trifluoracético 0,1%. Essa última fração metanólica foi recolhida e

seca (com fluxo brando de nitrogênio) e então ressuspensa em 1,0 mL solução 0,05 M de acetato de amônia em água: acetonitrila/0,1% de ácido fórmico.

Determinação das concentrações de microcistinas: foi realizada através de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent modelo 1200) acoplado a um espectrômetro de massas em modo tandem (Applied Biosystem, 3200 Q-Trap) (LC-MS/MS), e sob as seguintes condições cromatográficas: uso de coluna Kinetex 2.6u C18 100A°; 50x2.1 mm, sendo a fase móvel A composta de 5 mM de acetato de amônia em água + 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B composta de 5mM de acetato de amônia em acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico. O fluxo foi estabelecido em 450µl por minuto e volume de injeção igual a 10µl. As condições da corrida em gradiente estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Condições da cromatografia em gradiente.

Tempo(min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	85	15
2	85	15
6	65	35
10	15	85
15	85	15
18	85	15

Para as análises realizadas no espectrômetro de massas, a ionização das moléculas foi realizada em modo positivo através de fonte de *electrospray* (ESI). Nessa análise foram pesquisadas a presença das variantes de microcistina descritas na tabela 2, onde também estão listados os íons precursores e seus respectivos fragmentos.

Tabela 2. Íons precursores e respectivos fragmentos utilizados na detecção e quantificação de microcistinas por espectrometria de massas.

Analito	Íon precursor	Íon filho ¹	Íon filho ²
Microcistina - LR	995	135	103
Microcistina - RR	519	135	103
Microcistina - LY	1025 ³	135	103
Microcistina - LA	910	135	103
Microcistina - LW	1025	135	103
Microcistina - YR	1045	135	107.1

¹Íon utilizado para a quantificação; ²Íon confirmatório; ³Referente a formação de aduto de Sódio (M+23).

A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de cada uma das variantes de microcistina (padrões obtidos pela Abraxis, EUA) na faixa de 0,5 ng/mL a 40 ng/mL.

Concentrações de ferro intracelular e extracelular

Para a análise de ferro intracelular, um volume de 70,0 mL de cada cultura foi centrifugado (8.000 rpm por 20 minutos a 4°C) e em seguida o precipitado (*pellet* celular) foi liofilizado. De posse do material seco, foi realizada a abertura química para extração do ferro intracelular, que transcorreu adicionando-se 5,0 mL de água régia (HCl:HNO₃ – 3:1) em cada amostra (contida em tubo com tampa rosqueável). Após 60 minutos em temperatura ambiente a amostra foi submetida a aquecimento em banho-maria (60°C) também por 60 minutos e em seguida a temperatura do banho-maria foi elevada a 85°C e a amostra continuou sendo aquecida por mais 60 minutos. Após esse período, a amostra foi filtrada em papel de celulose (JP 40) e teve volume final aferido com água desmineralizada a 15,0 mL.

Para a determinação da concentração de ferro extracelular (fração dissolvida), foram utilizados 50,0 mL do sobrenadante da amostra centrifugada (análise de ferro intracelular). Este volume foi filtrado em filtros de borosilicato de 0,45µm, e em seguida o volume filtrado foi concentrado por liofilização e ressuspenso em 15 mL de HNO₃ 5M.

A determinação da concentração de ferro intracelular e ferro extracelular (dissolvido) foi realizada por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma com Acoplamento Indutivo/ICP-OES (Varian 720 ES), o limite de detecção da técnica é de 10,0 µg.L⁻¹. Exceto a liofilização das amostras, as demais etapas foram realizadas no Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Quantificação de transcritos de genes de resposta à limitação de ferro: a análise foi realizada em alíquota (100,0 mL) coletada após o inoculo ter sido pré-adaptado durante sete dias em ASM-1 em ausência de ferro e em densidade celular de 6,7x10⁶ células/mL. Esta alíquota foi utilizada como condição controle. Após o início do experimento, foram retiradas alíquotas para análise das réplicas 0, 23 e 223µgFe.L⁻¹ no 2º (500,0 mL) e 4º (350,0 mL) dias de experimento. Para a obtenção dos *pellets* celulares as alíquotas retiradas das culturas foram centrifugadas. A análise da quantificação relativa dos transcritos realizada teve o objetivo de testar a expressão de dois genes (*feoB* - Ferrous uptake transporter e *futA* - Ferric uptake ABC transporter). Estes genes codificam sistemas de captação de ferro com alta afinidade, portanto

espera-se que a expressão destes genes aumente quando há limitação de ferro no meio. A metodologia utilizada neste experimento baseou-se naquela descrita por Alexova *et al.*, (2011), como citado a seguir.

Extração de RNA: as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1,0 mL de TRIzol[®] (Invitrogen) para subsequente extração de RNA segundo instruções do fabricante. Uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8%/ TAE 1X, para verificação da integridade. O RNA foi quantificado segundo o valor de DO₂₆₀. (Espectrofotômetro Ultrospec[®] 3000, Pharmacia Biotech). Uma amostra de 2 µg de RNA foi tratada com a enzima DNase RQ1 (Promega), para eliminação de DNA genômico contaminante, segundo instruções do fabricante. O RNA foi precipitado com etanol 100% e acetato de sódio 3 M pH 5,2, lavado com etanol 70%, e ressuspensão em água tratada com DEPC.

Transcrição reversa (síntese de c-DNA): foram usados 1 µg de RNA e 2 pmol/µL de oligonucleotídeos randômicos (*Random Primers* - Promega), em volume final de 12 µL. Os tubos foram incubados a 65°C por 5 minutos e resfriados no gelo. Foram adicionados 4 µl de tampão 5x da transcriptase reversa M-MLV (Promega), 4 µL de dNTPs 2,5 mM em um total de 20 µL. As reações foram incubadas a 37° C por 2 minutos e resfriadas novamente no gelo. Em cada tubo adicionou-se 1 µl de M-MLV (Promega) e as reações foram incubadas segundo instruções do fabricante. O cDNA resultante foi diluído em série (1:10) e testado por amplificação com oligonucleotídeos específicos para o gene endógeno utilizado como controle (*rpoC*) e para os genes alvo (*feoB* e *futA*). Os oligonucleotídeos para amplificação destes genes foram aqueles descritos por Alexova *et al.* (2011).

Quantificação (*Real time PCR*): foram amplificados os genes envolvidos na resposta à disponibilidade de ferro das culturas submetidas à ausência ou pouca disponibilidade de ferro, que correspondem aos tratamentos 0µg.L⁻¹ e 23 µg.L⁻¹ e presença de ferro, correspondente ao controle (223 µg.L⁻¹). Os primers utilizados estão listados na tabela 3.

Em cada poço de uma placa de 96 poços, específica para o aparelho *StepOnePlusTM* (*Applied Biosystems*), foram adicionados: 12,5 µ de *Sybr Green PCR MasterMix* (*Applied Biosystems*), 2 µL de cDNA, 1 µL de uma solução 20 nM de cada oligonucleotídeo do par específico para cada gene em um volume final de 25µL. Como controle negativo foi utilizada água tratada com DEPC ao invés de cDNA. Todas as reações, controle e teste, foram feitas

em triplicata no equipamento *StepOnePlusTM* (*Applied Biosystems*). As placas foram incubadas nas seguintes condições: pré-incubação a 95°C por 10 minutos, amplificação em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, e uma etapa de desnaturação a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e leituras a cada 0,5°C até atingir os 95°C. A eficiência da amplificação de cada conjunto de *primers* foi medida através de curvas padrão de diluições seriadas de cDNA e calculada de acordo com a equação $E=10^{(-1/slope)}$ com intervalo de 90-100% para todos os pares de *primers*. Após verificar que as reações não apresentaram produtos inespecíficos na etapa de desnaturação, foram realizados experimentos com as preparações de cDNA (diluição 1:10) de todas as 3 replicatas biológicas, nas mesmas condições. Os níveis de transcrição foram normalizados pela transcrição de *rpoC* e as quantidades relativas calculadas como descrito por Pfaffl, (2001).

$$\text{Razão} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{Ct alvo (controle-tratado)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct referência (controle-tratado)}}$$

Onde:

E_{alvo} = eficiência de amplificação do par de primers para o gene *feo* ou *fut*

E_{ref} = eficiência de amplificação do par de primers para o gene *rpoC*

$\Delta\text{Ct alvo}$ = diferença entre valores de Ct do gene alvo (*fut* ou *feo*) na condição controle e teste

$\Delta\text{C referência}$ = diferença entre valores de Ct do gene de referência (*rpoC*) na condição controle e teste

Controle = inóculo no tempo 0 oriundo da pré-adaptação ou seja, submetido a sete dias em meio sem ferro

Tratado = condição de culturas mantidas em meio ASM-1 com ferro (223 $\mu\text{g.L}^{-1}$), com baixa disponibilidade de ferro (23 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ou sem ferro

Tabela 3: Primers usados na análise de qRT-PCR.

Nome do primer	Sequencia (5'-3')	Símbolo do gene	Função
rtfutABCF	tgtttggtcgggaaaatta	<i>futA</i>	Transportador ABC de captação de ferro
rtfutABCR	tccaccccagggtaatgata		
feoBF	gattgatgcgtttggtgggat	<i>feoB</i>	Transportador de absorção de ferro
feoBR	ccgccgcaaatagggcataa		
rpoC1F	cctcagcaaggatcaatggt	rpoC1	Subunidade da RNA polimerase
rpoC1R	ccgttttgcccttacttt		

Tratamento Estatístico

Para verificar as diferenças existentes entre as variáveis ambientais avaliadas nos diferentes tratamentos, foi realizada uma análise de variância com medidas repetidas (Repeated-measures ANOVA). As variações com diferenças significativas foram submetidas ao teste de comparação múltipla de Tukey. Para este tratamento estatístico foi utilizado programa SPSS[®] 17.0.

RESULTADOS

O número de células de *M. panniformis* variou ao longo do tempo ($p < 0,05$) (figura 01), A partir do 2º dia de experimento as menores densidades celulares foram observadas no tratamento $0 \mu\text{gFe.L}^{-1}$, seguido do tratamento $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$, enquanto que no controle ($223 \mu\text{gFe.L}^{-1}$), as densidades celulares foram mais elevadas. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle foram observadas no 4º dia de experimento. No 6º e 8º dia, o tratamento $0 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ se diferenciou do tratamento $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ e do controle por cessar seu crescimento, atingindo a fase estacionária.

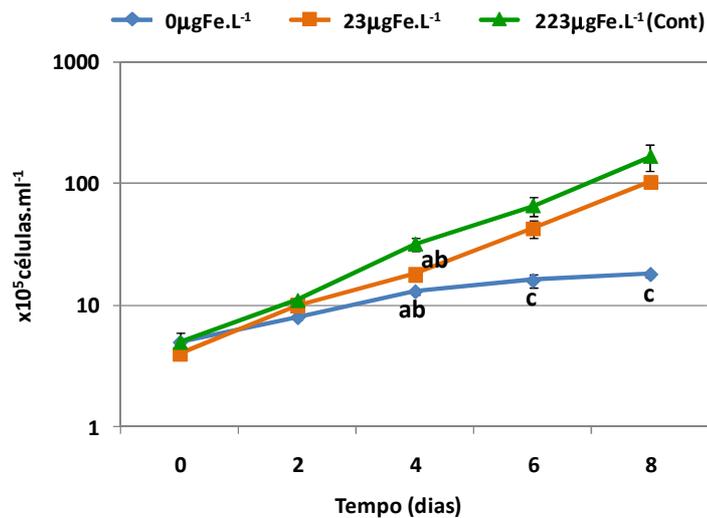


Figura 01: Densidade de células (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 µg.L⁻¹ de ferro. a: indica que o respectivo tratamento é diferente do controle (223 µgFe.L⁻¹); b: indica que os tratamentos são diferentes entre si; c: indica que o tratamento 0 µgFe.L⁻¹ é diferente do tratamento 23 µgFe.L⁻¹ e do controle (223 µgFe.L⁻¹); a ausência de letra significa que não houve diferença entre as condições (n=3).

Com relação aos resultados de clorofila *a* (figura 02, A), foi verificado que a concentração deste pigmento variou ao longo do tempo ($p < 0,05$) em todas as condições. Apenas a partir do 4º dia de experimento o tratamento 0 µgFe.L⁻¹ passou a se diferenciar ($p < 0,05$) do tratamento 23 µgFe.L⁻¹ e do controle. Apesar de no 4º dia de experimento a maior concentração de clorofila *a* ter sido observada na condição com maior concentração de ferro (controle) seguido pelo tratamento 23 µgFe.L⁻¹, devido a desvios padrão elevados, principalmente no 4º e 6º dia de experimento, não foi observada diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Também foi verificado visualmente, que as células do tratamento 0 µgFe.L⁻¹ encontravam-se clorótidas a partir do 4º dia de experimento (figura 2 B), e se mantiveram com tal aspecto até o final do experimento (figura 2 C).

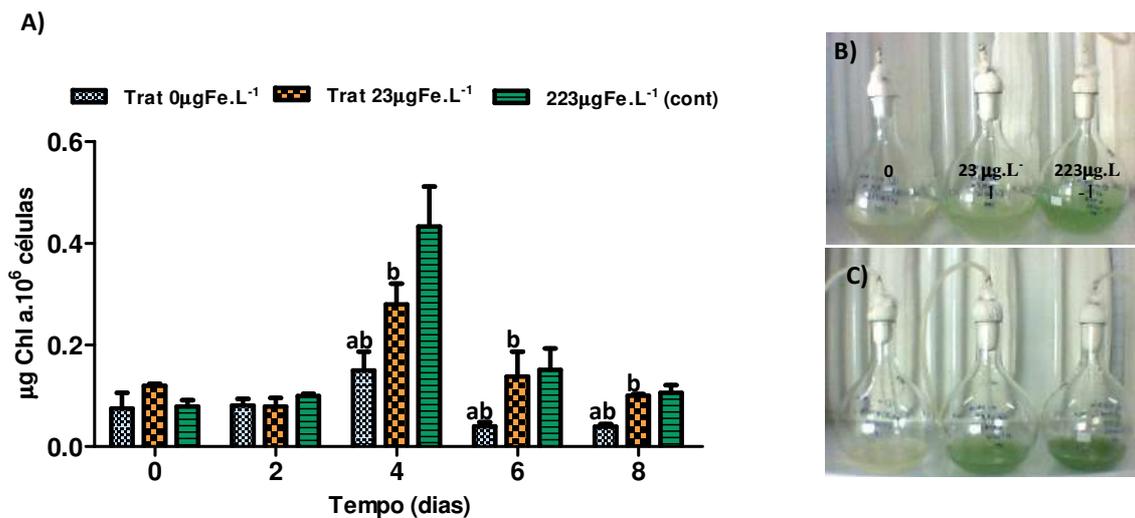


Figura 02:Concentração de clorofila *a* (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe (a) e fotos mostrando os cultivos no 4^o (b) e 8^o dia (c). a: indica que o respectivo tratamento é diferente do controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$), (n=3); b: indica que os tratamentos são diferentes entre si; a ausência de letra significa que não houve diferença entre as condições (n=3).

Dentre as variantes de microcistinas analisadas (LR, RR, LY, LA, LW e YR), foi possível confirmar apenas a produção da variante LR pela linhagem estudada (MIRS-4). As concentrações de microcistina (figura 03) variaram ao longo do tempo ($p < 0,05$) em todas as condições. No 2^o, 4^o e 8^o dias de experimento o tratamento 0 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ apresentou as menores concentrações de microcistina, se diferenciando do controle ($p < 0,05$). Entretanto, apesar de ter sido observada uma tendência das maiores concentrações de microcistina serem encontradas no controle, este não se diferenciou estatisticamente do tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ durante praticamente todo o experimento (exceto 2^o dia).

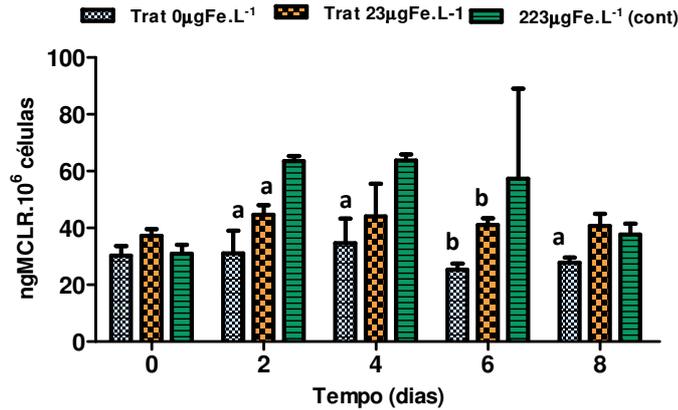


Figura 03:Concentração de microcistina-LR (média e DP) ao longo de 8 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 µgFe.L⁻¹ de Fe. a: indica que o respectivo tratamento é diferente do controle; b: indica que os tratamentos são diferentes entre si); a ausência de letra significa que não houve diferença entre as condições (n=3).

Os dados da concentração de ferro extracelular e intracelular não foram tratados estatisticamente, visto que os mesmos apresentaram em diferentes tempos amostrais concentrações não quantificáveis pela técnica utilizada (<10 µg.L⁻¹). Com relação às concentrações de ferro extracelular (figura 4A), os tratamentos 0 e 23 µgFe.L⁻¹, apresentaram valores abaixo de 10 µg.L⁻¹ desde o dia da montagem (t0) até o último dia de experimento (t8). Na condição controle (223 µgFe.L⁻¹) as concentrações de ferro extracelular foram diminuindo gradativamente, registrando-se no dia da montagem do experimento (t0) 50,6±23,4 µg.L⁻¹, no 2º dia 41,6±4,5 µg.L⁻¹ e 11,2±7,3 no 4º dia, a partir do 6º dia as concentrações estiveram abaixo de 10 µg.L⁻¹.

Quanto às concentrações de ferro intracelular, a análise das células após a pré-adaptação (7 dias em ASM-1 na ausência de Fe) evidenciou uma concentração de ferro <10 µgFe.10⁶células, conseqüentemente no tratamento 0 Fe do início ao fim do experimento as concentrações ferro intracelular estiveram abaixo deste valor (figura 4B). No tratamento 23 µgFe.L⁻¹ apenas no dia da montagem do experimento (t0) foram detectadas concentrações de ferro intracelular, que correspondeu a 17,0±1,0 µgFe.10⁶células, após este dia as concentrações estiveram abaixo do limite de detecção. Já na condição 223 µgFe.L⁻¹ foi

possível determinar as concentrações de ferro intracelular do início (t0) ao término do experimento (t8), como apresentado na figura 4B.

No 1º dia a concentração de ferro intracelular no controle foi de $160,0 \pm 23,0 \mu\text{gFe} \cdot 10^6 \text{células}$, evidenciando uma assimilação rápida do ferro presente no meio de cultura pelas células de *M. panniformes*. No decorrer do experimento as concentrações diminuíram gradativamente, no último dia (t8) a concentração foi igual a $13,0 \pm 0,1$, valor próximo ao limite de detecção.

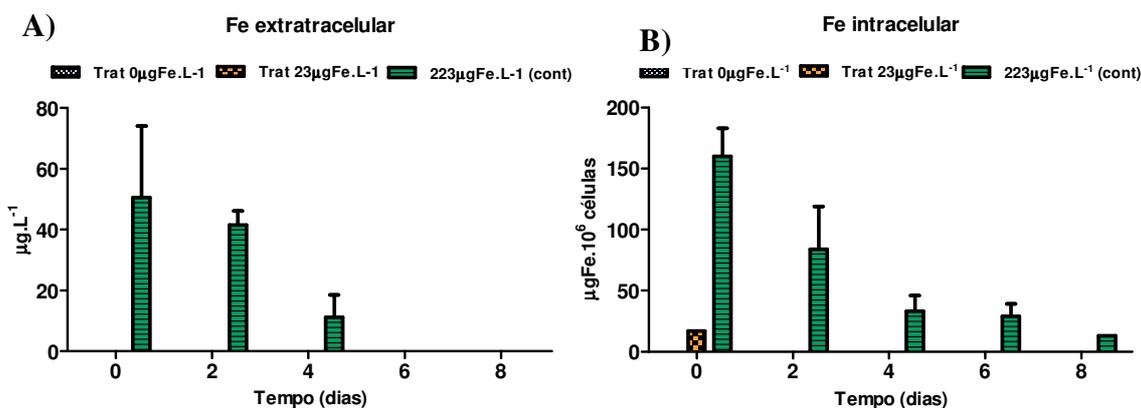


Figura 04: Concentração de ferro intracelular (a) e extracelular (b) ao longo de 8 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou $223 \mu\text{gFe} \cdot \text{L}^{-1}$, $n = 3$.

Os níveis dos transcritos dos genes de resposta à limitação de ferro, *feo* e *fut* são apresentados na figura 5, A e B. A barra em preto no t0 representa a quantificação dos transcritos realizada em células do inoculo após a pré-adaptação (7 dias em ASM-1 na ausência de Fe), utilizada aqui como condição controle neste caso. Tanto para o gene *feo* como para o *fut*, foi possível observar claramente que os níveis mais elevados de ambos os transcritos foram obtidos nos tratamentos 0 Fe e $23 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Fe, e não houve diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). No controle ($223 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) foram obtidos níveis mais baixos de *feo* e *fut*. As alterações relativas de níveis de transcritos do gene *fut* em resposta à disponibilidade de ferro foram mais evidentes do que os dos transcritos do gene *feo*.

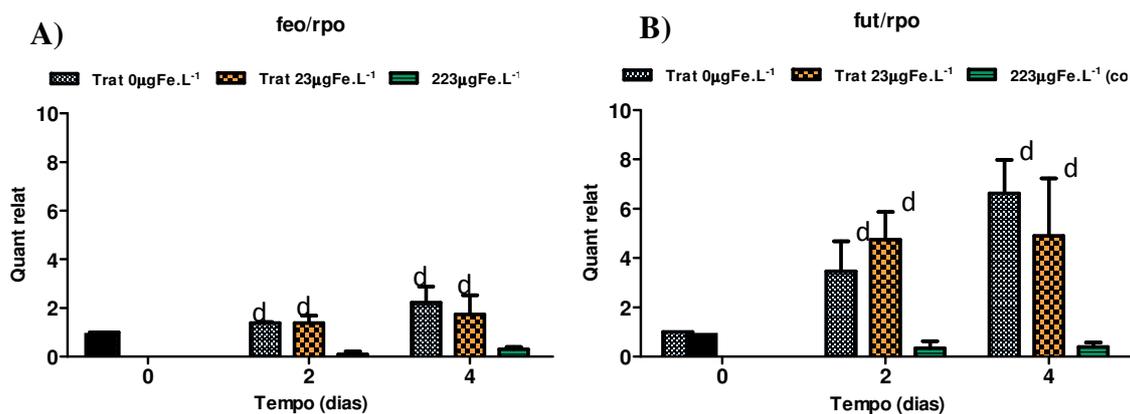


Figura 05: Quantificação relativa dos transcritos dos genes de resposta à limitação de ferro, *feo* (a) e *fut* (b) ao longo de 4 dias de cultivo de *M. panniformis* MIRS-4 em meio ASM-1 com 0, 23 ou 223 µgFe.L⁻¹. d: indica que os tratamentos 0 e 23 µgFe.L⁻¹ são estatisticamente iguais e diferentes do 223 µgFe.L⁻¹.

DISCUSSÃO

Nesta parte do trabalho nos propusemos a investigar o efeito da disponibilidade de ferro sobre diferentes aspectos fisiológicos de uma cepa de *M. panniformis* isolada do reservatório de Samuel, para tal comparamos três condições de disponibilidade de ferro, 0, 23 µg.L⁻¹ e 223 µg.L⁻¹ com base em valores observados no ambiente original.

Com relação aos dados de densidade celular obtidos, foi observada diferença estatística a partir do 4º dia de experimento, quando os tratamentos 0 e 23 µgFe.L⁻¹ foram diferentes entre si e diferentes do controle, com a menor densidade celular no tratamento 0 Fe seguida do tratamento 23 Fe e do controle. No 6º dia de experimento o tratamento 0 µgFe.L⁻¹ apresentou uma densidade celular 76% menor que o controle e no 8º dia, 90% menor. Outros trabalhos também apresentaram menores densidades celulares em experimentos em que o ferro foi omitido do meio de cultura. Webb *et al.*, (2001) ao submeterem a espécie *Synechococcus* sp em meio sem ferro (sem pré-adaptação prévia do inóculo neste meio), verificaram que no 4º dia de experimento a densidade celular foi aproximadamente 75% menor quando comparada a cultura submetida a 1.120 µgFe.L⁻¹.

Em experimento semelhante, Li *et al.*, (2009) submeteram uma cepa de *M. novacekii* durante 20 dias a diferentes concentrações de ferro, que corresponderam a 0, 14, 28 e 280 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$. Estes autores também não realizaram a pré-adaptação do inóculo em meio sem ferro. No 10º dia de experimento, a densidade celular dos tratamentos 0, 14 e 28 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ foram próximas, já o tratamento 280 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ apresentou densidade celular 60% maior. No 15º dia, foi observada uma tendência de maiores densidades celulares em paralelo as maiores concentrações de ferro. Neste tempo amostral o tratamento 280 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ apresentou densidade 71% maior em relação ao tratamento 0 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$. No presente trabalho, no 6º e 8º dia de experimento as densidade celulares do tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ e do controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$) foram próximas, desta forma, podemos concluir que por um período de 8 dias, a presença de 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ é suficiente para o crescimento celular da linhagem de *M. panniformes* isolada do reservatório de Samuel.

Apesar do inóculo utilizado no presente estudo ter sido pré-adaptado por 7 dias em meio de cultura sem a adição de ferro e apresentado concentração intracelular menor que 10 $\mu\text{gFe.10}^6$ células, os dados de crescimento e de clorofila *a* obtidos indicam que este período não foi suficiente para exaurir o ferro intracelular, visto que apenas a partir do 4º dia de experimento o tratamento 0 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ levou à diminuição da densidade celular e passou a apresentar menores valores de clorofila *a*, em relação ao tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ e ao controle. Isto indica que são necessários 10 dias de cultivo na ausência de ferro para exaurir as reservas de ferro intracelular da cepa MIRS-4, este período é 3,3 vezes maior ao período de pré-adaptação utilizado por Utklen & Gjølme (1995). No entanto, ao compararmos o presente trabalho com o de Utklen & Gjølme (1995), não podemos inferir que a cepa MIRS-4 tenha maior capacidade de estocar ferro frente à cepa por eles utilizada, visto que os autores citados não divulgaram a concentração de ferro intracelular do inóculo utilizado no experimento, e a pré-adaptação de 3 dias realizada por eles foi suficiente para que pudessem ver diferenças na síntese de microcistina nos tratamentos com diferentes concentrações de ferro (17, 45 e 560 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$).

Entretanto é válido ressaltar que a seleção de um período de pré-adaptação do inóculo em meio sem ferro por 7 dias decorreu do fato de experimentos piloto terem demonstrado que em períodos menores, como 3 e 5 dias, foram encontradas poucas diferenças no crescimento

entre os tratamentos testados (23, 223 e 446 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$), o que pode indicar uma boa capacidade de acúmulo de ferro intracelular, visto que a manutenção da cepa em laboratório ocorre em meio de cultura com 223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$.

Com relação aos dados de clorofila *a*, o tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ e o controle (223 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$) apresentaram concentrações próximas ao longo do tempo, exceto no 4º dia, quando o controle apresentou concentrações mais elevadas. Já o tratamento 23 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$, apresentou as menores concentrações a partir do 4º dia de experimento. O ferro não participa da constituição da molécula de clorofila *a*, mas é um co-fator de enzimas que participam do processo de síntese desse pigmento e sua limitação gera déficit no crescimento celular e síntese de clorofila *a* em cianobactérias (Kudo *et al.*, 2000; Kosakowska *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2007). Em seu trabalho sobre os efeitos da limitação de ferro sobre o aparato fotossintético em cianobactérias, Boekma *et al.*, (2001) verificaram que uma das primeiras respostas de cianobactérias em períodos de limitação de ferro é a degradação dos ficobilissomas (tornando as células clorótidas) e a síntese de proteínas localizadas nos fotossistemas I e II. A presença de tais proteínas tem o objetivo de reduzir o fluxo de elétrons e assim reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio, que possam causar danos ao aparato fotossintético da célula.

No presente trabalho, as células do tratamento 0 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$ ficaram clorótidas a partir do 4º dia de experimento, quando passaram a ser observadas também menores densidades celulares. Estes resultados evidenciam que a ausência de ferro comprometeu o processo de síntese de clorofila *a* e o crescimento celular. A clorose celular visualizada a partir do 4º dia é mais uma evidência de que 7 dias de pré-adaptação do inóculo em meio sem ferro não foram suficientes para que as células exaurissem o ferro intracelular, já que a clorose é uma resposta à limitação de ferro.

Kosakowska *et al.*, (2007) pré-adaptaram uma cepa de *M. aeruginosa* a meio de cultura na presença de ferro (560 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$) mas sem a presença do agente quelante EDTA, por período não mencionado. Em seguida submeteram o inóculo a concentrações limitantes (0,5; 28,0 e 56 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$) e não limitante (560 $\mu\text{gFe.L}^{-1}$) na presença de EDTA. Após 12 dias de experimento, estes autores verificaram no tratamento não limitante um aumento de aproximadamente 90% na densidade celular e 85% na concentração de clorofila *a* em relação

a concentrações limitantes, evidenciando que o déficit de ferro inibiu o crescimento e o processo fotossintético.

Com relação às concentrações de microcistina-LR, foi observada uma tendência de aumento na concentração nas células do tratamento $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ e no controle, o qual possuía maior concentração de ferro ($223 \mu\text{g.L}^{-1}$), se comparado com a ausência de ferro (tratamento $0 \mu\text{gFe.L}^{-1}$). Utklen & Gjolme (1995), propuseram que a síntese de microcistina seria regulada pela disponibilidade de ferro no meio. Estes autores chegaram a esta hipótese após avaliarem o efeito de três diferentes concentrações de ferro ($17 \mu\text{g.L}^{-1}$, $45 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $560 \mu\text{g.L}^{-1}$) sobre a síntese de microcistina por uma cepa tóxica e outra não tóxica de *M. aeruginosa*. Após 5 dias de experimento, foi observado que a cepa tóxica assimilou aproximadamente 48% mais ferro do que a cepa não tóxica, além de também ser observada uma tendência de maior síntese de de microcistina-RR nas culturas submetidas à maior disponibilidade de ferro ($560 \mu\text{g.L}^{-1}$). Em decorrência da cepa tóxica assimilar maior concentração de ferro presente no meio, estes autores sugeriram que a enzima envolvida na síntese de microcistina tenha sua atividade regulada pela presença de ferro livre (Fe^{2+}) no citoplasma, ou seja, o ferro também atuaria como um co-fator enzimático na via metabólica de síntese de microcistina, e que a própria molécula de microcistina atuaria como um quelante auxiliando a manutenção do Fe^{2+} no interior da célula. Desta forma, quanto maior a concentração de ferro intracelular maior seria síntese de microcistina. A partir do trabalho de Utklen & Gjolme (1995), é crescente o número de estudos sobre os efeitos do ferro na síntese de microcistina (Lyck *et al.*, 1996; Amé *et al.*, 2005; Sevilla, *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Li *et al.*, (2009), ao submeterem uma cepa de *M. novacekii* a diferentes concentrações de ferro ($0 - 280 \mu\text{g.L}^{-1}$), também verificaram que a síntese de microcistina foi maior conforme a concentração de ferro no meio aumentava.

Em alguns grupos de bactérias heterotróficas, o ferro participa nos sistemas de síntese de peptídeos, o que poderia ocorrer com alguns grupos de cianobactérias, principalmente espécies do gênero *Microcystis* (Martin-Luna *et al.*, 2006a). Mais uma evidência da relação entre a concentração de ferro e a síntese de microcistina é que próximo à região promotora do conjunto de genes de síntese de microcistina (*mcy*) encontram-se sítios de ligação de proteínas reguladoras relacionadas ao metabolismo de absorção de ferro, fotossíntese e stress oxidativo (Martin-Luna *et al.*, 2006a; Alexova, *et al.*, 2011).

De uma forma geral, os resultados dos trabalhos têm sido unânimes ao relatar que as baixas concentrações de ferro testadas em seus experimentos inibem o crescimento celular e a síntese de clorofila *a* (Lyck *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 2006; Kasakowska *et al.*, 2007, Nagai *et al.*, 2007), mas com relação aos efeitos desta limitação sobre a síntese de microcistina os resultados não são claros. Enquanto alguns autores encontraram maior síntese de microcistina em culturas expostas a baixas concentrações de ferro, tais como 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ versus 560 $\mu\text{g.L}^{-1}$, considerada uma concentração elevada (Lyck *et al.*, 1996); menor ou igual a 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$ versus 840 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Lukac & Aegerter, 1993); 0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ versus 1.675 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Sevilla *et al.*, 2008), outros encontraram maior síntese de microcistinas em concentrações de ferro consideradas mais elevadas, tais como 560 $\mu\text{g.L}^{-1}$ versus 17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Utklen & Gjome, 1995) e 560 $\mu\text{g.L}^{-1}$ versus 56 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Amé & Wunderlin, 2005). Vale ressaltar que dentre os estudos citados, apenas no trabalho de Utklen & Gjome (1995) o inóculo foi pré-adaptado por 3 dias em meio sem ferro, nos demais tratamentos os inóculos utilizados certamente possuíam ferro estocado intracelularmente. Tal divergência metodológica pode influenciar nos resultados obtidos, visto que ao submeter o inóculo a uma concentração de ferro considerada baixa, as células podem fazer uso do seu estoque, o que pode mascarar os resultados.

No estudo realizado por Sevilla *et al.*, (2008), estes autores submeteram uma cepa de *M. aeruginosa* durante 14 dias a meio de cultura com déficit de ferro (0 ferro) e ao meio sem alteração (controle), cuja concentração de ferro era de 1.675 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não houve pré-adaptação do inóculo em meio sem ferro. A partir do 4º dia de experimento o tratamento sem a presença de ferro passou a apresentar maiores concentrações de microcistina. A maior diferença ocorreu no 8º dia, quando o tratamento apresentou aproximadamente 30 ng de microcistina-LR por total de proteína (μg) e o controle aproximadamente 20 ng de microcistina-LR por total de proteína (μg). Estes autores atribuem este resultado divergente ao trabalho de Utklen e Gjome (1995), por exemplo, à normalização dos resultados de microcistina, visto que são encontrados dados normalizados por número de células ou peso seco e total de proteína, podendo gerar disparidade nas conclusões. No próprio trabalho de Utklen e Gjome (1995) as diferenças entre as concentrações de microcistina-RR são melhor percebidas quando o resultado é expresso em ng de microcistina por total de proteína (μg), desta forma resultados expressos de diferentes formas também dificultam a comparação dos resultados.

No entanto, em decorrência de no presente estudo, as maiores concentrações de ferro intracelular e microcistina-LR terem sido encontradas no controle ($223 \mu\text{gFe.L}^{-1}$) seguido do tratamento $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$, e as menores concentrações terem sido encontradas no tratamento $0 \mu\text{gFe.L}^{-1}$, nossos dados suportam a idéia de que o ferro possa atuar também como um cofator enzimático no processo de síntese de microcistina, como proposto por Utklen & Gjølme (1995), visto que este elemento atua como constituinte enzimático de outras vias metabólicas e também pode atuar na via de síntese de microcistina (Kaklon & Cabantchik, 2002).

Os dados de crescimento e clorofila *a* obtidos na presença de ferro 23 e $223 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (controle), tenderam a apresentar resultados similares, o que nos permite inferir que valores na ordem de $23 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ferro são suficientes para o crescimento de *M. panniformes*cepa MIRS-4. Como colocado por Alexova *et al.*, (2011) os resultados contraditórios apresentados pela literatura científica acerca dos efeitos da limitação do ferro sobre diferentes aspectos fisiológicos de cianobactérias, incluindo crescimento celular, síntese de clorofila e síntese de microcistinas, devem-se em parte aos diferentes desenhos experimentais dos estudos, em particular, as diferentes concentrações de ferro utilizadas e definidas como limitantes, o que dificulta a comparação dos resultados. Na literatura as concentrações limitantes variam na ordem de total ausência de ferro no meio (Lukac & Aegerter, 1993; Nagai *et al.*, 2007) a concentrações extremamente baixas, como por exemplo na ordem de $11 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (Nagai *et al.*, 2007) e $17 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (Utklen & Gjølme, 1995). As concentrações consideradas não limitantes também são amplamente variadas, considerando valores de $560 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (Lyck *et al.*, 1996) a $1.675 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (Sevilla *et al.*; 2008) até concentrações extremamente elevadas, na ordem de $5000 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ (Kasakowska *et al.*, 2007). Outro aspecto de ampla variação nos trabalhos sobre esta temática é que, como já citado, nem sempre o inóculo é pré-adaptado em condições limitantes de ferro ou quando tal procedimento ocorre, a concentração limitante a qual o inóculo foi submetido ou o período de pré-adaptação não é citada.

Ao analisar os níveis de transcritos de genes ativados quando ocorre a limitação de ferro no meio, *feo* e *fut*, foi verificado que não houve diferença significativa nos níveis de transcritos entre os tratamentos 0 e 23 Fe.L^{-1} , evidenciando que até o 4º dia as células provenientes de 7 dias na ausência de ferro ainda estavam ativando sistemas de captação de alta afinidade, provavelmente para restabelecer uma concentração de ferro intracelular adequada. De fato, a partir dos resultados de dosagem de ferro intracelular, observamos que

nestas condições as células não acumularam ferro suficiente para ser detectado pelo método utilizado e provavelmente não constituíram uma reserva significativa de ferro intracelular. Já no caso de abundância de ferro representado pelo controle ($223 \mu\text{gFe.L}^{-1}$) os níveis de expressão dos genes *feo* e *fut* foram bem mais baixos do que na ausência ou limitação de ferro. Isto está de acordo com uma alta concentração de ferro intracelular observada nesta condição, mostrando que o uso de sistemas de alta afinidade não são necessários neste caso, de forma que as células puderam desligar seus sistemas de captação de ferro. Esta diferença já ficou evidente nos primeiros tempos amostrais mostrando a rapidez do restabelecimento do ferro intracelular uma vez que este se torna disponível.

Comparando-se os tratamentos e o controle no 2º e 4º dia de experimento em relação às células pré-adaptadas em 7 dias na ausência de ferro, os níveis de transcritos de *feo* e *fut* diminuíram no caso do controle ($223 \mu\text{gFe.L}^{-1}$), de acordo com o restabelecimento do ferro intracelular, mas aumentaram em ausência ou limitação de ferro evidenciando a ativação dos sistemas de captação de ferro. De fato, no dia da montagem do experimento, o valor de ferro dissolvido no tratamento $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ já se encontrava abaixo de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e apenas neste tempo amostral foi possível detectar a concentração de ferro intracelular ($17,0 \pm 1,0 \mu\text{gFe.}10^6\text{células}$).

Entretanto foi observado que os tratamentos 0 e $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ apresentaram o mesmo nível de transcritos, o que indica que mesmo que a concentração $23 \mu\text{gFe.L}^{-1}$ seja suficiente para o crescimento de *M. panniformes*, as células podem ativar seus sistemas como estratégia para prevenir períodos de limitação de ferro, visto que no ambiente esta situação é comumente encontrada pelo fitoplâncton (Reynolds, 2006).

Alexova, *et al.*, (2011) avaliaram os níveis dos transcritos de *futA* e *feoB* em uma cepa tóxica e uma cepa não tóxica de *M. aeruginosa* sob diferentes concentrações de ferro ($56 \mu\text{g.L}^{-1}$, $5,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). Estes autores observaram que os maiores níveis de transcritos *futA* foram encontrados na cepa tóxica durante a fase exponencial (aumento de 9,7 vezes), quando esta foi submetida a concentrações limitantes de ferro ($0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). No presente trabalho, o maior nível do transcrito *fut* (aumento de 8,2 vezes), foi registrado na ausência de ferro no 4º dia de experimento. Em um estudo similar, Fujii *et al.*, (2010) verificaram que a proteína *futA* foi expressa na região periférica da célula, onde ocorre a

difusão passiva do ferro em decorrência de um gradiente entre o espaço extracelular e o periplasma, os autores apontam que esta proteína atua no transporte de ferro da membrana celular para o periplasma, logo o elevado nível de expressão de *fut* encontrado na ausência ou limitação de ferro está relacionado à tentativa da célula captar ferro das regiões mais periféricas da células (porção extracelular) e transportá-lo para o meio intracelular, o qual pode participar do processo de síntese de microcistina.

Quanto ao transcrito *feoB*, Alexova *et al.*, (2011) encontraram na cepa tóxica níveis aproximadamente 3 vezes mais baixos (3,2) quando comparado ao transcrito *futA*. Esses autores, baseados no trabalho de Katoh *et al.*, (2001) associaram este resultado ao fato de que em cianobactérias, este sistema geralmente é secundário, estando relacionado a síntese de sideróforos.

É válido ressaltar também que cianobactérias e outros procariotos possuem a vantagem de lançar para o meio extracelular moléculas quelantes capazes de se ligar ao ferro dissolvido (Fe^{3+}), tais substâncias são denominadas sideróforos e estão ausentes na maior parte das algas fitoplanctônicas eucarióticas (Wilhelm, 1994). Sendo ligantes específicos do Fe^{3+} (raramente do Fe^{2+}) os sideróforos possuem a função de seqüestrá-lo e transportá-lo para o interior das células, e por essa razão são excretados apenas em condições de deficiência de ferro. Mas para que o Fe^{3+} ligado ao sideróforo (sideróforo- Fe^{3+}) seja assimilado pela célula é necessária a presença de proteínas receptoras, estas transportam o sideróforo- Fe^{3+} através da membrana externa até o periplasma. No periplasma o Fe^{3+} é liberado a outras proteínas que o transporta através da membrana citoplasmática, estas proteínas de membrana convertem o Fe^{3+} a Fe^{2+} e o transportam para o citoplasma para ser incorporado a diversas vias metabólicas (Benite & Machado, 2002). Diante do exposto, pode-se perceber a importância da ativação dos genes específicos às condições de deficiência de ferro, visto que várias proteínas transportadoras são necessárias para a assimilação e conversão do ferro intracelularmente.

De acordo com os resultados aqui apresentados podemos concluir que o experimento realizado com diferentes concentrações de ferro foi útil em demonstrar a resposta fisiológica de uma cepa de *M. panniformes* isolada do reservatório de Samuel a diferentes condições de disponibilidade deste elemento. No entanto as medições diretas das concentrações de ferro só foram possíveis no caso do tratamento $23 \mu\text{g.L}^{-1}$ (intracelular) no 1º tempo amostral e no caso do controle ($223 \mu\text{g.L}^{-1}$, extra e intracelular); porém neste último com valores decrescentes ao longo do tempo. Como já colocado, as concentrações de ferro intra e extracelular foram

determinadas por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma com Acoplamento Indutivo/ICP-OES. Tal técnica é eficiente com excelente limite de detecção na determinação de metais como o ferro, a não ser que a amostra possua alguns interferentes que prejudiquem a análise (Meghan *et al.*, 2008). No presente trabalho foi observada uma diminuição das concentrações de ferro intracelular ao longo do tempo, certamente este elemento foi sendo assimilado pelas células de cianobactérias passando a ser constituinte de diferentes moléculas orgânicas. Desta forma, seria de se esperar que as concentrações de ferro intracelular aumentassem ao longo do tempo, o que não foi observado. Se tais moléculas orgânicas estivessem sendo excretadas ao longo do tempo para o meio extracelular em decorrência do metabolismo das cianobactérias, ou mesmo por morte celular, seria natural que ao longo do tempo o ferro fosse detectado no meio extracelular, o que também não foi observado, salvo tenha ocorrido adsorção do ferro nas paredes do frasco. Este processo pode ocorrer em baixas concentrações de ferro em meio aquoso.

Dentre os interferentes que podem prejudicar a análise de ferro relatados na literatura está o fosfato (Hernández & Meurer, 1998; Vilar *et al.*, 2010), a presença deste elemento em concentrações elevadas pode prejudicar a detecção do ferro. O meio ASM-1 utilizado para o cultivo de cianobactérias possui uma concentração de PO_4^{3-} extremamente elevada (aproximadamente $19.000 \mu\text{g.L}^{-1}$), o que pode ter interferido na determinação do ferro extracelular e principalmente intracelular, visto que o PO_4^{3-} presente no meio é rapidamente assimilado pelas cianobactérias, o que pode ter feito com que as reais concentrações não fossem detectadas. Outra questão importante que pode ter contribuído para a não detecção do ferro é o fato deste elemento, assim como outros metais, quando presentes na fase dissolvida em meio aquoso neutro pode adsorver na superfície dos recipientes em que foi adicionado. O ferro presente em solos ácidos, por exemplo, permanecem em solução em concentrações suficientes para ser utilizado pelas plantas (Foth, 1978 apud Carmargo & Freitas, 1985). Tal fato também pode ter causado interferência na detecção do ferro, principalmente a partir do segundo dia, visto que no primeiro dia de experimento a soma das concentrações intra e extracelular esteve próxima ao adicionado.

No capítulo I desta tese, a maior densidade de *M. panniformes* foi registrada em março/07, neste mês a concentração média de ferro dissolvido na Zeu foi baixa ($21,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) quando comparada a outros períodos, e a concentração de microcistina na água total foi de $0,316 \mu\text{g.L}^{-1}$, correspondente a segunda média mais elevada no período estudado (fev/07-fev/08). Tendo em vista que cianobactérias, assim como outros organismos fitoplanctônicos, são capazes de acumular ferro intracelularmente oriundo da fase dissolvida (Morel *et al.*, 1991) e especialmente, as cianobactérias podem estocar ferro na forma de proteínas como a ferritina e a bacterioferritina (Keren *et al.*, 2004), sugere-se que a espécie *M. panniformes* do

reservatório de Samuel, assimile e estoque este elemento em períodos em que há maior disponibilidade no meio, no intuito de ter reserva para os períodos em que as concentrações de ferro no meio extracelular estejam limitantes. Através desta estratégia adaptativa esta espécie pode ter um bom crescimento quando o meio extracelular apresente baixas concentrações deste elemento e paralelamente aumente a síntese de microcistina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOVA, R.; FUJII, M.; BIRCH, D.; CHENG, J.; WAITE, T. D.; FERRARI, B. C.; NEILAN, B. A., 2011. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. Environmental Microbiology, 1-11p.

AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A., 2005. Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* populations. Water, Air and Soil Pollution, 168: 235-248.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 ed. Washington: APHA, 937p.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P., 2005. Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. Química Nova, 25 (6B): 1155-1164.

BOEKMA, E. J.; HIFNEY, A.; YAKUSHEVSKA, A. E.; PIOTROWSKI, M.; KEEGSTRA, W.; BERRY, S., 2001. A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. Nature, 412: 745-748.

CAMARGO, C. E. O.; FREITAS, J. G., 1985. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de ferro em solução nutritiva. Bragantia, 44 (1): 65-75.

FERREIRA, F.; STRAUS, N. A., 2004. Iron deprivation in cyanobacteria. Journal Apply Phycology, 6: 199-210.

FOTH, H.D. Fundamentals of Soil Science. New York, John Wiley & Sons, 1978. 436p.

FUJII, M.; ROSE, A. L.; OMURA, T.; WAITE, T. D., 2010. Effect of Fe(II) and Fe(III) transformation kinetics on iron acquisition by a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. Environment Science Technology, 44: 1980-1986.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., KIM, W. K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. Verh., 15: 796-804.

HERNÁNDEZ, J.; MEURER, E. J., 1998. Adsorção de fósforo e sua relação com formas de ferro em dez solos do Uruguai. Revista Brasileira de Ciências do Solo, 22:223-230.

KAKLON, O.; CABANTTCHIK, Z. I., 2002. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. Free Radic Biol Med., 33: 1037-1046.

KATOH, H.; HAGINO, N.; GROSSMANN, A. R.; OGAWA, T., 2001. Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Journal Bacteriology, 183: 2779-2784.

KEREN, N.; AURORA, R.; PAKRASI, H. B., 2004. Critical roles of bacterioferritins in iron

storage and proliferation of cyanobacteria. Plant Physiology, 135: 1666-1673.

KOSAKOWSKA, A.; LEWANDOWSKA, J.; STÓN, J.; BURKIEWICZ, K., 2004. Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) stresses by iron, Biometals, 17: 45-52,

KOSAKOWSKA, A.; NEDZI, M.; PENPKOWIAK, J., 2007. Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. Plant Physiology and Biochemistry, 45: 365-370.

KUDO, I.; MIYAMOTO, M.; NOIRI, Y.; MAITA, Y., 2000. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). Journal Phycology, 36: 1096 – 1102.

LI, H.; MURPHY, T.; GUO, J.; PARR, T.; NALEWAJKO, C., 2009. Iron-stimulated growth and microcystin production of *Microcystis novacekii* UAM 250. Limnologica, 39: 255-259.

LICK, S.; GIGOLME, N.; UTKILEN, H., 1996. Iron starvation increases toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). Phycologia, 35 (6): 120-124.

LUKAC, R.; AEGERTER, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 31 (3): 293-305.

MARTIN-LUNA, B.; SEVILLA, E.; HERNADEZ, J. A.; BES, M. T.; FILLAT, M. F.; PALEATO, M. L. 2006a. Fur from *Microcystis aeruginosa* binds *in vitro* promoter regions of the microcystin biosynthesis gene cluster. Phytochemistry, 67: 876-881.

MARTINS, M. L. N. VON SPERLING, E., 1997. Dinâmica do Ferro e do Manganês no Hipolímnio do Reservatório Serra Azul em Minas Gerais. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Foz do Iguaçu.

MEGHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M., 2008. Análise química quantitativa. 6º edição. Ed. LCT. 488p.

NAGAI, T.; IMAI, A.; MATSUSHIGE, K.; FUKUSHIMA, T., 2007. Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. Limnology, 8: 262-270.

NAITO, K.; SUZUKI, M.; MITO, S.; HASEGAWA, H.; MATSUI, M.; ICHIRO, IMAI., 2006. Effects of the substances secreted from *Closterium aciculare* (Charophyceae, Chlorophyta) on the growth of freshwater phytoplankton under iron-deficient conditions. Plankton Benthos Research, 1 (4): 191-199.

REYNOLDS, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, 550p.

REYNOLDS, C., 2006. Ecology of Phytoplankton: ecology, biodiversity and conservation.

Cambridge University Press. 535p.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H., 2003. Substâncias húmicas aquáticas e interação com espécies metálicas. Editora: UNESP, São Paulo, 120p.

SEVILLA, E.; MARTIN-LUNA, B.; VELA, L.; BES, M. T.; FILLAT, M. F.; PELEATO, M. L., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*, 10 (10): 2476-2483.

UTKILEN, H.; GJOLME, N., 1995. Iron simulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*. 61 (2): 797-800.

VILAR, C. C.; COSTA, A. C. S.; HOEPERS, A.; SOUZA, I. G., 2010. Capacidade máxima de adsorção de fósforo relacionada a formas de ferro e alumínio em solos subtropicais. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 34:1059-1068.

WEBB, E. A.; MOFFETT, J. W.; WATERBURY, J. B., 2001. Iron stress in Open-Ocean Cyanobacteria (*Synechococcus*, *Trichodesmium*, and *Crocospaera* spp.): Identification of the IdiA Protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5444-5452.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E., 1991. *Limnological Analysis*. 2° ed. nova york. ed. springer verlag, 391p.

WETZEL, R.G., 1993. *Limnologia*. Fundacao Calouste Gulbenkian, Lisboa, 905p.

WILHEM, S. W.; TRICK, G. G., 1994. Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophores production is a common response. *Limnology and Oceanography*, 39: 1979-1984.

XING, W.; HUANG, W. M.; LI, D. H.; LIU, Y. D., 2007. Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Current Microbiology*. 55: 94-98.

DISCUSSÃO GERAL

Com relação às variáveis limnológicas estudadas na Zeu da estação M1 do reservatório de Samuel, verificou-se que tais variáveis foram fortemente influenciadas pela vazão afluyente do reservatório, a qual está relacionada com os índices pluviométricos da região. Em ambientes naturais o ciclo hidrológico da região Amazônica nos permite visualizar quatro fases: vazante, seca, enchente e cheia. Tais variações do ciclo hidrológico refletem em alterações físicas, químicas e biológicas de um determinado sistema. Entretanto, em ambientes aquáticos artificiais como reservatórios de usinas hidrelétricas, ao analisar as variáveis limnológicas, essas quatro fases podem não ser visualizadas devido à manipulação do nível da água em decorrência da operação do mesmo para fins de geração de energia.

A PCA aplicada aos dados limnológicos do estudo temporal realizado na estação M1 durante fevereiro/07 a fevereiro/08, evidenciou a formação de quatro grupos, correspondentes aos quatro períodos característicos dos pulsos de inundação dos ambientes aquáticos amazônicos, foram eles: período de águas altas (P1), período de vazante (P2), período de águas baixas (P3) e período de enchente (P4). O P1 e P2 foram caracterizados pelos meses de janeiro a maio; e o P3 e P4 formados pelos meses do período de águas baixas (junho a outubro) e enchente (novembro e dezembro). O P1 e P2 foram formados por meses que apresentaram maiores valores de vazão afluyente, a qual gerou maior aporte de macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e do micronutriente ferro. O P3 e P4 foram constituídos por meses de menor vazão, caracterizado por temperaturas mais elevadas, Zeu mais profunda, maiores concentrações de oxigênio dissolvido, clorofila *a* e amônia. As maiores biomassas fitoplanctônicas também foram obtidas no P3. Baseando-se nos resultados obtidos conclui-se que os nutrientes advindos do período de águas altas, foram utilizados de forma mais eficiente pelo fitoplâncton no período de menor vazão (P3), demonstrando a importância da estabilidade física, como menores turbulências, para o desenvolvimento fitoplanctônico.

No entanto, além da turbulência e diluição, não se descarta outros fatores que puderam estar associados aos menores valores de clorofila *a* e biomassa obtidos no período de cheia. Fatores como a diluição e perdas pelo transporte hidromecânico do sistema (Reynolds, 2006), como, por exemplo, a perda de biomassa em decorrência de maiores descargas de água montante-jusante que são maiores nos períodos de maior vazão, devido à utilização de um volume maior de água do reservatório para a geração de energia elétrica.

No reservatório de Tucuruí, o qual se localiza no rio Tocantins (Pará), Miyai (2003) ao analisar alguns dados limnológicos, dentre eles vazão, ortofosfato e clorofila *a* advindos de uma série temporal de 14 anos (1985-1999) observou padrão semelhante ao encontrado no reservatório de Samuel no presente trabalho. Este autor verificou que no período de águas altas foram encontrados os maiores valores de vazão e ortofosfato e valores reduzidos de clorofila *a*. Baixas concentrações de clorofila *a* também foram encontradas no final do período de águas baixas, o que também ocorreu no reservatório de Samuel. Este autor atribuiu os menores valores de clorofila *a* obtidos no período de águas altas à turbulência do sistema e aos baixos valores obtidos no período de águas baixas à limitação de nutrientes.

Com relação à limitação de nutrientes no reservatório de Samuel, considerando as concentrações médias de NID e ortofosfato obtidas na Zeu da estação M1, e baseando-se nas concentrações estipuladas por Reynolds (1999; 2006) como limitantes para ortofosfato ($<10 \mu\text{g.L}^{-1}$) e NID ($<100 \mu\text{g.L}^{-1}$), o período de águas baixas foi moderadamente limitado por estes dois nutrientes, principalmente de junho a outubro (P3). De uma forma geral, nos meses de menor vazão (P3) foram observadas as maiores biomassas, logo as menores concentrações de nutrientes observadas no P3 certamente estão associadas à assimilação dos nutrientes pela comunidade fitoplanctônica. Este resultado corrobora estudo anterior realizado no reservatório de Samuel por Nascimento (2006). Também foram encontradas maiores biomassas na estação M1 nos meses de junho a setembro/2005, com diminuição nos meses de outubro e novembro, recuperação da biomassa na enchente (dezembro/05) e consecutiva diminuição nos meses de maior vazão (janeiro, fevereiro e março/06), conseqüentemente os meses de maior turbulência.

A relação existente entre ciclo hidrológico e concentração de nutrientes não está baseada apenas no fato de meses de maiores precipitações acarretarem maior entrada de nutrientes oriundos da bacia de drenagem e/ou ressuspensão dos nutrientes presentes nas camadas mais profundas para a Zeu. Os meses de menor precipitação podem influenciar diretamente na disponibilidade dos nutrientes em decorrência da estratificação térmica (termoclina) e da estratificação das concentrações de oxigênio dissolvido ao longo da coluna d' água (Wetzel, 1993; Tundisi, 2005). Apesar das variáveis: temperatura da água e oxigênio dissolvido não terem sido avaliadas ao longo da coluna d' água no período de fevereiro/07 a fevereiro/08, estudos anteriores realizados na estação M1 do reservatório de Samuel

(Nascimento, 2006; Almeida, 2012) verificaram a existência de estratificação térmica entre os meses de junho a outubro, com termoclinas acentuadas (diferença de 1°C da superfície) a partir de 6 a 8m de profundidade. A profundidade da coluna d'água da estação M1 nos meses de menor precipitação varia de 21 a 26 metros e nos meses de maior precipitação de 30 a 31 metros (Nascimento, 2006; Almeida, 2012). Em decorrência da estratificação térmica as águas das camadas superficiais mais quentes não se misturam com as camadas mais profundas mais frias, gerando um acúmulo de biomassa nas camadas superficiais, diminuindo o processo de perda por afundamento, por exemplo, e limitando a liberação de nutrientes de camadas mais profundas para a Zeu (Wetzel, 1993; Reynolds, 2006). Deste modo, a estratificação térmica no P2 certamente contribuiu para a obtenção de maiores biomassas nas camadas mais superficiais da Zeu na estação M1.

Acompanhando a estratificação térmica, a estratificação das concentrações de oxigênio dissolvido também foi registrada nos meses de menor precipitação por Nascimento (2006) na estação M1 do reservatório de Samuel. O início da estratificação do perfil de oxigênio dissolvido ocorre nos meses de maio ou junho como consequência da menor vazão, picos de biomassa são observados entre agosto e setembro, registrando-se supersaturação nas camadas superficiais e concentrações de oxigênio menores que 1,0 mg.L⁻¹ a partir de 20 m de profundidade. A existência de anaerobiose nas camadas profundas da coluna d'água (também decorrente da decomposição da matéria orgânica nos sedimentos) impede uma zona oxidada que propicie, por exemplo, trocas químicas para a liberação do fósforo para as camadas superficiais da coluna d'água (Wetzel, 1993). Tal fenômeno certamente também contribuiu para as baixas concentrações de fósforo encontradas na Zeu. A mistura da coluna d'água inicia-se com o início das chuvas (novembro/dezembro) finalizando a estratificação térmica e de oxigênio dissolvido, e este período de maior circulação das massas de água na coluna d'água se mantém até o término do período chuvoso (maio/junho) (Nascimento, 2006; Almeida, 2012).

As flutuações sazonais no nível da água dos reservatórios influenciam na disponibilidade de nutrientes e na composição fitoplanctônica, incluindo a dinâmica de cianobactérias (Milius *et al*, 2005). Na estação M1 do reservatório as cianobactérias apresentaram bom desenvolvimento no P1 e no P2, com dominância frente aos demais grupos

fitoplanctônicos (clorofíceas, bacilariofíceas, dinofíceas, criptofíceas, crisofíceas e euglenofíceas).

Foram encontradas as 66 espécies fitoplanctônicas ao longo da Zeu, os grupos com maior número de espécies foram as clorofíceas (34 espécies), as cianobactérias (15 espécies), as bacilariofíceas (7 espécies) e as criptofíceas. No entanto, apenas 22 espécies contribuíram com biomassa anual igual ou superior a 5% dentro do seu grupo. Essas espécies foram representativas de 10 grupos funcionais (Y, XI, K, M, Lo, J, A, W₂, S₁ e N).

Dentre os três grupos formados pela Análise de Correspondência Canônica-ACC, as cianobactérias estiveram presentes no grupo 2, *Microcystis panniformes*, *Aphanocapsa holsatica* e *Merismopedia tenuissima*, cianobactérias coloniais com células pequenas; e grupo 3, *Merismopedia punctata*, *Lemmermaniella parva* (ambas coloniais), *Planktolyngbya limnetica* (filamentosa). As cianobactérias de ambos os grupos foram inversamente correlacionadas com a vazão (a qual também reflete na turbulência do sistema).

O crescimento de cianobactérias frequentemente é correlacionado a ambientes eutróficos e hipereutróficos (Rapala, 1997; Paerl *et al.*, 2001; Smith, V. H., 2003). Através dos dados de clorofila *a* obtidos neste estudo, o reservatório de Samuel pode ser considerado como oligo-mesotrófico (Nürnberg, 2006). A biomassa fitoplanctônica da estação M1 do reservatório da U.H.E. de Samuel sofre limitação por fósforo e nitrogênio, principalmente ao término do período de águas baixas, a limitação destes dois nutrientes foi igualmente importante como proposto por Lewis e Wurtsbaug, (2008). No período de águas altas, período de maior concentração de nutrientes, a biomassa foi afetada pela elevada turbulência em decorrência da maior vazão.

Em alguns períodos as concentrações de ortofosfato ficaram abaixo da concentração limite para o crescimento do fitoplâncton proposta por Reynolds (2006), 10 µg.L⁻¹. Este comportamento foi verificado principalmente nas camadas mais profundas da Zeu, entre os meses de junho a outubro (P3). Os processos biológicos do fitoplâncton requerem 13 a 19 partes de N para uma parte de P (Reynolds, 2006). Logo, no período de águas baixas (P3) as concentrações de nitrogênio (nitrato e amônio) também foram limitantes, destacando-se os meses de setembro e outubro. A baixa concentração destes nutrientes no P3 também reflete

seu consumo pelo fitoplâncton, nutrientes estes que passam a estarem presentes na forma particulada por incorporação na biomassa.

Estudos realizados por Tilman (1977), Sommer & Kilham, (1985) e Bulgarov & Levich (1999), relatam que os diferentes grupos fitoplanctônicos competem de forma distinta pela aquisição de nutrientes. Em ambientes com elevadas concentrações de fósforo as cianobactérias competem de forma mais eficiente tendo seu crescimento favorecido, já em condições limitantes por fósforo as clorofíceas são mais eficientes (Bulgarov & Levich 1999).

As estratégias adaptativas propostas por Reynolds (1988, 2006), estratégias C-S-R, foram bem correlacionadas à sucessão das 22 principais espécies ocorrida durante a série temporal estudada. Nos meses considerados “picos” do período águas altas (P1), janeiro e fevereiro, a biomassa fitoplanctônica foi constituída por espécies pequenas, com elevadas razões superfície/volume, consideradas boas competidoras (C-estrategistas), porém mais susceptíveis à herbivoria (*Cryptomonas brasiliensis*; *Peridinium* sp 1 e sp2). No decorrer do período de águas altas, a comunidade fitoplanctônica foi caracterizada por espécies de cianobactérias coloniais grandes, mas com altas razões superfície/volume (células pequenas) e boas captadoras de luz (R-estrategistas), a exemplo de *M. panniformes* (Reynolds, 2002 2006). A espécie com maior contribuição para a biomassa de cianobactérias foi *Planktolyngbia limnetica*, principalmente no P3. Esta espécie filamentososa pertence à ordem Oscillatoriales, e apesar de ter tido bom desenvolvimento também em meses de baixas concentrações de nitrato e amônio, esta não forma heterócitos capazes de fixar N atmosférico. No entanto são boas captadoras de luz, capazes de crescer em ambientes turbidos em circulação (novembro e dezembro, aumento da vazão) e toleram deficiência de luz (Reynolds, 2002 2006), causadas por exemplo pelo autosombreamento de outras espécies no P3.

A elevada turbulência, causada pelo aumento do volume de água, associada à baixa penetração de luz, tem sido apontada como causa do escasso crescimento de algumas espécies de cianofíceas (Perbiche-Neves *et al.*, 2011). Aspectos hidrológicos estão diretamente associados ao desenvolvimento do fitoplâncton em reservatórios de usinas hidrelétricas brasileiras (Rangel *et al.*, 2012), o que pode explicar as baixas biomassa nos meses de janeiro e fevereiro (P1).

Em síntese, através das sucessões da comunidade fitoplanctônica, com ênfase para o grupo das cianobactérias, o presente estudo demonstra que o crescimento das diferentes espécies não foi limitado por um único nutriente, mas sim por fósforo e nitrogênio, como proposto por (Tilman *et al.*, 1982; Rhee e Gotham, 1980 apud Borhardt, 1996).

Em relação ao desenvolvimento das cianobactérias, foi verificado que períodos turbulentos de elevada vazão, como meses considerados “picos” do período de águas altas (fevereiro e janeiro), não favorecem o desenvolvimento deste grupo na estação M1 do reservatório de Samuel, conclusão esta suportada pelos dados de biovolume, mostrando que além da necessidade de concentrações mais elevadas de macronutrientes e micronutrientes oriundos da entrada de água decorrente do período de águas altas, também é necessário estabilidade física da coluna d’ água e maior intensidade luminosa. O desenvolvimento da espécie *M. panniformes* parece seguir o padrão descrito, apesar de considerada biomassa em março, período de vazão ainda elevada.

A concentração de microcistina na água (fração dissolvida+seston) foi correlacionada com as variáveis: nitrato, ortofosfato e ferro dissolvido. Wu *et al.*, (2006) ao analisar a relação entre diferentes variáveis ambientais e concentrações de microcistina encontradas na água de 30 lagos chineses, também verificaram maior correlação com as variáveis nitrogênio total, nitrato e fósforo. Apesar de não ter sido encontrada correlação entre a concentração de microcistina e a profundidade do disco de Sechi no presente estudo, foram verificadas maiores concentrações de microcistina nos meses de janeiro, fevereiro e março, período em que a profundidade do disco de sechi foi menor. Com relação a esta variável, Jacob *et al.*, (2000) e Graham *et al.*, (2004) verificaram padrão semelhante em seus estudos, sugerindo que águas com transparência elevada não favoreceriam a síntese de microcistina.

O estudo de campo sugeriu que a comunidade fitoplanctônica do reservatório de Samuel tem seu desenvolvimento limitado por nitrogênio e por fósforo, principalmente nos meses de menor vazão. Tal fato foi comprovado no experimento de adição de nutrientes, visto que as maiores biomassas durante um maior período do experimento foram observadas quando os nutrientes nitrogênio, fósforo e ferro foram adicionados simultaneamente. Vrede & Tranvik (2006), ao adicionarem simultaneamente e isoladamente os nutrientes: nitrogênio, fósforo e ferro em experimentos de enriquecimento realizados *in locu* (mesocosmos) em nove lagos oligotróficos na Suécia, verificaram biomassas cerca de 2,5 vezes maiores em relação ao

controle. No presente trabalho, a adição de nutrientes simultaneamente gerou uma biomassa 3,4 vezes maior que o controle após 24 horas (considerando os valores médios de biomassa).

Vrede & Tranvik (2006) verificaram que a adição de ferro isoladamente também gerou um aumento de biomassa maior quando comparado ao tratamento em que o nitrogênio foi adicionado isoladamente e, de uma forma geral, nos nove lagos estudados a adição de nitrogênio isoladamente também gerou as menores biomassas ao longo do experimento. Tal padrão também foi observado no presente experimento, onde os menores valores médios de biomassa foram observados no tratamento N, e no tratamento Fe, também foi observado um aumento de biomassa 3,5 vezes maior em relação ao controle no terceiro dia de experimento.

O tratamento P foi o único em que as cianobactérias, representadas pela espécie *Dolichospermum solitarium*, apresentaram biomassas expressivamente mais elevadas em relação ao controle e aos demais tratamentos. Espécies do gênero *Dolichospermum* são eficientes competidoras por fósforo, sendo capazes de assimilar este nutriente através da síntese de enzimas específicas para captá-lo do ambiente (Huisman *et al.*, 1997, Rai & Sharma, 2006; Tripathi *et al.*, 2012) e se desenvolver em baixas concentrações de NID, devido a sua capacidade de fixar N atmosférico em decorrência da presença de células diferenciadas/heterocitos (Huisman *et al.*, 1997, Horvath *et al.*, 2012). No presente experimento a dominância da espécie *D. solitarium* foi verificada no tratamento P após 3 semanas do início do experimento, a partir do 24º, período em que as concentrações de NID eram mais baixas. Este resultado alerta para a vulnerabilidade do reservatório de Samuel, que pode passar a apresentar florações de cianobactérias caso a entrada de fósforo. Esta situação é agravada por esta ser uma região de pecuária a qual contribui para a entrada deste elemento nos corpos d'água. Principalmente se a área da sub-bacia do rio Jamari passar a apresentar maior atividade agrícola nos anos que seguem, em decorrência do uso de fertilizantes.

O estudo realizado sobre os efeitos do ferro sobre diferentes aspectos fisiológicos de *Microcystis panniformes* também trouxe resultados importantes. Assim como observado por outros trabalhos similares (Lyck *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 2006; Kasakowska *et al.*, 2007, Nagai *et al.*, 2007), foi verificado que baixas concentrações de ferro inibiram o crescimento celular e a síntese de clorofila *a*, e que houve uma tendência às maiores concentrações de microcistina serem encontradas nos tratamentos com concentrações de ferro mais elevadas, o

que sugere a participação deste elemento na via metabólica desta toxina, como proposto por Utklen & Gjolme (1995).

Na região Amazônica os principais tipos de solo são os latossolos e os argissolos (Vieira & Santos, 1987), dentre eles os latossolos também se caracterizam por apresentarem concentrações de ferro elevadas, o que pode refletir nas concentrações de ferro nos ambientes aquáticos da região. O reservatório de Tucuruí (Pará), também em decorrência da pedologia da região Amazônica apresenta concentrações de ferro total elevadas principalmente no período de cheia, variando de 890-4.620 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Miyai, 2003). Entretanto, elevadas concentrações de ferro total não refletem também elevadas concentrações de ferro potencialmente assimilado pelo fitoplâncton, visto que para estar disponível ao fitoplâncton o ferro deve estar em sua forma dissolvida (Fe^{2+} e Fe^{3+}), o que depende de variáveis como pH, Eh e a presença de substâncias orgânicas (Wetzel, 1991; Martins & Von Sperling, 1997; Reynolds, 2006; Rocha & Rosa, 2003)

Como demonstrado, no reservatório de Samuel o ferro esteve correlacionado ao crescimento de *M. panniformes* e à síntese de microcistina. Desta forma, se enfatiza a importância do monitoramento desta espécie e das concentrações de microcistinas na água, principalmente em ambientes que tenham concentrações mais altas deste elemento, seja em decorrência de uma característica natural dos solos da região, ou pela entrada deste elemento através de efluentes industriais.

CONCLUSÕES

- O reservatório de Samuel pode ser classificado como oligo-mesotrófico, com uma *Zeu* com temperaturas elevadas (acima de 28°C) durante todo o ano e tendo as variáveis físicas, químicas e biológicas da água fortemente influenciadas pelo ciclo hidrológico da região Amazônica, o qual caracteriza-se pelos períodos de águas baixas, enchente, águas altas e vazante. O desenvolvimento dos diferentes grupos fitoplanctônicos apresentou uma variação sazonal, com maiores biomassas nos período de águas baixas.
- As cianobactérias dominaram sobre os demais grupos fitoplanctônicos em apenas 15% do período estudado (março e maio), as clorofíceas constituíram o grupo com biomassas mais elevadas, sendo dominantes sobre os demais grupos em 61% do período estudado. As alterações nas características limnológicas da água ao longo do ciclo hidrológico permitiram que as seis principais espécies apresentassem bom desenvolvimento em diferentes períodos do ciclo hidrológico. Em meses de maior vazão as espécies *Aphanocapsa holsatica*, *Microcystis panniformes* e *Merismopedia tenuissima* apresentaram biomassas mais elevadas. Tais espécies tiveram maior contribuição no período em que as cianobactérias dominaram o fitoplâncton (março e maio). Especialmente *A. hosalitica* e *M. pannofomesquee* estiveram relacionadas a valores neutros de pH e a maiores concentrações de amônia. Em meses de menor vazão as principais espécies de cianobactérias foram *Lemmermanniela parva*, *Merismopedia punctata*, associadas a temperaturas mais altas e *Planktolynghya limnetica*, associada a ambientes turbidos.
- Foi detectada a presença de microcistina na água do reservatório (sem tratameto prévio) nos meses de fevereiro/07 a fevereiro/08. Apenas em fevereiro/08 foi detectada concentrações acima de 1,0 µg.L-1, valor recomendado pela portaria 2.914/MS/2012 para água tratada destinada ao consumo humano. Apesar do reservatório de Samuel não ser destinado à captação de água, comunidades de pescadores no seu entorno o utilizam para esta finalidade, enfatizando a importância do monitoramento da densidade de cianobactérias e das concentrações de cianotoxinas.

- No estudo de campo as variáveis que se correlacionaram às concentrações de microcistina na água (fração total) foram nitrato, ortofosfato e ferro. No experimento em que a cepa MIRS-4 foi submetida a diferentes concentrações de ferro, foi verificada uma tendência das maiores concentrações de microcistina serem obtidas quando *M. panniformes* foi exposta a maiores concentrações de ferro.
- Na estação M1 do reservatório de Samuel a comunidade fitoplanctônica foi moderadamente limitada por fósforo e por nitrogênio. Tal padrão corrobora os dados obtidos no experimento de enriquecimento de nutrientes em microcosmos, visto que as maiores biomassas foram obtidas quando houve a adição simultânea de nitrogênio, fósforo e ferro,, predominado as clorofíceas.
- Em termos de eutrofização, o experimento de enriquecimento de nutrientes em microcosmos evidenciou que a entrada de fósforo no reservatório de Samuel pode ser considerada preocupante, visto que a adição isolada deste elemento na água do reservatório propiciou um aumento expressivo de biomassa da espécie de cianobactéria potencialmente tóxica, *Dolichospermum solitarium*.
- Resultados de experimento em cultivo com uma cepa de *Microcystis panniformes* isolada do reservatório de Samuel mantida em diferentes concentrações de ferro indicaram que maiores concentrações deste elemento propiciaram maior número de células, síntese de clorofila *a* e concentração de microcistina. Desta forma, ressalta-se a importância do monitoramento da densidade de cianobactérias e de seu potencial tóxico no reservatório de Samuel.

RECOMENDAÇÕES

- A fim de melhor entender a dinâmica de cianobactérias no reservatório de Samuel, recomenda-se a realização de estudo semelhante em outras áreas do mesmo, a exemplo das estações M4 e M8 que também apresentaram densidade elevada de *Microcystis* sp, como demonstrado em estudo anteriormente realizado (Nascimento, 2006), e também em decorrência da dinâmica da estação M1 não refletir a dinâmica de todo o reservatório,
- Apesar do reservatório de Samuel não ser destinado à captação de água para abastecimento público, comunidades de pescadores no seu entorno o utilizam para esta finalidade, enfatizando a importância do monitoramento da densidade de cianobactérias e das concentrações de microcistinas, em decorrência de ter sido registradas concentrações de microcistinas maiores que o recomendado pelo Ministério da Saúde (portaria 2.914/MS/2011),
- Recomenda-se controlar de forma eficiente a eutrofização artificial na área do reservatório, principalmente o controle de atividades que possam contribuir com uma maior entrada de fósforo no reservatório, principalmente se a área da sub-bacia do rio Jamari passar a apresentar maior atividade agrícola nos anos que seguem, em decorrência do uso de fertilizantes, ou a intensificação da pecuária, visto que o presente estudo mostrou que a entrada deste nutriente pode favorecer a formação de florações de cianobactérias,
- Como demonstrado, no reservatório de Samuel o ferro esteve correlacionado ao crescimento de *M. panniformes* e à síntese de microcistina. Desta forma, recomenda-se o monitoramento desta espécie e das concentrações de microcistinas no reservatório, bem como em outros ambientes que tenham concentrações elevadas deste elemento, seja em decorrência de uma característica natural dos solos da região, ou pela entrada deste elemento através de efluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. 2012. Estudo da origem, mobilização e organificação do mercúrio do mercúrio no reservatório de Samuel, RO. Tese. Programa de pós-graduação em Biofísica. UFRJ, Rio de Janeiro. 117p.

BULGAKOV, N. G.; LEVICH, A. P. 1999. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. Archiv für Hydrobiologie, 146: 3-22.

GRAHAM, J. L.; JONES, J. R.; JONES, S. B.; DOWING, J. A.; CLEVERGEN, T. E., 2004. Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. Water Research, 38: 4395-4404.

HORVÁTH, H.; MÁTYÁS, K.; SÜLE, G.; PRÉSING, M., 2012. Contribution of nitrogen fixation to the external nitrogen load of a water quality control reservoir (Kis-Balaton Water Protection System, Hungary). Hydrobiologia, *in press*.

HUISMAN, J.; SNOEP, J. L.; MUR, L. R. 1997. Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and *Aphanizomenon*. Fems Microbiology Ecology, 24 (3) 259-267.

JACOBY, J. M.; COLLIER, D. C.; WELCH, E. B.; CRAYTON, M., 2000. Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 57: 231-240.

KOSAKOWSKA, A., NEDZI, M. & PENPKOWIAK, J. 2007. Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. Plant Physiology and Biochemistry. 45: 365-370.

LEWIS, W .M.; WURTSBAUGH, W.A., 2008. Control of lacustrine phytoplankton by nutrients: erosion of the phosphorus paradigm. Internat Revue Hydrobiol, 93: 446-465.

LYCK, S.; GJOLME, N.; UTKILEN, H., 1996. Iron starvation increase toxicity of *Microcystis aeruginosa* CYA 228/1 (Chroococcales, Cyanophyceae). Phycologia, 35: 120-124.

MARTINS, M. L. N.; VON SPERLING, E., 1997 Dinâmica do ferro e do manganês no hipolímio do reservatório Serra Azul em Minas Gerais. Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 1525-1538.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2011. Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2012. 32p.

MIYAI, R. K., 2003. Estudo sobre o comportamento espaço-temporal de alguns parâmetros limnológicos do reservatório da U.H.E. Tucuruí – Pará/Brasil, no período pós-enchimento (1985-1999). Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências do Meio Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia. Manaus-AM. 143p.

NAGAI, T.; IMAI, A.; MATSUSHIGE, K.; FUKUSHIMA, T., 2007. Growth characteristics

and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. Limnology, 8: 262-270.

NAITO, K.; SUZUKI, M.; MITO, S.; HASEGAWA, H.; MATSUI, M.; IMAI, I. 2006. Effects of the substances secreted from *Closterium aciculare* (Chaerophyceae, Chlorophyta) on the growth of freshwater phytoplankton under iron-deficient conditions. Plankton Benthos Research, 1 (4):191-199.

NASCIMENTO, E. L. 2006. Concentração de mercúrio no plâncton e fatores ecológicos no reservatório da U.H.E. Samuel – Amazônia Ocidental (Rondônia/Brasil). Dissertação. Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. 119p.

NÜRNBERG, G. 1996. Trophic state of clear and colored, soft- and hardwater lakes with special consideration of nutrients, anoxia, phytoplankton and fish. Lake and Reservoir Management, 12: 432-447

PEARL, W.H.; FULTON, R.S.; MOINSANDER, P.H.; DYBLE, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms with an emphasis on cyanobacteria. Science World, 1: 76-113.

PERBICHE-NEVES, G.; FERRAREZE, M. F.; SERAFIM-JÚNIOR, M.; SHIRATA, M. T.; LAGOS, P. E. D., 2011. Influence of atypical pluviosity on phytoplankton assemblages in a stretch of a large sub-tropical river (Brazil). Biologia, 66(1): 33-41.

RAI, A.K.; SHARMA, N. K., 2006. Phosphate metabolism in the cyanobacterium *Anabaena doliolum* under salt stress. Current Microbiology, 52:6-12

RAPALA, J.; SIVONEN, K.; LYRA, C.; NIEMELA, S.I., 1997. Variation of microcystin, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp as a function of growth simulation. Apply Environmental Microbiology, 63: 2206-2212.

REYNOLDS, C. Ecology of Phytoplankton: ecology, biodiversity and conservation. Cambridge University Press. 535p. 2006.

REYNOLDS, C. S. 2006. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, 550p.

REYNOLDS, C. S.; HUSZAR, V.; KRUK, C.; NASELLI-FLORES, L.; MELO, S. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. Journal of Plankton Research, 24 (5): 417-428.

REYNOLDS, C.S. 1988. Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. p. 388-433 In C. D. Sandgren [ed.] Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press. Cambridge.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas. Editora: UNESP, São Paulo. 120p.

- SMITH, V.H., 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. Environmental Science and Pollution Research, 10: 126-139.
- SOMMER, U.; KILMAN, S. S.; 1985. Phytoplankton natural community competition experiments: a reinterpretation. Limnology and Oceanography, 30: 436-440.
- TILMAN, D., 1987. Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. Ecology, 58: 338-348.
- TRIPATHI, K.; SHARMA, N. K.; RAI, V.; RAI, A. K., 2012. Low cellular P-quota and poor metabolic adaptations of the freshwater cyanobacterium *Anabaena fertilissima* Rao during P-limitation. Hydrobiologia, *in press*.
- Tundisi, J.G.; Matsumura-Tundisi, T., 2008. Limnologia, São Paulo: Oficina de Textos, 632 p
- UTKILEN, H.; GJOLME, N., 1995. Iron simulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. Applied Environmental Microbiology, 61 (2): 797-800.
- VIEIRA, L. S.; SANTOS, P. C. T. C., 1987. Amazônia: seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Agronômica Ceres. 416p.
- VREDE, T.; TRANVIK, L. J. 2006. Iron constraints on Planktonic Primary Production in Oligotrophic Lakes. Ecosystems, 9: 1094-1105.
- WETZEL, R. G., 1991. Limnologia. 2° ed. Editora Fundação Gulbenkian. 917p.
- WETZEL, R.G., 1993. Limnologia. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 905p.
- WU, S. K.; XIE, P.; LIANG, G. D.; WANG, S. B.; LIANG, X. M., 2006. Relationship between microcystins and environmental parameters in 30 subtropical shallow lakes along the Yangtze, China. Freshwater Biology, 51: 2309-2319.