

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
Departamento de Botânica – Laboratório de Ficologia

**FOTORREATIVIDADE E BIODISPONIBILIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA PRODUZIDA
POR *MICROCYSTIS AERUGINOSA*.**

Thais Beraldo Bittar

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Campo de pesquisa: Fisiologia e ecologia de microorganismos).

São Carlos – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

B624fb

Bittar, Thais Beraldo.

Fotorreatividade e biodisponibilidade da matéria orgânica dissolvida produzida por *Microcystis aeruginosa* / Thais Beraldo Bittar. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
147 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Ficologia. 2. Biodisponibilidade. 3. Radiação ultravioleta. 4. Matéria orgânica dissolvida. 5. Cianobactéria. 6. Bacterioplâncton. I. Título.

CDD: 589.3 (20^a)

Tahis Beraldo Bittar

**FOTORREATIVIDADE E BIODISPONIBILIDADE DA MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA PRODUZIDA
POR *MICROCYSTIS AERUGINOSA***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 31 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

Presidente


Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira
(Orientador)

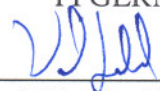
1º Examinador


Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior
PPGERN/UFSCar

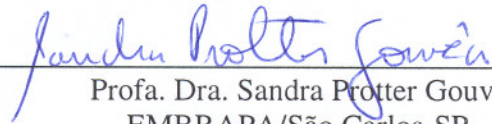
2º Examinador


Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
PPGERN/UFSCar

3º Examinador


Prof. Dr. Danilo Giroldo
UFRGS/Rio Grande-RS

4º Examinador


Profa. Dra. Sandra Protter Gouvêa
EMBRAPA/São Carlos-SP

Orientador

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.(...).
Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa

A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.

Essa é a fonte de toda a arte e ciência verdadeiras.

Albert Einstein.

DATA: BY THE NUMBERS



Dedicado à minha família, José Affonso, Lígia e Rachel.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pela orientação, generosidade, confiança e ensinamentos ao longo destes 10 anos, e por ser meu maior exemplo de profissional em pesquisa acadêmica.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr, Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi, Prof. Dr. Danilo Giroldo e Profa. Dra. Sandra Protter Gouvêa, pela disponibilidade.

Ao pessoal do Laboratório de Ficologia, aos que continuam e aos que já foram embora: Luiz Sartori, Danilo Giroldo, Sandra Gouvêa, Vanessa Corbi, Zezé Oliveira, Inessa Bagatini, Cristina Freire, Alessandra Tonietto, Fabrício Meccheri, Leticia Tessaroli, Pedro Ortolano, Sílvia Fatibello, Sebastião Antônio, Ingritt Moreira e Ana Lombardi, pelo companheirismo e por tudo que eu tive a chance de aprender graças à convivência com todos e cada um.

À Inessa, especialmente pelo apoio no dia a dia, pela companhia e generosidade.

Ao técnico de campo Luiz Joaquim pela disposição e comprometimento exemplares nas coletas.

À UFSCar e Departamento de Botânica pela infraestrutura e à Comissão de Coordenação e Secretaria do PPGERN pelo apoio administrativo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 05/57213-0) e à NSF (*National Science Foundation*, OCE 0728634) pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Química e Bioquímica da *Old Dominion University* em Norfolk (EUA): Hongmei Chen, Aron Stubbins, John Helms, Elodie Salmon, Rachel Sleighter, Gina McKee, Zhanfei Liu, Hussain Abdulla, Paolo Caricasole, Rajaa Mesfioui, Chris Burbage, Jenny Morton, Nicole Didonato, Albert Kamga e Adair Johnson pela disponibilidade e orientação, principalmente sobre a análise de FTICRMS, e pela convivência diária tranquila e alegre.

À Hongmei pelas muitas altas horas em que passamos juntas decifrando FTICRMS e por ter me ensinado o processamento dos dados passo a passo, e acima de tudo pela amizade.

À Elodie pelos conselhos e amizade.

Ao Aron por acreditar em mim, pela orientação, generosidade, incentivo e carinho.

Aos amigos em Norfolk: Andrea Pinones, Diego Narvaez, Guillaume Martinat, Tosca Ballerini, Heber Herencia e Gonzalo Carrasco pela acolhida e companheirismo.

Aos professores Dr. Hatcher, Dr. Mulholland, Dr. Burdrige e Dr. Gordon pela utilização de diversos instrumentos em seus laboratórios e ao técnico Mahasilu Amunugama e à diretora Susan Hatcher pela utilização do FTICRMS no laboratório COSMIC.

Ao professor Dr. Ken Mopper pela oportunidade de estágio no laboratório de Química Analítica e Ambiental na ODU e pelos valiosos comentários na área de fotoquímica da MOD.

Aos meus amigos mais queridos: Priscila Fuentes, Giselle, Elisa, Zairiane, Terence, Silvana, Giovana, Elisangela, Lohan, Paulinho, Eugeni, Jaime, Cibele, Samuca, Bispo e Picé, por serem um alívio nas dificuldades, e pela alegria de estar perto deles.

À minha família toda pela torcida, especialmente aos meus pais José Affonso e Lúcia e minha irmã Rachel, pelo amor incondicional.

Sumário

i. Lista de Abreviações.....	11
ii. Lista de Figuras.....	12
iii. Lista de Tabelas.....	19
iv. Resumo e <i>Abstract</i>	21

Capítulo 1 – Apresentação

1.1 Introdução.....	22
1.2. Hipótese.....	24
1.3. Objetivos	24
1.4. Técnicas.....	25
1.4.1 <i>Análises da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C)</i>	25
1.4.2 <i>Análises da matéria orgânica dissolvida fluorescente (MOD-F)</i>	26
1.4.3 <i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRMS)</i>	29
1.4.4 <i>Carbono orgânico dissolvido</i>	35
1.4.5 <i>Produtividade bacteriana</i>	35

Capítulo 2. Caracterização e mudanças induzidas pela radiação UV na MOD produzida por *Microcystis eruginosa* em culturas axênicas e MOD do reservatório de Barra Bonita em função do tempo de irradiação.

2.1 Objetivos.....	37
2.2 Materiais e Métodos.....	37
2.2.1 <i>Nomenclatura e definição dos tipos de MOD estudados</i>	37
2.2.2 <i>Obtenção da MOD</i>	37
2.2.3 <i>Experimentação</i>	39
2.3 Resultados.....	40
2.3.1 <i>Análises da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C)</i>	40

2.3.2	<i>Análises da matéria orgânica dissolvida fluorescente (MOD-F)</i>	46
2.3.3	<i>Concentração de carbono orgânico</i>	50
2.3.4	<i>Análise das características químicas da MOD – espectrometria de massa</i>	51
2.4	<i>Discussão</i>	64
2.4.1	<i>Caracterização das MODs estudadas</i>	64
2.4.2	<i>Efeito do tempo de exposição à radiação UV sobre as propriedades ópticas da MOD</i>	66
2.4.3	<i>Efeito da exposição de curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias) à UVB sobre as características químicas e moleculares da MOD EXTRA e MOD BB</i>	69

Capítulo 3. Efeitos da radiação UV e da atividade microheterotrófica, separadamente e em associação, sobre a matéria orgânica dissolvida extracelular liberada por *Microcystis aeruginosa* em culturas axênicas.

3.1	<i>Objetivos</i>	72
3.2	<i>Materiais e métodos</i>	72
3.2.1	<i>Obtenção da MOD</i>	72
3.2.2	<i>Experimentação</i>	73
3.3	<i>Resultados</i>	74
3.3.1	<i>Incorporação de H³-Timidina e remoção de COD pelas bactérias</i>	74
3.3.2	<i>Biodegradação da MOD-C</i>	75
3.3.3	<i>Biodegradação da MOD-F</i>	81
3.3.4	<i>Espectrometria de massa (FTICRMS) da MOD foto e/ou bioalterada</i>	86
3.4	<i>Discussão</i>	100
3.4.1	<i>Transformações biológicas e fotoquímicas da MOD extracelular</i>	100
3.4.2	<i>Efeitos da radiação UV sobre a biodisponibilidade</i>	101

Capítulo 4. Efeitos da radiação UV e da atividade microheterotrófica, separadamente e em associação, sobre a matéria orgânica intracelular de *Microcystis aeruginosa*.

4.1	Objetivos.....	104
4.2	Materiais e métodos.....	104
4.2.1	<i>Obtenção da MOD.....</i>	104
4.2.2	<i>Experimentação.....</i>	105
4.3	Resultados.....	106
4.3.1	<i>Incorporação de H³-Timidina e remoção de COD pelas bactérias.....</i>	106
4.3.2	<i>Biodegradação da MOD-C.....</i>	109
4.3.3	<i>Biodegradação da MOD-F.....</i>	112
4.3.4	<i>Espectrometria de massa (FTICRMS) da MOD foto e/ou bioalterada</i>	116
4.4	Discussão.....	132
4.4.1	<i>Transformações biológicas e fotoquímicas da MOD intracelular.....</i>	132
4.4.2	<i>Efeitos da radiação UV sobre¹³⁴ a biodisponibilidade.....</i>	134
	Conclusões.....	137
	Referências Bibliográficas.....	138

Lista de abreviações

CARS (*Condensed aromatic ring structures*) – estruturas ou moléculas condensadas ricas em anéis aromáticos.

CHO – moléculas formadas unicamente pelos átomos de Carbono, Hidrogênio e Oxigênio.

CHON – moléculas formadas unicamente pelos átomos de C, H, O e Nitrogênio.

CHOP – moléculas formadas unicamente pelos átomos de C, H, O e Fósforo.

CHOS – moléculas formadas unicamente pelos átomos de C, H, O e Enxofre.

COD – Carbono Orgânico Dissolvido.

CRAM (*Carboxylic-rich alicyclic molecules*) – moléculas alicíclicas (i.e., com anéis não aromáticos), ricas em grupos carboxílicos.

DBE (*Double Bond Equivalent*) – Equivalentes de duplas ligações é o número de ligações duplas e de anéis aromáticos em uma molécula.

DBE/C – número de DBE em uma molécula, dividido pelo número de átomos de Carbono da molécula. Utilizado como índice de aromaticidade da MOD.

EEM (*Emission-Excitation Matrix*) – Representação gráfica das medidas de fluorescência.

Ex/Em – pares de comprimentos de onda de Excitação e Emissão de fluorescência máxima de um pico.

FTICRMS (*Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) – Técnica de espectrometria de massa para caracterização química e molecular da MOD.

MOD – Matéria Orgânica Dissolvida.

MOD BB – MOD do reservatório de Barra Bonita

MOD-C – Matéria Orgânica Dissolvida Cromofórica.

MOD EXTRA – MOD extracelular das culturas axênicas de *Microcystis aeruginosa*

MOD-F – Matéria Orgânica Dissolvida Fluorescente.

MOD inicial – MOD não irradiada.

MOD INTRA – MOD intracelular das células de *Microcystis aeruginosa* cultivadas em modo axênico.

MOD pré irradiada – MOD exposta à radiação antes da inoculação das bactérias.

UV – radiação ultravioleta nas regiões de 320 a 400 nm (UVA) e 280 a 320 nm (UVB).

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Exemplo de EEM (MOD-F extracelular da cultura de *Microcystis aeruginosa*) e localização dos fluoróforos identificados neste estudo. T = material protéico; A = material húmico, C = material húmico de origem terrestre, e pico M. **29**

Figura 2. Diagrama de Van Krevelen mostrando as regiões onde classes de moléculas estão representadas com base em razões H/C e O/C teóricas. As letras representam reações químicas: (A) Metilação/Demetilação; (B) Hidrogenação/Dehidrogenação; (C) Condensação/Hidratação (adição de grupos OH); (D) Oxidação/Redução. Fonte: Sleighter e Hatcher (2007). **33**

Capítulo 2

Figura 1. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) extracelular liberada por *Microcystis aeruginosa* ao longo do tempo de exposição à radiação (a) UVB e (b) UVA. **41**

Figura 2. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) de origem intracelular de *Microcystis aeruginosa* ao longo do tempo de exposição à radiação (a) UVB e (b) UVA. **42**

Figura 3. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) do reservatório de Barra Bonita ao longo do tempo de exposição à radiação UVB. O quadro interno mostra a amostra irradiada por 43 dias em escala otimizada. **43**

Figura 4. Razão entre $a_{250}:a_{365}$ em função do tempo de irradiação de (a) MOD EXTRA e (b) MOD INTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB. **45**

Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD de *Microcystis aeruginosa* (a) EXTRA inicial e (b) INTRA inicial e (c) MOD BB inicial; e após irradiação com UVB por 0.5 dia (d) EXTRA, (e) INTRA e (f) BB. T = material protéico, M = pico M, C e A = material húmico. **47**

Figura 6. Intensidade máxima de fluorescência (em unidades de Raman, U.R.) de cada pico de material fluorescente identificado na MOD EXTRA em função do tempo de exposição à (a) UVB e (b) UVA; MOD INTRA em função do tempo de exposição à (c) UVB e (d) UVA; e (e) MOD BB em função do tempo de exposição à UVB. **49**

Figura 7. Concentração de carbono orgânico dissolvido (COD, ppm) em função do tempo de exposição à radiação UVB da MOD EXTRA e INTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB. **50**

Figura 8. Caracterização química da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*: diagrama de Van Krevelen da MOD (a) inicial e irradiada por (b) 0.5 e (c) 7 dias (as barras representam a proporção de cada classe de compostos na amostra); e composição atômica da MOD (d) inicial e irradiada por (e) 0.5 e (f) 7 dias, em número de compostos e porcentagem (%). **53**

Figura 9. Diagrama de Van Krevelen dos compostos (a) degradados, (b) resistentes e (c) produzidos devido à exposição de curto (0.5 d) e longo prazo (7 d) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* à radiação UVB. As barras representam a proporção dos grupos na amostra. **55**

Figura 10. Proporção (%) de compostos resistentes a longo prazo (7 dias) e degradados em curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias), pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* exposta à radiação UVB. **57**

Figura 11. Caracterização química da MOD do reservatório de Barra Bonita: diagrama de Van Krevelen da MOD (a) inicial e irradiada por (b) 0.5 e (c) 7 dias (as barras representam a proporção de cada classe de compostos na amostra); e composição atômica da MOD (d) inicial e irradiada por (e) 0.5 e (f) 7 dias, em número de compostos e porcentagem (%). **59**

Figura 12. Diagrama de Van Krevelen dos compostos (a) degradados, (b) resistentes e (c) produzidos devido à exposição de curto (0.5 d) e longo prazo (7 d) da MOD do reservatório de Barra Bonita à radiação UVB. As barras representam a proporção dos grupos na amostra. **60**

Figura 13. Proporção (%) de compostos resistentes a longo prazo (7 dias) e degradados em curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias), pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD do reservatório de Barra Bonita exposta à radiação UVB. **62**

Capítulo 3

Figura 1. Variação na taxa de incorporação de H³-Timidina (nM.L⁻¹.h⁻¹) ao longo do tempo de cultivo da comunidade microheterotrófica em MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; inicial e pré irradiada por 7 dias com (b) UVB e (c) UVA; barras representam o desvio padrão. **76**

Figura 2. Variação na concentração de carbono orgânico dissolvido (COD, ppm) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; inicial e pré irradiada por 7 dias com (b) UVA e (c) UVB em função do tempo de cultivo das bactérias. **77**

Figura 3. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*, inicial (a) e pré irradiada por 0.5 dia com (b) UVA e (c) UVB em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 28 dias). **79**

Figura 4. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*, (a e b) inicial e pré irradiada por 7 dias com (c) UVB e (d) UVA em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 27/28 dias). **80**

Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias. **82**

Figura 6. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 3, (d) 6, (e) 14 e (f) 28 dias. **82**

Figura 7. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 5, (d) 13, (e) 19 e (f) 27 dias. **83**

Figura 8. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias. **84**

Figura 9. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias. **84**

Figura 10. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 3, (d) 6, (e) 14 e (f) 28 dias. **85**

Figura 11. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* e pré irradiada por 7 dias com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 5, (d) 13, (e) 19 e (f) 27 dias. **85**

Figura 12. Caracterização química da MOD extracelular inicial de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica, em número de compostos e proporção (%). **88**

Figura 13. Diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural dos compostos degradados, resistentes e produzidos após 2 dias de atividade biológica (a, b, c, respectivamente) e 7 dias de atividade fotoquímica (d, e, f, respectivamente) sobre a MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. As barras representam a contribuição proporcional de cada classe. **89**

Figura 14. Composição atômica, em número e contribuição proporcional (%), dos grupos de compostos (a) biorresistentes, (b) biodegradados e (c) bioproduzidos após 2 dias de atividade biológica e (d) fotorresistentes, (e) fotodegradados e (f) fotoproduzidos após 7 dias de atividade fotoquímica sobre a MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. **90**

Figura 15. Proporção (%) entre compostos biorresistentes e biodegradados, pertencentes às diversas classes (a) de composição atômica e (b) estruturais da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. **92**

Figura 16. Proporção (%) entre compostos fotorresistentes e fotodegradados, pertencentes às diversas classes (a) de composição atômica e (b) estruturais da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. **93**

Figura 17. Composição química dos compostos simultaneamente bio e fotodegradados da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica em número e proporção (%). **94**

Figura 18. Proporção (%) entre compostos simultaneamente bio e fotodegradados e compostos resistentes a ambos processos, pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. **95**

Figura 19. Composição química dos compostos resistentes à degradação biológica e fotoquímica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica em número e proporção (%). **96**

Figura 20. Composição química dos bioprodutos da atividade biológica sobre a MOD extracelular inicial (painéis a e c) e pré irradiada (painéis b e d) de *Microcystis aeruginosa*: (a e

b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%). **97**

Figura 21. Composição química dos fotoprodutos da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* biodegradados (painéis a e c) e biorresistentes (painéis b e d): (a e b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%). **98**

Capítulo 4

Figura 1. Variação na taxa de incorporação de H³-Timidina (nM.L⁻¹.h⁻¹) ao longo do tempo de cultivo da comunidade microheterotrófica em MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; (b) inicial e pré irradiada por 7 dias com UVA e UVB; barras de erros representam o desvio padrão. **107**

Figura 2. Variação na concentração de carbono orgânico dissolvido (COD, ppm) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; (b) inicial e pré irradiada por 7 dias com UVA e UVB em função do tempo de cultivo das bactérias. **108**

Figura 3. Variação no espectro do coeficiente de absorvância (a.m⁻¹) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com (a) UVB e (b) UVA e inicial (c) em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 45 dias). **110**

Figura 4. Variação no espectro do coeficiente de absorvância (a.m⁻¹) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com (a) UVB e (b) UVA e inicial (c) em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 41 dias). **111**

Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial intracelular de *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias. **113**

Figura 6. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial intracelular de *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias. **113**

Figura 7. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias. **114**

Figura 8. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias. **114**

Figura 9. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias. **115**

Figura 10. Matrizes de emissão-excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias. **115**

Figura 11. Caracterização química da MOD intracelular inicial de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen, onde a barra representa a contribuição porporcional de cada classe, e (b) composição atômica, em número de compostos e proporção (%). **118**

Figura 12. Diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural dos grupos de compostos degradados, resistentes e produzidos após 7 dias de atividade biológica (a, b, c, respectivamente) e 7 dias de atividade fotoquímica (d, e, f, respectivamente) sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*. As barras representam a contribuição porporcional de cada classe. **119**

Figura 13. Composição atômica, em número e contribuição proporcional (%), dos grupos de compostos (a) biodegradados, (b) biorresistentes e (c) bioproduzidos após 7 dias de atividade biológica e (d) fotodegradados, (e) fotorresistentes e (f) fotoproduzidos após 7 dias de atividade fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*. **121**

Figura 14. Proporção (%) entre compostos resistentes e degradados, pertencentes às diversas classes estruturais, após 7 dias de atividade (a) biológica e (b) fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*. **122**

Figura 15. Proporção (%) entre compostos resistentes e degradados, dos diversos tipos de composição atômica, após 7 dias de atividade (a) biológica e (b) fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*. **123**

Figura 16. Composição química dos compostos resistentes simultaneamente à degradação biológica e fotoquímica da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica em número e proporção (%). **125**

Figura 17. Composição química dos compostos simultaneamente bio e fotodegradados da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe; (b) composição atômica em número e proporção (%); proporção (%) entre compostos resistentes e bio+foto degradados, classificados quanto à (c) forma estrutural e (d) composição atômica. **126**

Figura 18. Fotoprodutos biodegradados e biorresistentes: (a) diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural, onde as barras representam a contribuição proporcional (%) de cada classe de compostos; (b) composição atômica dos fotoprodutos biodegradados e biorresistentes; proporção (%) entre fotoprodutos biodegradados e biorresistentes, de acordo com sua (c) classe estrutural e (d) composição atômica. **128**

Figura 19. Composição química dos bioprodutos da atividade biológica sobre a MOD intracelular, inicial (painéis a e c) e pré irradiada (painéis b e d), de *Microcystis aeruginosa*: (a e b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%). **130**

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela I. Critérios de definição dos índices e estruturas moleculares utilizados neste estudo. **34**

Capítulo 2.

Tabela I. Número de compostos identificados por FTICRMS na MOD EXTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB iniciais e irradiadas por 0.5 e 7 dias com radiação UVB. Os valores entre parênteses são a porcentagem que cada componente (fotoproducto ou fotoresistente) representa em relação ao total de compostos das amostras irradiadas; Δ representa a variação no total de compostos das amostras irradiadas em relação às respectivas amostras iniciais; FE é a porcentagem de compostos identificados pelo critério de Forma Estrutural (%); e CA é a porcentagem de compostos identificados pelo critério de Composição Atômica (%). **52**

Tabela II. Número de compostos comuns à MOD EXTRA inicial e MOD BB inicial, pertencentes à diferentes classes estruturais e de composição atômica, e porcentagem que estes compostos comuns representam na MOD BB inicial (%). **63**

Capítulo 3

Tabela I. Tabela I. Caracterização da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* inicial, irradiada, inoculada e irradiada + inoculada: número total de compostos; número e contribuição percentual de compostos resistentes e produzidos devido à atividade biológica e fotoquímica; e contribuição proporcional dos tipos estruturais e de composição atômica (fórmulas químicas). **87**

Tabela II. Comparações entre as massas moleculares (Da) dos grupos de compostos da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* classificados como resistentes e degradados pela atividade biológica e fotoquímica separadamente, e aplicação do teste não paramétrico de Mann Whitney. **99**

Capítulo 4

Tabela I. Caracterização da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* inicial, irradiada, inoculada e irradiada + inoculada: número total de compostos; número e contribuição percentual de compostos resistentes e produzidos devido à atividade biológica e fotoquímica; e contribuição proporcional dos tipos estruturais e de composição atômica (fórmulas químicas).

Tabela II. Comparações entre as massas moleculares (Da) dos grupos de compostos da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* classificados como resistentes e degradados pela atividade biológica e fotoquímica separadamente, e aplicação do teste não paramétrico de Mann Whitney.

Resumo

As atividades fotoquímica e biológica são processos importantes na transformação da matéria orgânica dissolvida (MOD) em ambientes aquáticos. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos destes processos, separadamente e em associação, sobre a MOD produzida pela espécie de cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (extracelular e intracelular), que contribui com grande parte da biomassa fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita. Nossos resultados demonstraram a ocorrência de fotodegradação, mas também de compostos resistentes e de fotoprodutos da exposição da MOD da cianobactéria, que foram identificados também na MOD do reservatório. Isto demonstra a importante contribuição da MOD liberada por *M. aeruginosa* na MOD deste ambiente. A pré exposição da MOD excretada pela cianobactéria (extracelular) à radiação UV causou subsequente redução em sua biodisponibilidade devido à competição entre os dois processos, i.e., a irradiação removeu a porção biodegradável da MOD. A biodisponibilidade da MOD intracelular não foi significativamente alterada pela pré exposição à UV. A análise detalhada de sua composição química demonstrou a ocorrência de processos opostos, i.e., competição entre foto e biodegradação e formação de fotoprodutos lábeis à atividade biológica, que equilibrou os efeitos negativos e positivos da radiação sobre a biodegradabilidade da MOD intracelular.

Abstract

Photochemically and biologically mediated reactions are key processes on the transformation of dissolved organic matter (DOM) in natural waters. The aims of this study were to evaluate these isolated and coupled processes over the DOM produced by the Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, which contributes with great amounts of biomass in the Barra Bonita Reservoir. Our results showed that photodegradation occurred, but also showed that there were cyanobacterial photoresistant molecules and photoproducts that were identified in the Reservoir's DOM. Pre exposure of the DOM released by *M. aeruginosa* caused decrease in bioavailability of this type of DOM due to competition, i.e., removal of the biolabile portion of the DOM by irradiation. The bioavailability of intracellular DOM was not significantly altered by pre exposure to UV radiation. Detailed chemical characterization showed that competition between photo and biodegradation and photoproduction of biolabile compounds, equilibrated negative and positive effects of irradiation on the bioavailability of the intracellular DOM.

Capítulo 1. Apresentação

1.1 Introdução

Devido à redução na camada de ozônio, o estudo dos efeitos da radiação UV sobre o ciclo do carbono em ambientes aquáticos tem recebido mais atenção nas últimas décadas (Harrison e Smith 2009). A matéria orgânica dissolvida (MOD) compõe uma porção substancial do carbon orgânico total em sistemas aquáticos e a degradação microbiana (Azam e Cho 1987, Lampert e Sommer 1997, Wetzel 2001), juntamente com reações fotoquímicas (Mopper et al. 1991, Mopper e Kieber 2000), são os principais processos que afetam a MOD, quanto à composição e concentração (Bertilsson et al. 2004).

A radiação primariamente afeta a porção cromofórica da MOD (MOD-C), i.e., o grupo de compostos sensível à radiação por ser capaz de absorvê-la, e vários estudos mostraram que a redução da absorbância da MOD-C está correlacionada com fotooxidação e produção de carbono inorgânico dissolvido (CID), como dióxido (CO_2) e monóxido de carbono (CO) (Miller e Zepp 1995, White et al. 2010). Alterações nas propriedades ópticas podem indiretamente demonstrar alterações químicas na MOD (Morris e Hargreaves 1997) pelo cálculo de vários índices baseados na absorbância em comprimentos de onda específicos (De Haan e De Boer 1987, Summers et al. 1987, Weishaar et al. 2003). Entretanto, levando em consideração que alguns tipos de MOD podem ser compostos por uma pequena porção cromofórica, a relação entre as mudanças nas propriedades ópticas e químicas da MOD mediadas pela radiação UV ainda é pouco compreendida (Osburn et al. 2001).

O efeito líquido das alterações fotoquímicas na MOD pode ser a produção de substratos lábeis ou recalcitrantes (Harvey et al. 1983, Naganuma et al. 1996, Gobler et al. 1997) e parece variar de acordo com o tipo de radiação (Choi et al. 2004), comunidade microbiana e composição inicial da MOD (Benner e Biddanda 1998). Considerando que parte da MOD em águas eutrofizadas é produzida e liberada principalmente pelo fitoplâncton, uma avaliação do

efeito da radiação UV sobre a composição da MOD fitoplanctônica e sobre sua biodisponibilidade é importante para uma maior compreensão do processo de decomposição e do fluxo de carbono nestes ambientes. Embora estudos acerca dos efeitos líquidos da fotólise sobre a MOD sejam numerosos, é notável a ausência de uma abordagem direcionada à MOD oriunda de populações naturais, principalmente de cianobactérias, frequentemente dominantes em ambientes de água doce tropicais. A MOD composta pelos produtos de origem fitoplanctônica é considerada lábil, suscetível à degradação bacteriana (Munster e Chrost 1990, Wetzel 2001), e pode ser resultado de excreção ativa de produtos da fotossíntese ou da lise celular e liberação do conteúdo intracelular para o meio.

Microcystis aeruginosa (Kutzing) é uma espécie potencialmente tóxica de cianobactéria (Carmichael 1992) muito comum em ambientes de água doce do mundo todo (Reynolds e Walsby 1975, Gilroy et al. 2000, Janse et al. 2004, Marshal 2009). Uma de suas características fisiológicas que confere vantagens competitivas com relação às demais espécies da comunidade fitoplanctônica é o fato das células produzirem internamente vesículas de gás como parte de um mecanismo de regulação de flutuação. Este mecanismo permite que as células em colônias regulem sua densidade e conseqüentemente sua posição na coluna d'água, otimizando a utilização da radiação solar e sombreando as demais espécies. Devido a estas adaptações fisiológicas, *M. aeruginosa* forma constantes e massivos florescimentos, principalmente em reservatórios eutróficos como o reservatório de Barra Bonita (rio Tietê, SP, Brasil, 22°29'S, 48°34'W), de onde a cepa de *M. aeruginosa* utilizada neste estudo foi isolada.

O reservatório de Barra Bonita é uma das represas artificiais do sistema de reservatórios em cascata do rio Tietê. A barragem está localizada a cerca de 250 km da cidade de São Paulo e 30 km do ponto onde o rio Piracicaba deságua no rio Tietê (Giroldo 2003, Gouvêa 2004). Os dois rios atravessam áreas urbanizadas, industriais e agrícolas. A grande quantidade de nutrientes proveniente do despejo de resíduos das atividades realizadas nestas áreas faz com que a produção de biomassa fitoplanctônica do reservatório seja alta. Além disso, o reservatório está

localizado numa região subtropical, portanto caracterizada por alta incidência de radiação solar, que favorece tanto a fotossíntese e a produção autóctone de matéria orgânica, quanto a ocorrência de reações fotoquímicas.

No reservatório de Barra Bonita, *M. aeruginosa* é uma das espécies dominantes (Dellamano-Oliveira et al. 2008) e produz florescimentos massivos ao longo do ano, especialmente nos meses de verão, quando há menos vento e turbulência (Vieira et al. 2008), condições que permitem que as células flutuem formando densas camadas na superfície da água. A dominância de *M. aeruginosa* no reservatório, especialmente durante e após florescimentos, resulta na presença de grandes quantidades de MOD autóctone excretada, por liberação ativa ou passiva, e intracelular, com a morte e lise das células.

1.2 Hipótese

A exposição da MOD produzida por *Microcystis aeruginosa* à radiação UV altera a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, seu destino em sistemas onde a cianobactéria é abundante, como o reservatório de Barra Bonita. A caracterização desta MOD e das transformações às quais está sujeita, mediadas pela atividade microheterotrófica e fotoquímica, separadamente e em associação, contribuem para elucidar os mecanismos pelos quais a biodisponibilidade e, conseqüentemente, as associações *M. aeruginosa*/bactérias, são afetadas pela radiação UV.

1.3 Objetivos

(1) Caracterizar a MOD produzida em culturas axênicas por *M. aeruginosa*, excretada (extracelular) e intracelular, e a MOD do reservatório de Barra Bonita.

(2) Identificar as alterações causadas pela atividade fotoquímica sobre a MOD do reservatório de Barra Bonita e pelas atividades microbiológica e fotoquímica, separadamente e em associação, sobre a MOD de *M. aeruginosa* (extracelular e intracelular).

(3) Avaliar os efeitos da exposição da MOD de *M. aeruginosa* à radiação UV sobre sua biodisponibilidade e as transformações químicas responsáveis por estes efeitos.

1.4 Técnicas

Diversas técnicas foram utilizadas ao longo deste estudo e serão mencionadas posteriormente no decorrer das análises dos resultados. Para fins práticos, estas técnicas foram listadas e descritas detalhadamente nos itens 1.4.1 a 1.4.5. A caracterização da MOD foi feita pela avaliação de suas propriedades ópticas e químicas. Análises da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) e fluorescente (MOD-F) foram utilizadas para caracterização das propriedades ópticas da MOD. A técnica de espectrometria de massa *Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectra* (FTICRMS) possibilitou a caracterização química da MOD. A avaliação da biodisponibilidade foi baseada nas análises de concentração de carbono orgânico da MOD, realizadas para quantificar remoção de material orgânico pelas bactérias; e nas medidas de incorporação de timidina tridiada (H^3 - Timidina) pelas células, que foram utilizadas como parâmetro de produtividade bacteriana. Os efeitos da irradiação da MOD sobre sua biodisponibilidade foram elucidados pela caracterização química fornecida por FTICRMS.

1.4.1 Análises da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C)

Análises do espectro de absorvância da MOD-C de 250 a 700 nm em intervalos de 1 nm permitiram identificar a produção e degradação de compostos cromofóricos mediadas pela radiação e pela atividade bacteriana. Os espectros de absorvância foram obtidos em espectrofotômetro de feixe duplo de luz (Agilent 8453) equipado com cuvetta de quartzo de 5 cm. Água ultrapura foi utilizada como referência e as amostras foram analisadas em duplicatas.

Os valores de absorvância foram transformados em coeficientes de absorvância (a) por metro (m^{-1}) de acordo com a equação (1) e variações na linha de base causadas pela difusão da luz pelas moléculas presentes na MOD-C foram eliminadas subtraindo-se a média de a em 750 nm até a em 800nm (Green e Blough 1994).

$$a = 2.303A * L^{-1} \quad (1)$$

onde A = valor de absorvância e L = caminho óptico da cuvetta (em metros).

A massa molecular média da porção cromofórica da MOD pode ser calculada com base na razão entre os coeficientes de absorvância em 250 e 365 nm ($a_{250}:a_{365}$). De acordo com De Haan e De Boer (1987), compostos aromáticos de baixa massa molecular presentes na MOD-C absorvem luz em 250 nm e conforme a massa molecular ou o número de anéis aromáticos aumentam na MOD-C, a absorvância desses compostos muda para comprimentos de onda mais longos, sendo máxima em 365 nm. As variações na razão $a_{250}:a_{365}$ são inversamente proporcionais à variação na massa molecular média da MOC-C, ou seja, o aumento na razão indica diminuição da massa molecular, e vice-versa. A redução média na massa molecular pode ser causada por degradação completa preferencial de compostos de alta massa molecular, i.e., fotooxidação ou degradação biológica completa de matéria orgânica e sua transformação em CO e CO₂, ou degradação parcial, ou seja, quebra de compostos de alta massa em compostos menores, de baixa massa molecular. Por outro lado, o aumento médio na massa molecular da MOD-C pode ser resultado da degradação completa preferencial de compostos de baixa massa molecular, ou pela produção de compostos de alta massa, seja por meio de reações de condensação mediadas pela radiação ou por excreção microbiana de compostos cromofóricos de alta massa. As reações de condensação fotoinduzidas podem envolver também compostos originalmente não cromofóricos, de baixa ou alta massa molecular, que passam a apresentar propriedades ópticas devido à condensação. É muito importante salientar que as variações na massa molecular calculadas a partir das medidas de absorvância devem ser restritas à porção cromofórica da MOD (MOD-C) e não necessariamente extrapoladas para toda a MOD, especialmente se a fração cromofórica representar pequena proporção, ou proporção desconhecida da MOD total.

1.4.2 Análises da matéria orgânica dissolvida fluorescente (MOD-F).

A análise da porção fluorescente da MOD foi realizada por meio de análises de matrizes de emissão e excitação (*emission-excitation matrices, EEM*) tri-dimensionais de fluorescência. As amostras foram analisadas em duplicatas. As matrizes foram geradas em um

espectrofluorímetro (Fluoromax 2), equipado com cuveta de quartzo de 1 cm, de acordo com Spencer et al. (2007). Para cada amostra, as matrizes foram construídas pela compilação de 45 espectros de emissão (Em) no intervalo de 280 a 500 nm, com incremento de 1 nm, com excitação (Ex) em comprimentos de onda de 200 a 420 nm, em intervalos regulares de 5 nm. As aberturas de banda dos monocromadores de emissão e excitação foram estabelecidas em 5 nm. EEMs de alíquotas de água ultrapura foram obtidas diariamente e utilizadas como referência. As representações gráficas das EEMs apresentam intensidade de fluorescência no eixo z, em função dos comprimentos de onda de excitação no eixo y, e de emissão no eixo x.

Em seguida foi realizada a correção das EEMs, feita em três passos: (i) normalização da fluorescência da MOD pela fluorescência do pico Raman detectado na água ultrapura (referência); (ii) correção dos efeitos da absorbância da MOD na fluorescência (Bashford e Harris 1987) por meio da equação (2) e (iii) remoção de áreas de emissão < 300 nm e excitação < 240 nm das EEMs, devido à baixa razão entre sinal e ruído nestas áreas das matrizes.

$$I = I_0 (10^{-b(A_{Em} + A_{Ex})}) \quad (2)$$

Na equação (2), I é a fluorescência detectada; I_0 é a fluorescência na ausência de auto-absorbância; o fator b assume que os feixes de emissão e excitação somente passam por metade do caminho óptico da cuveta; e A_{ex} e A_{em} são valores de absorbância da amostra nos respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão (Ohno 2002). A correção utilizando valores de absorbância deve ser feita em amostras com alta concentração de MOD, cuja absorção de luz pelos cromóforos interfere na excitação e emissão de fluorescência da amostra, sub-estimando sua intensidade (Bashford e Harris 1987).

Um modelo PARAFAC (*parallel factor analysis*) foi utilizado para identificação e quantificação dos picos de fluorescência (Stedmon et al. 2003). Esta análise é realizada com base em uma biblioteca de EEMs à qual são aplicadas análises estatísticas. O modelo identifica picos que estão sistematicamente presentes nas EEMs da biblioteca, mesmo que variando em termos de intensidade. Novas EEMs para cada amostra são construídas com base no modelo; os

fluoróforos observados nas EEMs originais são então comparados um a um com os fluoróforos preditos pelo modelo, no que se refere à posição (intervalos de emissão e excitação dos picos) e à intensidade de fluorescência, para checar a precisão do modelo aplicado. As diferenças entre os fluoróforos observados e preditos pelo modelo são o resíduo; um modelo adequado prediz fluoróforos cujas posição e intensidade dos picos são similares àquelas dos fluoróforos observados, e portanto, apresenta resíduos próximos de zero. Desta maneira, uma vez que o modelo é considerado adequado, o cálculo das intensidades de fluorescência de cada pico das EEMs pode ser utilizado como parâmetro semi-quantitativo da MOD-F.

Um máximo de quatro picos foram identificados nas EEMs (Figura 1) e agrupados em três categorias pelo modelo PARAFAC, embora nem todos eles tenham sido encontrados nos três tipos de MOD estudados. A caracterização dos picos foi feita com base em estudos previamente publicados acerca da identificação de componentes da MOD-F de diversos ambientes e de substâncias de referência, principalmente nos trabalhos de Coble et al. (1996) e Huguet et al. (2009). De acordo com estes estudos, proteínas e outros compostos ricos em aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano apresentam fluorescência máxima em 275/350 nm (Ex/Em) (pico T ou); material húmico é composto por dois picos distintos, respectivamente com fluorescência máxima em 270/450 nm (Ex/Em, pico A ou) e em 350/450 nm (Ex/Em, pico C ou ', considerado material húmico de origem terrestre); e o terceiro tipo de fluoróforo foi identificado pelos autores como 'material húmico recente de origem autóctone' e apresenta fluorescência máxima em 315/400 nm (Ex/Em, pico M ou). Esta terminologia 'material húmico recente de origem autóctone' é utilizada por autores que analisam amostras de MOD de águas naturais, nas quais a MOD é uma mistura de material autóctone e alóctone. No caso do presente estudo, todos os picos identificados na MOD de *M. aeruginosa* são, obviamente, de origem autóctone e recentes e, por esse motivo, mantivemos a terminologia mais simples de 'material ou pico M' para nos referirmos a este tipo de fluoróforo ao longo do texto. Além disso, os fluoróforos compostos por 'material húmico' remetem na realidade à compostos com

características ópticas semelhantes ao material húmico encontrado em amostras naturais e não ao material resultante do processo de humificação propriamente dito. A análise por PARAFAC agrupou estes fluoróforos nas três categorias: material protéico (pico T), material húmico (pico A + pico C) e material M.

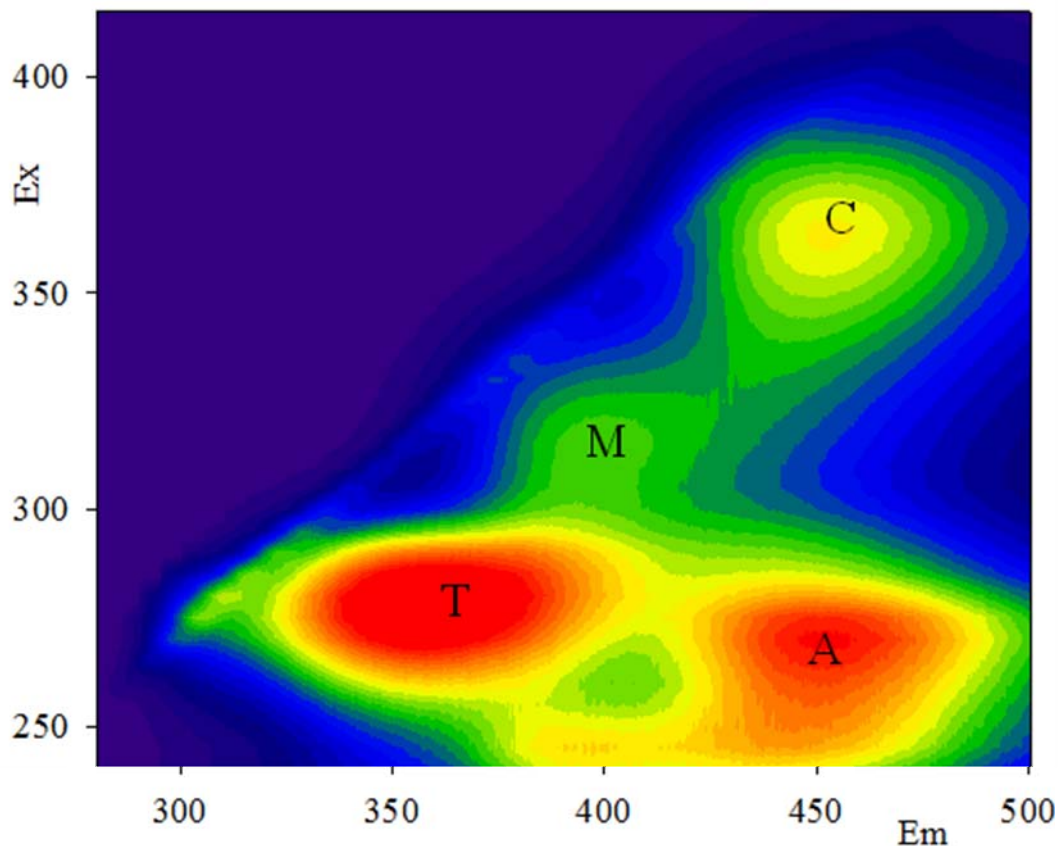


Figura 1. Exemplo de EEM (MOD-F extracelular da cultura de *Microcystis aeruginosa*) e localização dos fluoróforos identificados neste estudo. T = material protéico; A = material húmico, C = material húmico de origem terrestre, e pico M.

1.4.3 Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRMS)

A espectrometria de massa para amostras naturais de MOD por FTICRMS demanda uma etapa inicial de ionização da amostra, que transforma moléculas polares em moléculas carregadas, ou íons e, portanto, esta técnica se restringe à porção ionizável da MOD. ESI (*electrospray ionization*) foi o tipo de ionização utilizado, que ocorre em pressão atmosférica e é considerado um processo ‘delicado’ de ionização, que não degrada as moléculas da amostra.

Este processo foi descrito em detalhe por Gaskell (1997). Em resumo, a amostra líquida de MOD é injetada de maneira a formar um *spray* ou nuvem, ou seja, a amostra é nebulizada em gotículas minúsculas no momento que é injetada na câmara de ionização (Apollo II), preenchida com gás nitrogênio ultrapuro. Nesta câmara é aplicada uma diferença de voltagem, o que faz com que as moléculas se tornem ionizadas, seja pelo ganho ou perda de um próton. O tipo de íon em que as moléculas são transformadas, se cátion ou ânion, depende do sinal da diferença de voltagem aplicada na câmara, se negativa ou positiva. O acúmulo de cargas e as interações do tipo carga-carga entre os íons nas gotículas do *spray* de amostra reduzem-na a gotículas ainda menores dentro da câmara. Quando o solvente é completamente evaporado, a MOD, agora formada por íons, é mantida na fase gasosa na câmara de ionização do aparelho. Estes íons acumulam em um hexapolo por 2 seg antes de serem transferidos para a célula de ressonância (Bruker Daltonics 12 Tesla Apex Qe), onde a intensidade do sinal emitido por cada íon é plotada em função de sua massa/carga (m/z) em um intervalo de 190 a 1000 m/z . As moléculas na MOD que sofrem o processo de ionização por ESI são carregadas com uma única carga (*single charged*, $z = 1$) e, portanto, m/z representa o intervalo de massa, em Daltons, das moléculas da MOD. O número de corridas, i.e., ciclos de ionização – acúmulo de íons no hexapolo – tradução do sinal da célula de ressonância – varia de acordo com o potencial de ionização da MOD em estudo. A calibração externa do aparelho é feita pela injeção de uma solução de polietilenoglicol (PEG) para verificar a eficiência da ionização e da célula de ressonância.

A preparação das amostras para análise por FTICRMS consiste em adicionar 100 a 200 μL de metanol ao mesmo volume da amostra aquosa de MOD (50:50, v/v). Quando analisada no modo negativo de ionização, a solução de metanol utilizada contém 0.1 % de hidróxido de amônio, e quando analisada no modo positivo, a solução de metanol contém 0.1 % de ácido fórmico. Neste trabalho, algumas amostras foram ionizadas em modo negativo, e outras no modo positivo; 300 corridas foram realizadas para cada amostra. A escolha do modo de operação negativo ou positivo depende das características da MOD em estudo. De maneira

geral, as moléculas encontradas na MOD apresentam maior tendência a perder do que a ganhar um próton e portanto, o modo negativo de operação tem sido mais utilizado para MOD de águas naturais (Mopper et al. 2007, Sleighter e Hatcher 2007). A utilização de um ou outro modo de ionização não necessariamente resultará em caracterização idêntica da mesma amostra de MOD, já que diferentes tipos de moléculas serão ‘selecionadas’, dependendo do modo de operação escolhido. Por exemplo, compostos contendo grupos fosfatados (PO_4) tendem a perder um próton, mas não a ganhar, e portanto são identificáveis pelo modo negativo de análise, e ‘invisíveis’ quando a MOD é analisada no modo positivo. Por outro lado, compostos como as proteínas e aminoácidos, por possuírem um grupo amina (NH_2), que tem tendência a ganhar um próton (NH_3^+) e um grupo carboxílico (COOH), com tendência a perder um próton (COO^-), serão ionizados pelos dois métodos. A presença de sais em geral, por exemplo NaCl em amostras de águas oceânicas e os componentes de meios de cultura, interferem na análise por FTICRMS, pois são altamente ionizáveis e, portanto competem com as moléculas orgânicas da MOD no processo de ionização, especialmente se a MOD estiver em baixas concentrações. A relação entre concentração de sais e de MOD na amostra é, portanto, fundamental para obtenção de um espectro de massa representativo da porção orgânica da amostra.

O espectro de massa obtido pela análise por FTICRMS de uma amostra de MOD é formado por centenas de picos, sendo que, teoricamente, cada pico representa um íon/molécula da MOD. Para nossas amostras analisadas no modo negativo, a calibração interna do espectro (posição dos picos) foi feita com uma lista de massas moleculares exatas de ácidos graxos, uma classe de moléculas naturalmente presente em amostras de MOD e que tem alta eficiência de ionização no modo negativo (Lee 2005), no intervalo de massa de 200 até 450 m/z, com resolução menor do que 1 ppm. As amostras analisadas pelo modo positivo foram internamente calibradas com uma lista de compostos criada a partir da própria amostra de 200 a 700 m/z, com resolução média de 0.2 ppm e máxima de 0.6 ppm.

Cada molécula identificada pela técnica apresenta massa molecular exata, com precisão de até 5 casas decimais. A partir dos valores de massa molecular exata, as fórmulas moleculares de cada molécula do espectro foram determinadas, considerando que as moléculas devem ser formadas por um intervalo (mín e máx) de número de átomos de Carbono (^{12}C , mín 8, máx 50), Hidrogênio (^1H , mín 8, máx 100) e dos heteroátomos Oxigênio (^{16}O , mín 0, máx 30), Nitrogênio (^{14}N , mín 0, máx 16), Enxofre (^{31}S , mín 0, máx 2) e Fósforo (^{32}P , mín 0, máx 2). Além dos números absolutos de cada tipo de átomo, as razões entre eles consideradas quimicamente possíveis foram estabelecidas para a definição das fórmulas moleculares, sendo elas: $\text{O/C} < 1.2$; $0.3 > \text{H/C} < 2.25$; $\text{N/C} < 0.5$; $\text{S/C} < 0.2$; $\text{P/C} < 0.1$ e $(\text{S+P})/\text{C} < 0.2$ (P para as análises feitas no modo negativo apenas). Estes números foram processados pelo *software Molecular Formula Calculator* e por programação inserida no *software MATLAB*. Com base em todos estes critérios, uma única fórmula química possível é determinada para os compostos de baixa massa molecular ($m/z < 300$ Da); conforme m/z aumenta, o número de fórmulas matemática e quimicamente possíveis para um só pico aumenta também. Isto acontece porque, para os compostos de alta massa molecular, a resolução da técnica disponível até o momento não é alta o suficiente e, portanto, um só pico é visível no espectro, mas ele pode na verdade representar mais de uma molécula. Por este motivo, ao invés de simplesmente escolher uma das fórmulas químicas dentre as possíveis, nós optamos por analisar apenas o grupo de compostos definidos por uma única fórmula molecular possível. Dentro do intervalo de m/z que foi internamente calibrado, a porcentagem de compostos com uma única fórmula molecular possível foi em média de 65 % para nossas amostras.

A lista final de compostos e suas respectivas fórmulas moleculares e massas moleculares exatas foram utilizadas para o cálculo de vários parâmetros úteis na interpretação dos resultados. Os espectros propriamente ditos não foram apresentados por que fornecem muito pouca informação discernível visualmente. Ao invés deles, outros tipos de plotagens dos dados, mais esclarecedoras, foram realizadas. As razões entre o número de átomos de Hidrogênio e Oxigênio

pelo número de átomos de Carbono (H/C e O/C) em cada molécula são comumente usadas na produção do diagrama de Van Krevelen (Van Krevelen 1950), que é uma representação gráfica que permite a visualização da abundância de compostos pertencentes à diferentes classes moleculares. Um exemplo do diagrama de Van Krevelen é apresentado na Figura 2. As classes de biomoléculas apresentadas na Figura 2 foram estabelecidas de acordo com valores teóricos de H/C e O/C. Considerando que a composição da MOD pode ser complexa e ainda variar devido aos processos de transformação, o diagrama não deve ser interpretado como um método definitivo de identificação das moléculas de uma amostra de MOD, mas como um guia para a provável classificação dos compostos. O diagrama de Van Krevelen é muito utilizado para comparação de amostras no intuito de identificar processos de degradação, produção e intercâmbio de moléculas, além das reações químicas representadas pelas letras A – D.

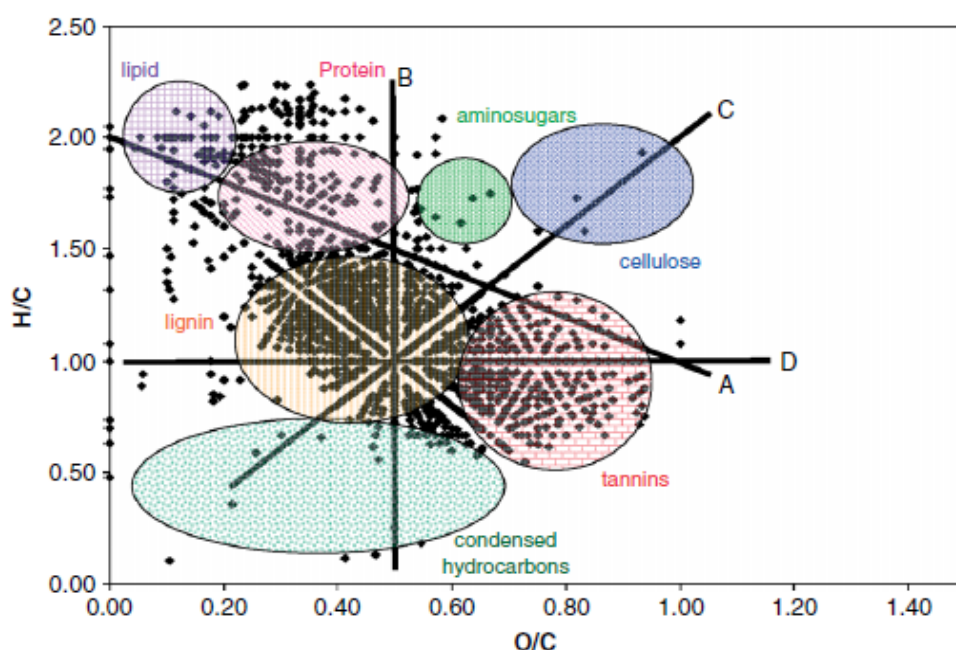


Figura 2. Diagrama de Van Krevelen mostrando as regiões onde classes de moléculas estão representadas com base em razões H/C e O/C teóricas. As letras representam reações químicas: (A) Metilação/Demetilação; (B) Hidrogenação/Dehidrogenação; (C) Condensação/Hidratação (adição de grupos OH); (D) Oxidação/Redução. Fonte: Sleighter e Hatcher (2007).

Diversos cálculos baseados nas fórmulas químicas e nas massas moleculares exatas das moléculas foram realizados a fim de obter uma classificação dos compostos identificados por FTICRMS. A massa molecular média da MOD foi calculada pela soma das massas exatas de todas as moléculas dividida pelo número total de moléculas de uma amostra. A fim de identificar tendências de alterações nas massas moleculares causadas pelos processos estudados, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado à massa molecular de diferentes grupos de compostos. O equivalente de duplas ligações (*double bond equivalent*, DBE) é o cálculo do número de duplas ligações e de anéis aromáticos na MOD, e quando normalizado pelo número de átomos de carbono das moléculas (DBE/C), pode ser utilizado como um índice de aromaticidade da amostra. O DBE pode ser normalizado também pelo número de átomos de hidrogênio e oxigênio das moléculas. Os valores normalizados de DBE são, por sua vez, utilizados na identificação de diversas formas químicas estruturais como: estruturas condensadas ricas em anéis aromáticos (*Condensed Aromatic Ring Structures*, CARS, Hockaday et al. 2006), compostos alifáticos (longas cadeias de carbono sem anéis aromáticos ou alicíclicos, Perdue et al. 1984) e moléculas alicíclicas (com anéis não aromáticos) ricas em grupos carboxílicos (COOH) (*Carboxylic-rich alicyclic molecules*, CRAM, Hertkorn et al. 2006). O resumo dos critérios para definição e cálculo destes índices está listado na Tabela I.

Tabela I. Critérios de definição dos índices e estruturas moleculares utilizados neste estudo.

Índice	Critério(s) de definição
Massa molecular média	Soma das massas exatas dividida pelo número total de picos
DBE/C	$DBE = [\frac{1}{2} * (2 * \#C + \#N + \#P - \#H + 2)] / \#C$
CARS	$DBE/C \geq 0.7$
Alifáticos	$DBE/C \geq 0.3$ and $H/C \geq 1$
CRAM	$0.68 < DBE/C < 0.77$; $1.75 < DBE/O < 0.77$; $0.75 < DBE/H < 0.2$

= número de átomos

1.4.4 Carbono orgânico dissolvido

Medidas de concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) da MOD foram realizadas pelo método de combustão (Sharp et al. 1993) a 720° com oxigênio ultrapuro. As amostras foram analisadas em um aparelho TOC-V cph (Shimadzu) pelo método NPOC (*non-purgable organic carbon*) e os valores de COD foram expressos em ppm e representam a média de 3 de um total de 5 injeções de cada amostra com valores máximos de coeficiente de variação (CV) e de desvio padrão estabelecidos em 2 % e 0.1, respectivamente. O método NPOC consiste na injeção da amostra cujo pH foi previamente reduzido para 2.8 – 3.0 e aeração com gás oxigênio ultrapuro por 1.5 min para eliminação do carbono inorgânico e, em seguida, transferência para a câmara de combustão.

1.4.5 Produtividade bacteriana

A avaliação da produtividade bacteriana foi baseada no cálculo das taxas de incorporação de timidina tritiada (H^3 -Timidina) ao DNA bacteriano, de acordo com o método de microcentrifugação descrito por Smith e Azam (1992). Embora este método seja referente à produção bacteriana medida por assimilação de C^{14} -leucina, os autores afirmam que o procedimento pode ser utilizado também para a assimilação de H^3 -timidina. Em resumo, 8 alíquotas de 1.5 mL de amostra das culturas bacterianas são transferidas para tubos de plástico de 2 mL e 10 μ L de uma solução de H^3 -timidina a 57 μ Ci ou 0.74 nmol (atividade específica: 77 Ci $mmol^{-1}$, Amersham) são adicionados às amostras. A 4 das 8 réplicas, são imediatamente adicionados 100 μ L de solução de ácido tricloroacético (TCA) 79 %, para interromper o metabolismo bacteriano nestas réplicas e, desta maneira, utilizá-las como medidas iniciais (t_0). As outras 4 réplicas são mantidas vivas e incubadas em temperatura ambiente por 4 horas (t), tempo suficiente para que ocorra a assimilação mensurável de H^3 -timidina pelas células ativas. Após este período, a assimilação de H^3 -timidina é interrompida nas réplicas vivas pela adição de

100 μ L de TCA 79 %. Em seguida, todas as réplicas foram lavadas por múltiplas centrifugações para remoção da H^3 -timidina em excesso, não incorporada, e também do TCA, e para lavagem das células. A primeira centrifugação é feita a 10.000 g por 15 min e o sobrenadante é descartado; em seguida, adiciona-se 1.5 mL de TCA 5 % aos tubos e centrifuga-se novamente a 10.000 g por 7 min; o sobrenadante é novamente descartado e 1.5 mL de etanol 80 % gelado são adicionados aos tubos. Finalmente, as amostras são centrifugadas a 10.000 g por 7 min, descartando-se o sobrenadante. Os tubos contendo as células bacterianas sedimentadas pela centrifugação foram mantidos em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas, até que o etanol evaporasse completamente. As células são então ressuspensas em 1.5 mL de solução de cintilação (Cole-Parmer) e a radioatividade nos tubos é medida em unidades de DPM (desintegrações por minuto, Tri Carb Packard HP). A taxa de incorporação de H^3 -timidina foi calculada de acordo com a equação (3) (Wetzel e Likens 1991):

$$\text{Taxa de incorporação de } H^3\text{-timidina (nmol.L}^{-1}\text{.h}^{-1}) = \frac{(DPM_t - DPM_{t_0}) * 1.01 * 1000}{1.71 * 10^8 * v * t} \quad (3)$$

Onde, DPM_t = DPM das amostras incubadas vivas por 4 h; DPM_{t_0} = DPM das amostras controle, ‘mortas’ antes da incubação; 1.01 = fator de diluição pela adição de TCA; 1000 = fator de multiplicação para cálculo da taxa por litro; $1.71 * 10^8$ = atividade específica da H^3 -timidina utilizada; v = volume inicial de amostra utilizado nas incubações; e t = tempo de incubação.

Amostras de H^3 -timidina em água ultrapura em concentrações no intervalo de 0.25 a 250 nmol foram utilizadas para avaliar os limites de detecção do aparelho medidor de radioatividade (R^2 médio = 0.9998) e a reprodutibilidade das medidas. Todas as medidas de radioatividade em nossas amostras foram acompanhadas de medidas nestas amostras de referência.

Capítulo 2. Caracterização e mudanças induzidas pela radiação UV na MOD produzida por *Microcystis aeruginosa* em culturas axênicas e MOD do reservatório de Barra Bonita em função do tempo de irradiação.

2.1 Objetivos

(1) Caracterizar a MOD extracelular e intracelular produzida *M. aeruginosa*, em culturas axênicas, e do reservatório de Barra Bonita.

(2) Avaliar as mudanças nestes três tipos de MOD causadas pela radiação UVA e UVB em função do tempo de exposição.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Nomenclatura e definição dos tipos de MOD estudados

MOD EXTRA, definida como a matéria orgânica dissolvida extracelular menor do que 0.22 μm presente nas culturas axênicas de *M. aeruginosa* após 60 dias de cultivo;

MOD INTRA, definida como a matéria orgânica interna às células, que foi liberada para o meio externo devido à lise celular;

MOD BB, matéria orgânica dissolvida menor do que 0.22 μm presente na água do reservatório de Barra Bonita.

2.2.2 Obtenção da MOD

A cianobactéria *M. aeruginosa* (cepa BB005), isolada do reservatório de Barra Bonita e mantida na coleção de culturas de microalgas do Departamento de Botânica da UFSCar (WDCM No. 835), foi cultivada em condições axênicas para obtenção da MOD EXTRA e MOD INTRA. As culturas axênicas foram preparadas em 3 L de meio de cultura ASM-1, pH 7 (Gorham et al 1964), previamente autoclavado (121° C, 40 min) em frascos de borosilicato de 4

L. A transferência do inóculo axênico foi feita assepticamente em fluxo laminar e as culturas foram mantidas em sala acondicionada a 23°C (± 1), com ciclo luz:escuro de 12:12 h e intensidade de luz de 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas de 40 W do tipo 'luz do dia'. As culturas foram aeradas por agitação manual dos frascos, duas a três vezes ao dia.

MOD EXTRA: Após 60 dias de cultivo, ao final da fase exponencial do crescimento, as células foram separadas da MOD extracelular da cultura por filtração tangencial em cartuchos com membranas de polipropileno de 0.22 μm de diâmetro de poro (Pellicon Millipore), sob pressão máxima de 10 psi. O sistema de filtração foi pré-lavado com solução de NaClO 5 % e enxaguado várias vezes com água ultrapura antes e após a filtração. A MOD extracelular menor que 0.22 μm foi utilizada nos experimentos.

MOD INTRA: A amostra de células isoladas do material extracelular foi concentrada durante a filtração tangencial descrita anteriormente e imediatamente congelada para obtenção da MOD intracelular. Após duas semanas no *freezer*, o concentrado de células foi descongelado e mantido em banho de ultrassom por 15 min. Este ciclo de congelamento-descongelamento-sonificação foi repetido várias vezes para garantir a ruptura da maior parte das células. Em seguida, a amostra foi filtrada a vácuo em três etapas consecutivas em filtros de 10, 5 e 0.7 μm de diâmetro de poro, para retirada das células inteiras resistentes ao procedimento e outras partículas maiores, e obtenção da MOD intracelular dissolvida. Finalmente, a amostra foi assepticamente filtrada em sistema de filtração tangencial em cartuchos com membranas de 0.22 μm de diâmetro de poro e a MOD coletada, menor que 0.22 μm , foi utilizada nos experimentos. A eficiência deste procedimento foi verificada experimentalmente por meio de contagem de células antes e após os ciclos congelamento-descongelamento-sonificação, e por medidas de carbono orgânico dissolvido ao longo das etapas de filtração (dados não apresentados), e mostraram que a maioria das células (90 %) foi lisada e a maior parte do carbono orgânico intracelular (80 %) foi obtido na fração menor que 0.22 μm por este procedimento.

MOD BB: Amostras de água do reservatório de Barra Bonita foram coletadas em várias profundidades (0, 1, 3, 7, 10, 15 e 18 m) com uma garrafa e sistema de mangueiras previamente autoclavados, que impediram a contaminação com bactérias do ar. As amostras das diferentes profundidades foram coletadas na mesma garrafa e misturadas em igual volume para obtenção de uma amostra de água integrada da coluna d'água. No dia da coleta, havia um grande florescimento de *Microcystis* sp que cobria a superfície da água no ponto de coleta. No laboratório, a amostra de água foi filtrada em filtros de fibra de vidro pré-calcinados de 1.2 µm de diâmetro de poro para retirada das células fito e zooplantônicas, e outras partículas maiores, e em seguida filtrada em sistema de filtração tangencial com cartuchos de fibra oca de 0.65 µm de diâmetro de poro. A esta amostra foi adicionado cloreto de mercúrio (100 µL.L⁻¹ de uma solução estoque saturada a 70 g.L⁻¹). A amostra foi filtrada tangencialmente em condições assépticas em cartuchos de 0.22 µm de diâmetro de poro imediatamente antes do início do experimento e a MOD coletada, menor que 0.22 µm, foi utilizada nos experimentos.

2.2.3 Experimentação

Separadamente, as amostras de MOD EXTRA e MOD INTRA foram distribuídas assepticamente em tubos de quartzo de 80 mL, mantidos sob lâmpadas ricas em radiação UVA (340 Q-Panel). Este procedimento foi repetido posteriormente e as amostras de MOD EXTRA, MOD INTRA e MOD BB, separadamente, foram expostas à lâmpadas ricas em radiação UVB (Philips). Ambos experimentos foram realizados em sala acondicionada a 20°C para evitar o aquecimento excessivo das amostras. As intensidades de radiação utilizadas nestes experimentos em laboratório foram as mesmas medidas de radiação UVB e UVA que atingem a superfície do reservatório de Barra Bonita: 3 W.m⁻² e 25 W.m⁻², respectivamente. O número de lâmpadas, que variou entre 4 e 12, e o posicionamento das amostras foram adequados de modo a obter estas intensidades de radiação. Para as medidas de radiação realizadas no laboratório foi utilizado um radiômetro IL-1700 (International Light) e sensores específicos para UVA (SUD 240) e UVB

(SED 240). As medidas de radiação feitas na superfície do reservatório de Barra Bonita foram realizadas com um radiômetro EPP 2000 (StellarNet). Nos experimentos realizados com MOD EXTRA e MOD INTRA, irradiadas com UVB e UVA, as amostras foram obtidas após 0.5, 1, 3, 7, 15 e 60 dias de exposição, além da amostra inicial não irradiada. No experimento realizado com a MOD BB, irradiada com UVB, as amostras foram obtidas após 0.5, 1, 2, 4, 7, 11 e 43 dias, além da amostra inicial não irradiada. Em cada amostra foram realizadas as análises descritas no Capítulo 1, com exceção da *Produtividade Bacteriana*. A terminologia MOD inicial ao longo do texto refere-se à MOD não irradiada. Os experimentos com MOD EXTRA e MOD INTRA foram realizados primeiro e, de maneira geral, resultaram em padrões similares de fotoalterações quando realizados com UVA e UVB. Por este motivo, a MOD de Barra Bonita foi exposta apenas à radiação UVB.

2.3 Resultados

2.3.1 Análises da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C)

Como resultado da exposição da MOD EXTRA à radiação UVA e UVB, três principais processos puderam ser observados na sua porção cromofórica (MOD-C, Figura 1a e 1b). Primeiramente, houve redução da absorvância em comprimentos de onda curtos (de 250 a 340 nm) em função do tempo de exposição. Em segundo lugar, ocorreu aumento da absorvância da MOD-C de 340 até 450 nm como resultado da exposição por 0.5 dia. Finalmente, a irradiação de 3 a 60 dias revelou picos de material fotorresistentes na MOD-C, com absorvância máxima em 300, 354 e acima de 420 nm. O primeiro pico de material resistente aparece discernível nos espectros das amostras expostas de 3 a 60 dias. O segundo pico, com absorvância máxima em 354 nm, foi mais visível quando a MOD foi irradiada com UVB. O terceiro não aparece como um pico definido no espectro, mas é representado por um aumento generalizado em absorvância acima de 420 nm, cujos valores nas amostras expostas por 60 dias foram maiores do que os valores na MOD inicial. Os três processos – redução e aumento nos valores de coeficiente de absorvância em diferentes regiões do espectro e a fotorresistência ou fotoprodução de porções

fotorresistentes – demonstram que a MOD excretada por *M. aeruginosa* é composta por produtos com diferentes níveis de susceptibilidade e tipos de reatividade à radiação.

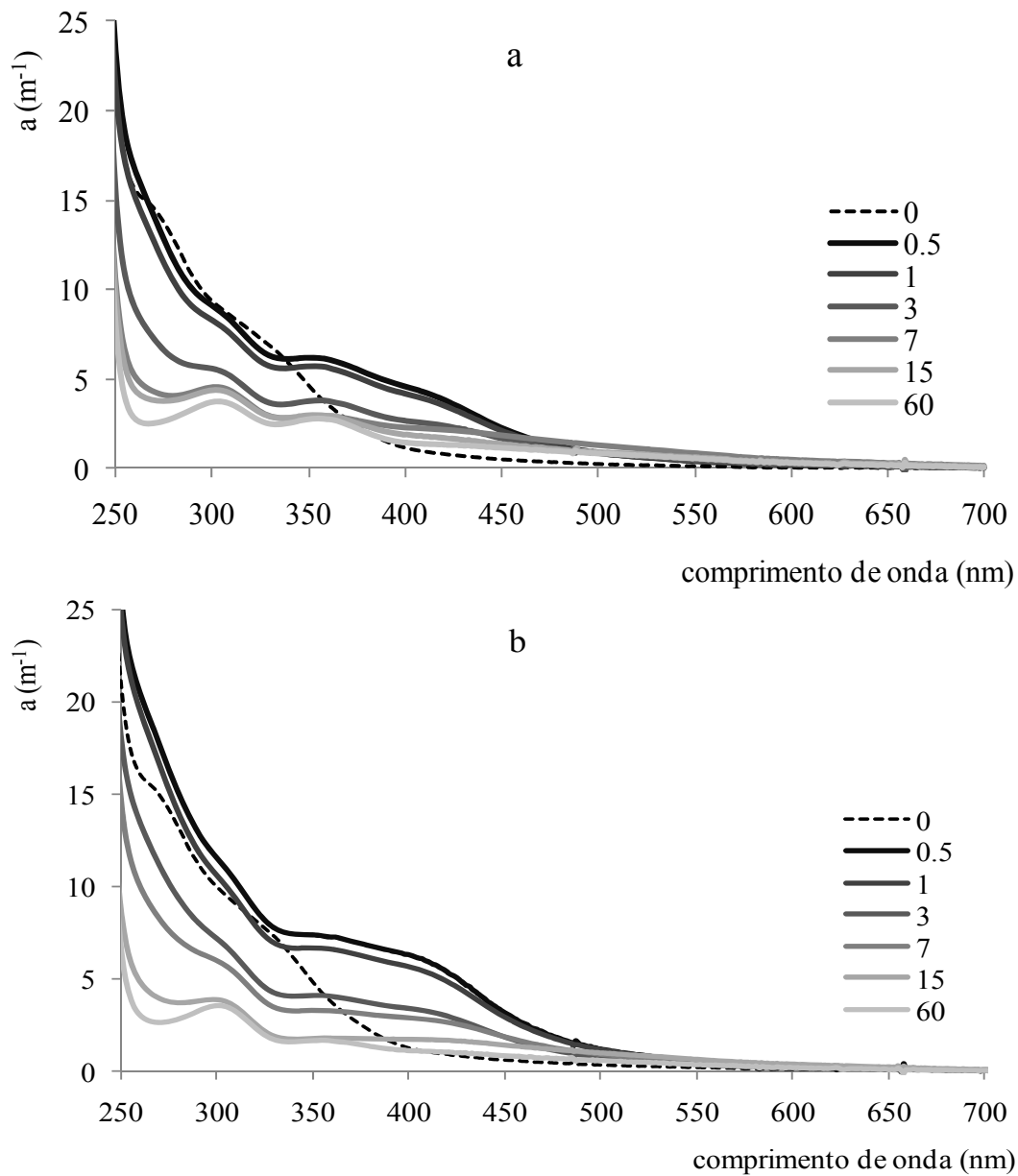


Figura 1. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.\text{m}^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) extracelular liberada por *Microcystis aeruginosa* ao longo do tempo de exposição à radiação (a) UVB e (b) UVA.

A exposição da MOD INTRA à radiação resultou em redução da intensidade de absorvância ao longo de todo o espectro em função do tempo, e a forma inicial do espectro

manteve-se similar durante os 60 dias de exposição (Figuras 2a e b). O pico de absorvância correspondente à ficocianina, em 630 nm, foi completamente eliminado após 0.5 dia de exposição à UVA e UVB. Não houve fotoprodução detectável de MOD-C e picos de materiais fotorresistentes também não foram observados.

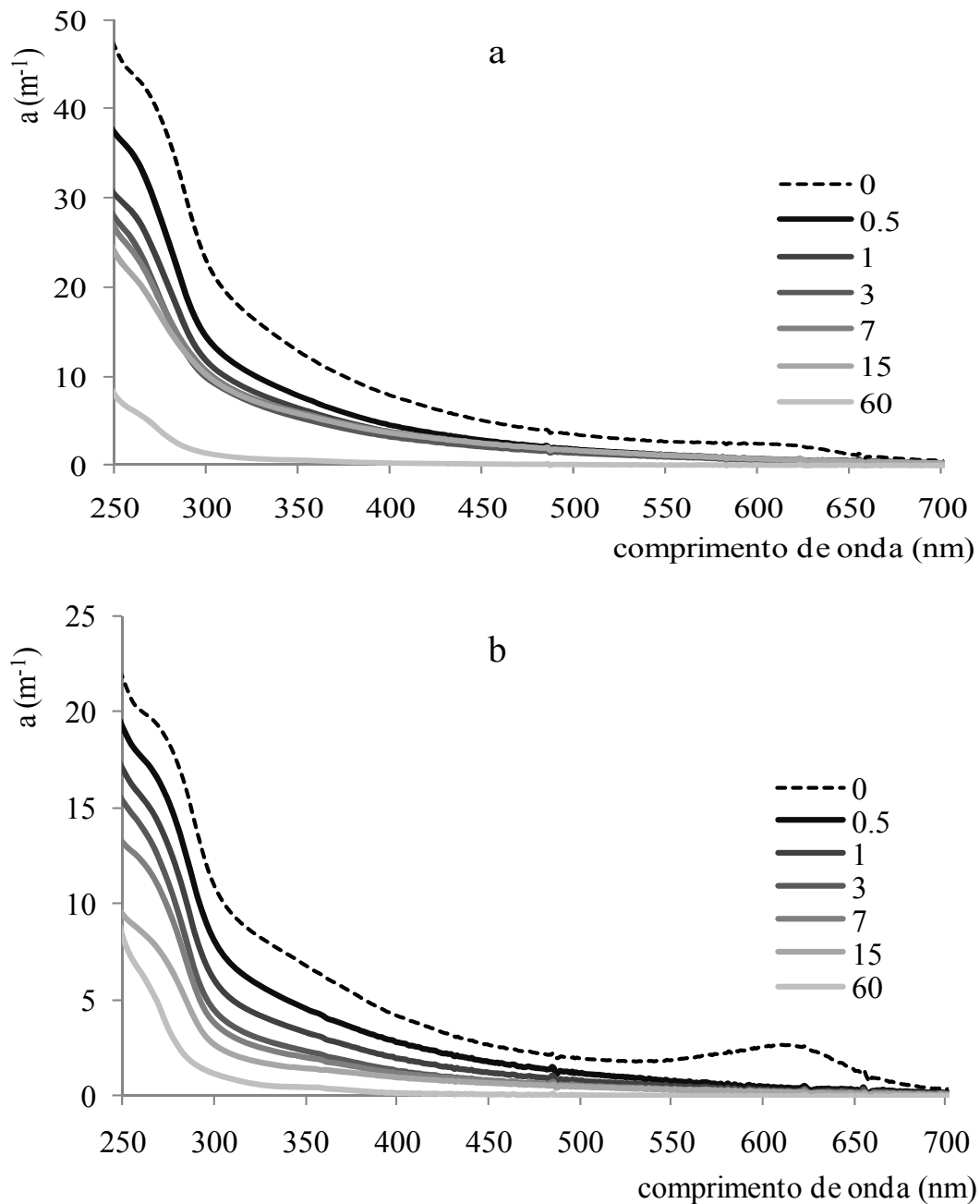


Figura 2. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) de origem intracelular de *Microcystis aeruginosa* ao longo do tempo de exposição à radiação (a) UVB e (b) UVA.

Similarmente à MOD INTRA, a exposição da MOD BB à radiação UVB resultou em redução na absorvância de uma maneira geral ao longo do espectro, mas especialmente em comprimentos de onda mais longos (Figura 3). Não houve produção detectável de compostos cromofóricos causada pela irradiação. Após 43 dias de exposição, no entanto, dois picos distintos de material resistente, com absorvância máxima em 300 e 354 nm, foram observados no espectro (Figura 3, quadro interno), semelhantes àqueles que foram observados durante a irradiação da MOD EXTRA de *M. aeruginosa*.

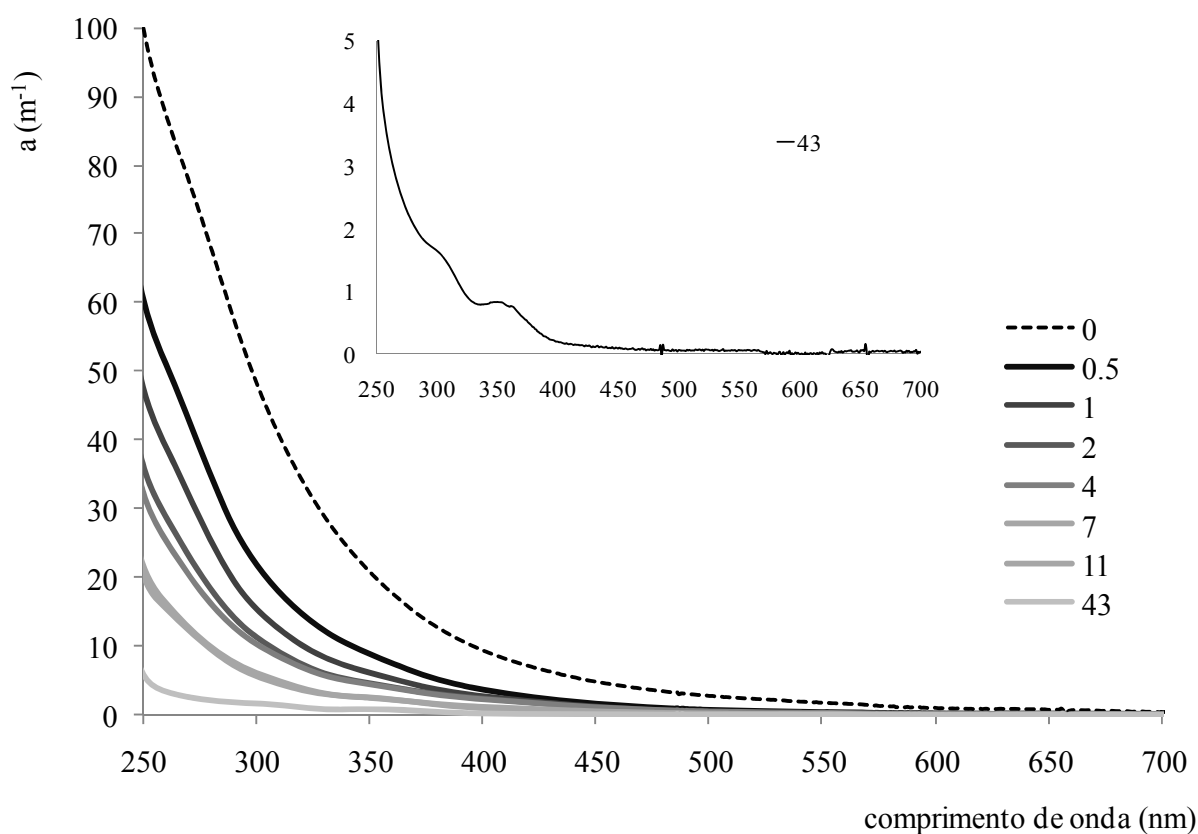


Figura 3. Espectro do coeficiente de absorvância ($a.\text{m}^{-1}$) da matéria orgânica dissolvida cromofórica (MOD-C) do reservatório de Barra Bonita ao longo do tempo de exposição à radiação UVB. O quadro interno mostra a amostra irradiada por 43 dias em escala otimizada.

A razão entre os coeficientes de absorvência em 250 e 365 nm diminui conforme a massa molecular da MOD-C aumenta. Houve aumento na massa molecular média da MOD-C EXTRA, que ocorreu no período de 0.5 dia de exposição (Figura 4a), devido à produção de MOD-C absorvendo em 365 nm (MOD-C de alta massa) nos experimentos com UVB e UVA. Portanto, a fotoprodução de MOD-C de alta massa molecular foi o principal processo que causou o aumento na massa molecular média da MOD-C EXTRA em 0.5 dia de exposição. Em seguida, a exposição por mais de 3 dias causou redução em ambos a_{250} e a_{365} proporcionalmente, mantendo a massa molecular constante e mais alta do que a inicial.

A irradiação da MOD INTRA e MOD BB, por outro lado, causou a redução na massa molecular média da MOD-C (Figura 4b), devido à redução da absorvência mais efetiva em comprimentos de onda longos (a_{365}) do que curtos (a_{250}). Nestes dois tipos de MOD, a redução média na massa molecular foi relacionada também ao fato da absorvência da MOD-C de baixa massa (a_{250}) ser inicialmente muito maior e, portanto, ‘sobrar’ na amostra após a redução de virtualmente toda a absorvência da MOD-C de alta massa (a_{365}).

Nos três tipos de MOD, uma vez que a porção cromofórica de baixa massa foi diretamente afetada pela radiação, não foi detectada fotoprodução de compostos cromofóricos de baixa massa resultantes da quebra de compostos de alta massa.

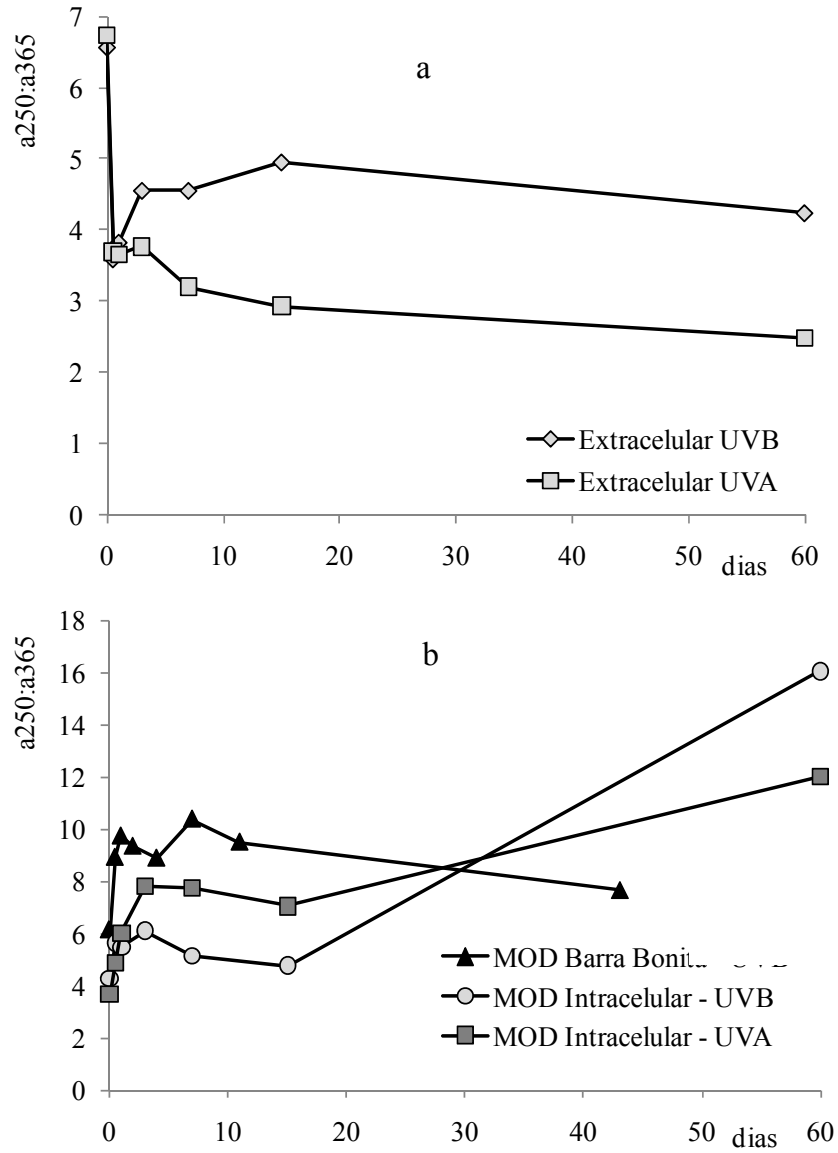


Figura 4. Razão entre $a_{250}:a_{365}$ em função do tempo de irradiação de (a) MOD EXTRA e (b) MOD INTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB.

2.3.2 Análises da matéria orgânica dissolvida fluorescente (MOD-F)

A análise da porção fluorescente da MOD pelas EEMs mostrou que o material húmico com máximas Ex/Em 350/450 nm, pico C, foi encontrado na MOD EXTRA (Figura 5a) e INTRA (Figura 5b), enquanto que o material húmico com máxima Ex/Em em 270/450, pico A, foi observado nos três tipos de MOD estudados (Figura 5a, b e c). O componente protéico, rico em triptofano com máxima Ex/Em em 275/350 nm, pico T, foi detectado apenas na MOD das culturas de *M. aeruginosa*: MOD EXTRA e MOD INTRA (Figura 5a e b). O terceiro tipo de fluoróforo (tipicamente descrito como material autóctone recente, Capítulo 1), pico M com máxima Ex/Em em 315/400 nm, foi observado na MOD EXTRA (Figura 5a) e na MOD BB (Figura 5c).

A irradiação da MOD EXTRA e INTRA por 0.5 dia revelou que os diferentes tipos de fluoróforos da MOD produzida pela cianobactéria apresentam diferente susceptibilidade à radiação UV. A avaliação qualitativa das EEMs das amostras de MOD EXTRA e INTRA irradiadas por 0.5 dia com UVB (Figura 5d e 5e) mostrou que a exposição à radiação fez com que o material húmico passasse ser a classe de fluoróforos mais representativa, já que a intensidade de fluorescência do material protéico foi rápida e drasticamente reduzida pela exposição de curto prazo. Em consequência, estas EEMs tornaram-se qualitativamente mais semelhantes àquela obtida para a MOD BB inicial (Figura 5c). Por sua vez, a exposição de 0.5 dia da MOD BB também não foi suficiente para a remoção do material húmico presente inicialmente na MOD (pico A). Estes resultados mostram que a fluorescência do material húmico é mais resistente a fotodegradação do que aquela dos demais tipos de fluoróforos. O pico M da MOD BB ainda esteve visível após a exposição à UVB por 0.5 dia.

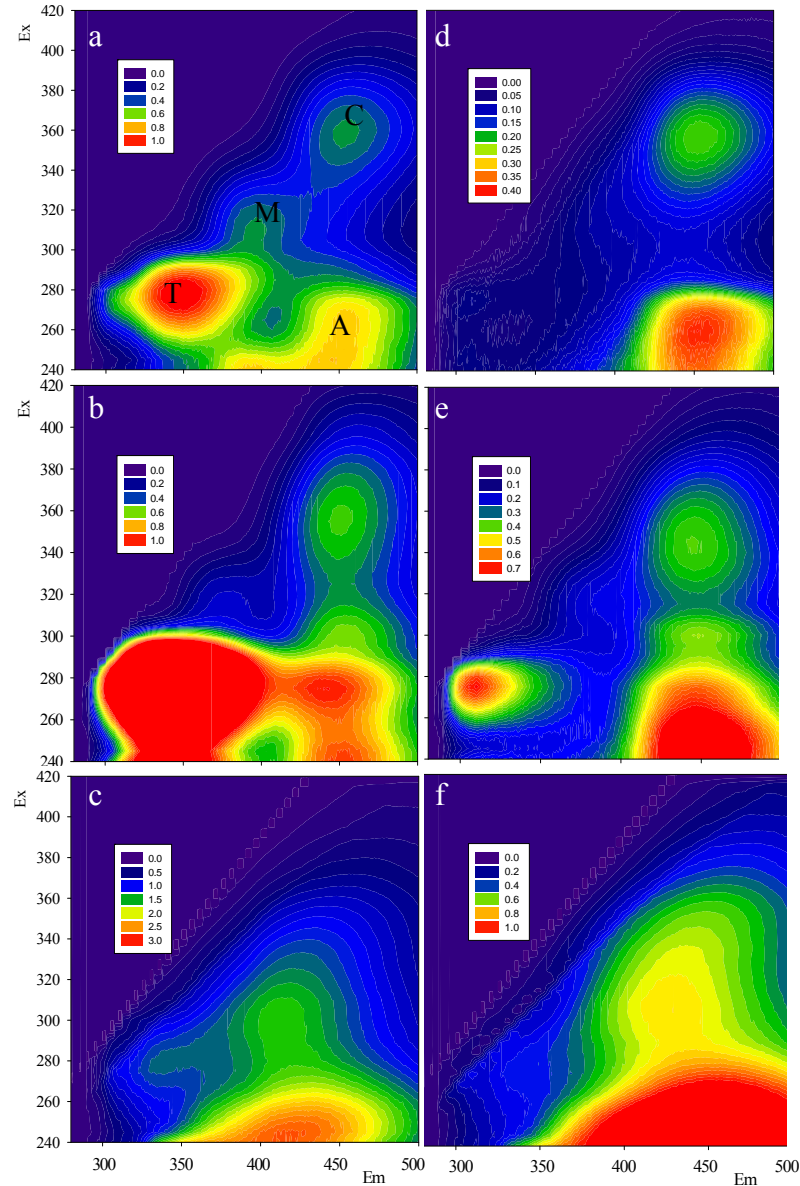


Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEMs) da MOD de *Microcystis aeruginosa* (a) EXTRA inicial e (b) INTRA inicial e (c) MOD BB inicial; e após irradiação com UVB por 0.5 dia (d) EXTRA, (e) INTRA e (f) de BB. T = material protéico, M = pico M, C e A = material húmico.

Os resultados obtidos pelo modelo PARAFAC agruparam os picos da MOD EXTRA em 3 tipos distintos (húmicos, proteico e pico M), os da MOD INTRA em 2 tipos (húmico e proteico), enquanto que para a MOD BB, a aplicação do modelo foi adequada apenas para o material húmico (pico A) (Figura 6). A análise semi-quantitativa da fluorescência mostrou que a MOD-F de *M. aeruginosa* EXTRA e INTRA é dominada pelo material protéico, seguida pelo material húmico (Figura 6a, b, c e d, ‘tempo 0’). O material M, na MOD EXTRA, contribuiu com a menor intensidade de fluorescência (Figura 6a e b, ‘tempo 0’).

Ao longo do tempo de irradiação, com UVB e UVA, foi observada a redução na fluorescência da MOD EXTRA e INTRA de maneira geral. Após 3 dias de exposição, as intensidades de todos os fluoróforos foram significativamente reduzidas (Figura 6a – d). Durante a exposição de curto prazo (0.5 e 1 dia), no entanto, as medidas de intensidade de fluorescência confirmaram a resistência relativa dos compostos húmicos (Figura 6a, b e c, ‘tempos 0.5 e 1 dia’), à exceção da MOD INTRA irradiada com UVA (Figura 6d, ‘tempos 0.5 e 1 dia’), cuja dominância de compostos protéicos foi mantida. A intensidade de fluorescência do componente húmico da MOD-BB foi lentamente reduzida ao longo do tempo de exposição à UVB (Figura 6e), similarmente à redução observada para o componente húmico da MOD EXTRA e INTRA. Não foi observada fotoprodução de compostos fluorescentes e nenhum dos materiais resistentes detectados pelo espectro de absorbância da MOD EXTRA parece pertencer à porção fluorescente desta MOD.

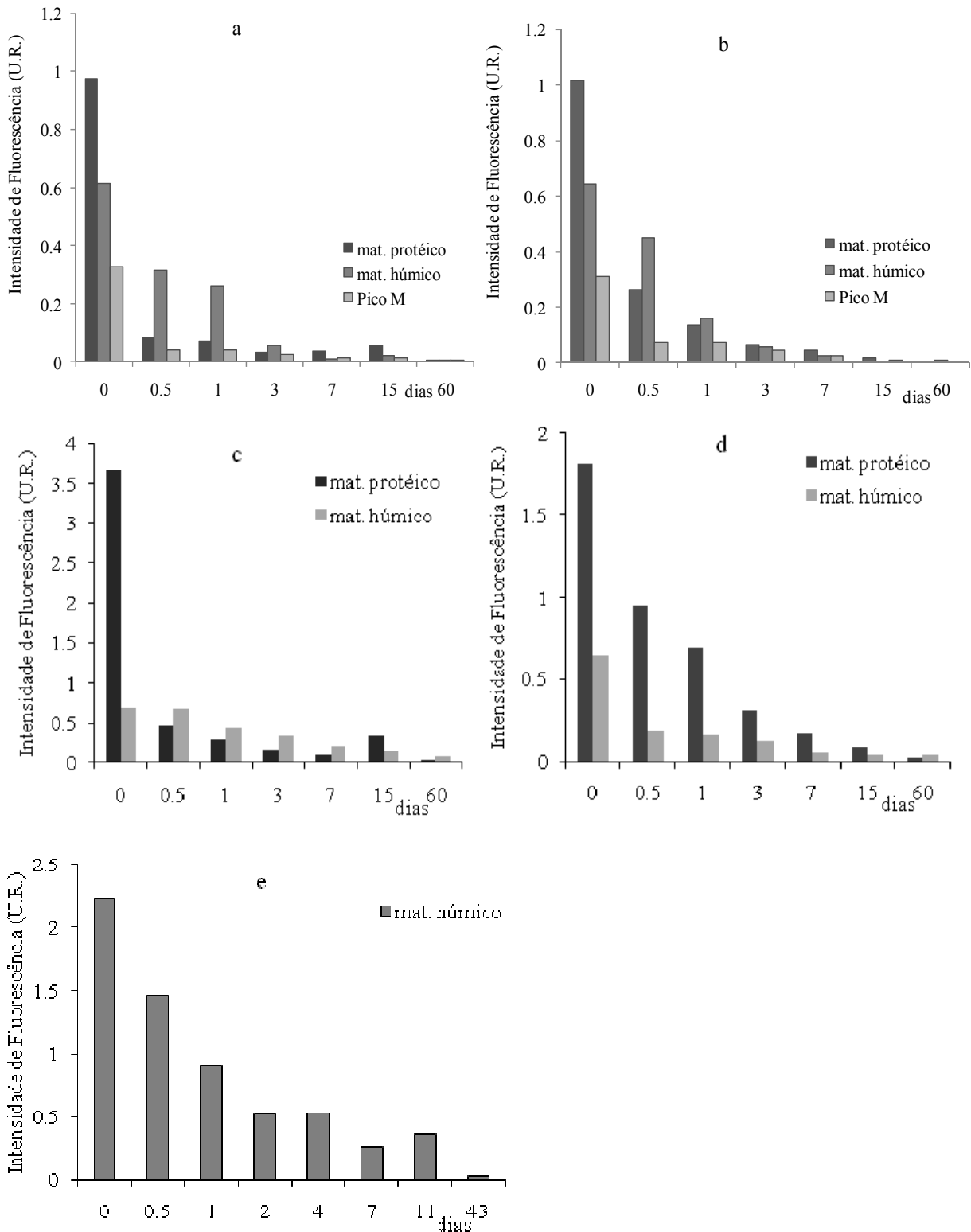


Figura 6. Intensidade máxima de fluorescência (em unidades de Raman, U.R.) de cada pico de material fluorescente identificado na MOD EXTRA em função do tempo de exposição à (a) UVB e (b) UVA; MOD INTRA em função do tempo de exposição à (c) UVB e (d) UVA; e (e) MOD BB em função do tempo de exposição à UVB.

2.3.3 Concentração de carbono orgânico

A fotodegradação ou fotooxidação completa (i.e., transformação de carbono orgânico em inorgânico) dos três tipos de MOD foi medida pela redução de carbono orgânico dissolvido (COD) das amostras em função do tempo de exposição (Figura 7). Estes dados foram obtidos apenas para os experimentos realizados com radiação UVB. É interessante notar que houve uma relação inversamente proporcional entre a remoção de COD em função do tempo e a concentração inicial de COD de cada tipo de MOD. Por exemplo, a MOD EXTRA apresentou menor concentração inicial de COD e quando irradiada por 3 dias, apresentou redução de 15 % do valor inicial, enquanto que a exposição máxima estabelecida no experimento, 60 dias, causou a redução de 70 % na concentração de COD. Resultados similares foram observados na MOD BB: fotooxidação de 15 % do COD após 2 e 4 dias enquanto que a exposição máxima da MOD, de 43 dias, resultou em fotooxidação de 60 % do COD. A MOD INTRA, por outro lado, apresentou a maior concentração de COD inicial e somente após 7 dias foi observada a remoção de 10 % do COD, e após 60 dias de exposição apenas 22 % do COD foi removido.

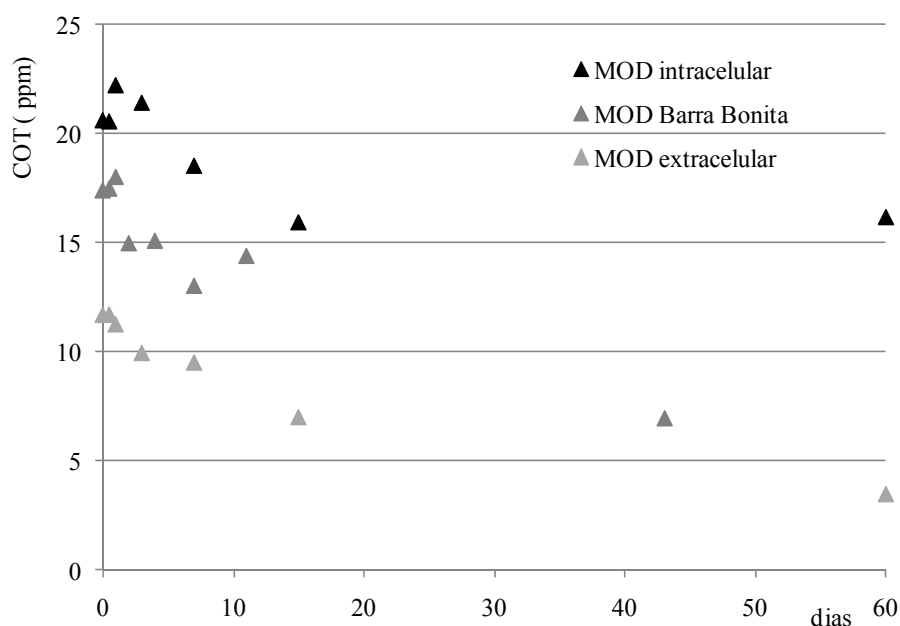


Figura 7. Concentração de carbono orgânico total (COD, em ppm) em função do tempo de exposição à radiação UVB da MOD EXTRA e INTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB.

2.3.4 Análise das características químicas da MOD – espectrometria de massa.

A caracterização por FTICRMS no modo negativo de ionização foi realizada apenas nas amostras de MOD EXTRA inicial e irradiada por 0.5 e 7 dias com UVB e de MOD BB inicial e irradiada por 0.5 e 7 dias com UVB. Para fins práticos os termos irradiação de curto e longo prazo, referem-se às análises de FTICRMS das amostras irradiadas por 0.5 e 7 dias, respectivamente.

Como mencionado no Capítulo 1, os compostos identificados por FTICRMS foram classificados de acordo com a forma estrutural (CRAM, alifáticos e CARS). Os compostos foram também classificados de acordo com as fórmulas químicas ou composições atômicas, dentre as quais as mais abundantes foram CHO, CHON, CHOS, CHOP. A maior parte dos compostos das 6 amostras analisadas foram identificados como pertencentes a uma das classes estruturais (79.5 a 88 %) e das categorias de composição atômica (85.5 a 91.7 %) (Tabela I).

Embora a composição geral da MOD EXTRA irradiada por 0.5 dia tenha sido bastante semelhante à da MOD EXTRA inicial, houve fotooxidação de 61 compostos da MOD inicial, e produção de 90 novos picos, e, portanto, a MOD EXTRA irradiada por 0.5 dia apresentou 11.6 % mais compostos do que a MOD EXTRA inicial (Tabela I). Notavelmente, as maiores transformações mediadas pela radiação UVB foram causadas pela exposição de longo prazo (7 dias) da MOD EXTRA, pela clara redução no número total de compostos identificados pela técnica (de 249 para 158, redução de 36.5 %, Tabela I).

A Figura 8 mostra o diagrama de Van Krevelen das diferentes formas estruturais dos compostos detectados por FTICRMS na amostra de MOD EXTRA, inicial (Figura 8a) e fotoquimicamente modificada pela exposição de curto (0.5 d, Figura 8b) e longo prazo (7 d, Figura 8c), e suas respectivas composições atômicas (Figura 8d-f). Dentre as classes estruturais, destacou-se a dominância de alifáticos na MOD EXTRA inicial (Figura 8a) e irradiada por 0.5 dia (Figura

8b). Na amostra exposta por 7 dias foi observada redução proporcional de compostos aromáticos e CRAM, e aumento da dominância de alifáticos (Figura 8c). Em termos de composição atômica, compostos CHON dominaram as amostras de MOD EXTRA inicial e irradiada por curto prazo (47 e 46 %, respectivamente) (Figura 8d e e) e irradiação de longo prazo causou aumento da abundância de moléculas CHO (62 %) (Figura 8f). Como será analisado adiante, a dominância do grupo CHO nesta amostra foi atribuída à fotodegradação preferencial dos compostos CHON e resistência relativa de CHO.

Tabela I. Número de compostos identificados por FTICRMS na MOD EXTRA de *Microcystis aeruginosa* e MOD BB iniciais e irradiadas por 0.5 e 7 dias com radiação UVB. Os valores entre parênteses são a porcentagem que cada componente (fotoproducto ou fotorresistente) representa em relação ao total de compostos das amostras irradiadas; Δ representa a variação no total de compostos das amostras irradiadas em relação às respectivas amostras iniciais; FE é a porcentagem de compostos identificados pelo critério de Forma Estrutural (%); e CA é a porcentagem de compostos identificados pelo critério de Composição Atômica (%).

Tipo de MOD	Irradiação	Componentes	Número de compostos	Δ	FE (%)	CA (%)
MOD EXTRA	Inicial	n/a	249	n/a	80.7	88.8
	UVB, 0.5 dia		278	+ 11.6	79.5	86
		Fotoprodutos	90 (32.4%)			
		Fotorresistentes	188 (67.6 %)			
	UVB, 7 dias		158	- 36.5	84.8	91.7
		Fotoprodutos	71 (45 %)			
	Fotorresistentes	87 (55 %)				
MOD BB	Inicial	n/a	400	n/a	83.8	90.3
	UVB, 0.5 dia		445	+ 11.25	84	90.3
		Fotoprodutos	130 (29.2 %)			
		Fotorresistentes	315 (70.8 %)			
	UVB, 7 dias		166	- 58.5	88	85.5
		Fotoprodutos	118 (71 %)			
	Fotorresistentes	48 (29 %)				

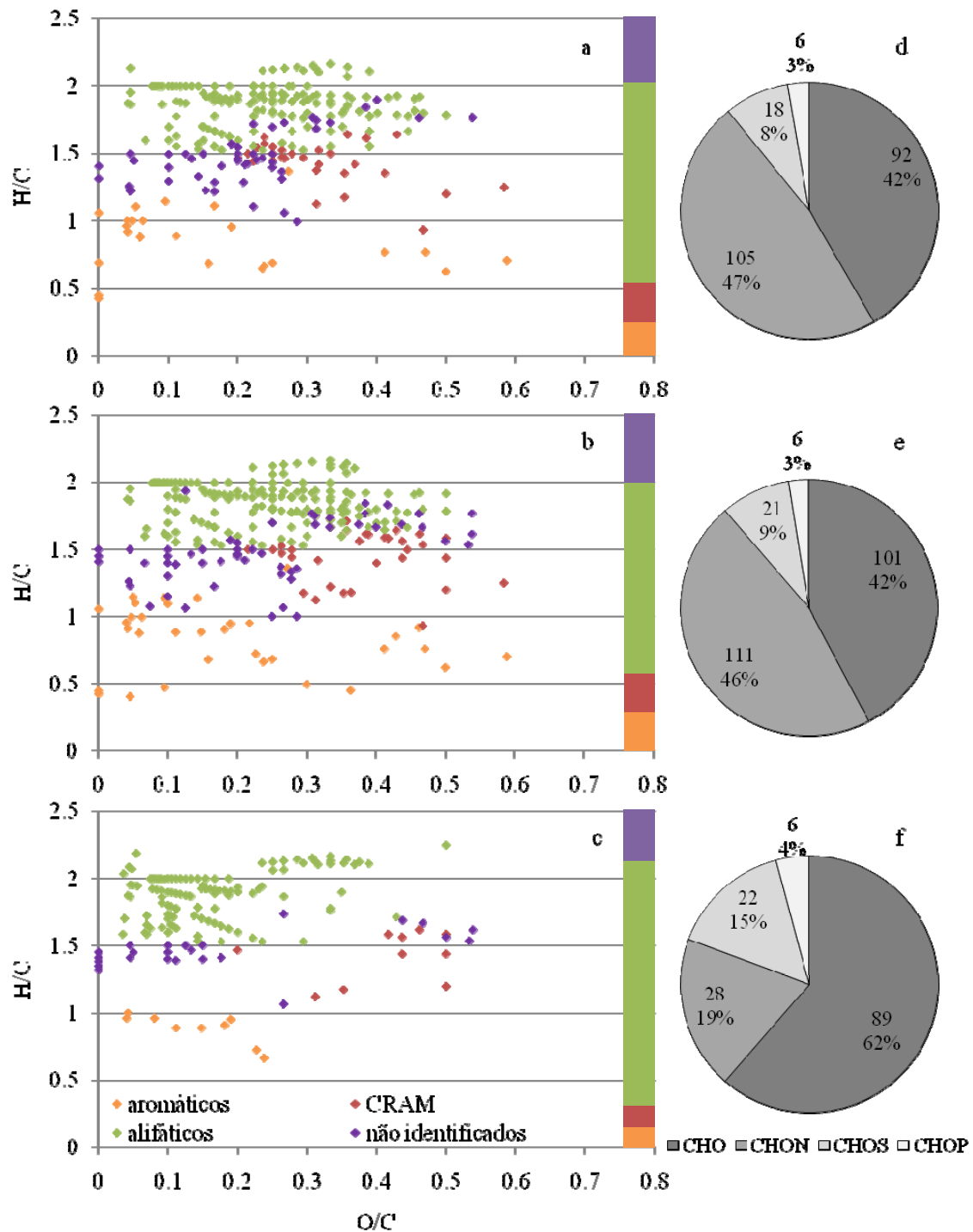


Figura 8. Caracterização química da MOD extracelular das culturas de *Microcystis aeruginosa*: diagrama de Van Krevelen da MOD (a) inicial e irradiada por (b) 0.5 e (c) 7 dias (as barras representam a proporção de cada classe de compostos na amostra); e composição atômica da MOD (d) inicial e irradiada por (e) 0.5 e (f) 7 dias, em número de compostos e porcentagem (%).

A Figura 9 mostra os compostos degradados (Figura 9a), resistentes (Figura 9b) e produzidos (Figura 9c) pela exposição de curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias) da MOD EXTRA. Os compostos fotooxidados em curto prazo estiveram localizados principalmente na região do diagrama correspondente às proteínas. A maior parte das moléculas fotodegradáveis, no entanto, foi removida graças à exposição de longo prazo, e também coincidiu com a região das proteínas no diagrama (Figura 9a). O grupo de compostos resistente à irradiação por 7 dias, claramente esteve localizado na região dos lipídeos do diagrama, caracterizada por alifáticos de baixa razão O/C (Figura 9b). Dentre os fotoprodutos (Figura 9c), três tendências foram observadas: a produção de compostos CARS (aromáticos condensados) em curto prazo, a produção de alifáticos de baixa razão O/C (na região dos lipídeos) em longo prazo, e a produção de espécies mais oxidadas, que ocorreu de maneira gradual em função do tempo de exposição. A tendência de oxidação da MOD foi iniciada pelo aumento no número de moléculas com O/C entre 0.3 e 0.4 em curto prazo, e continuou ao longo do tempo de irradiação, com a produção de espécies ainda mais oxidadas (O/C ~0.5) em longo prazo.

É interessante ressaltar que os CARS presentes nas amostras inicial e produzidos pela exposição por 0.5 dia foram em sua maioria fotodegradados pela exposição de longo prazo da MOD à radiação (Figura 9a). É notável que a composição final da MOD irradiada é na realidade uma combinação entre os diversos processos. Por exemplo, a ausência aparente de variação no total de CRAM ocultou o balanço entre fotodegradação e fotoprodução (Figura 9a e 9c) deste tipo de estrutura e dentre os alifáticos da MOD irradiada por 7 dias, 55 % foram compostos por moléculas fotorresistentes, e 44 % por fotoprodutos (Figura 9b e 9c).

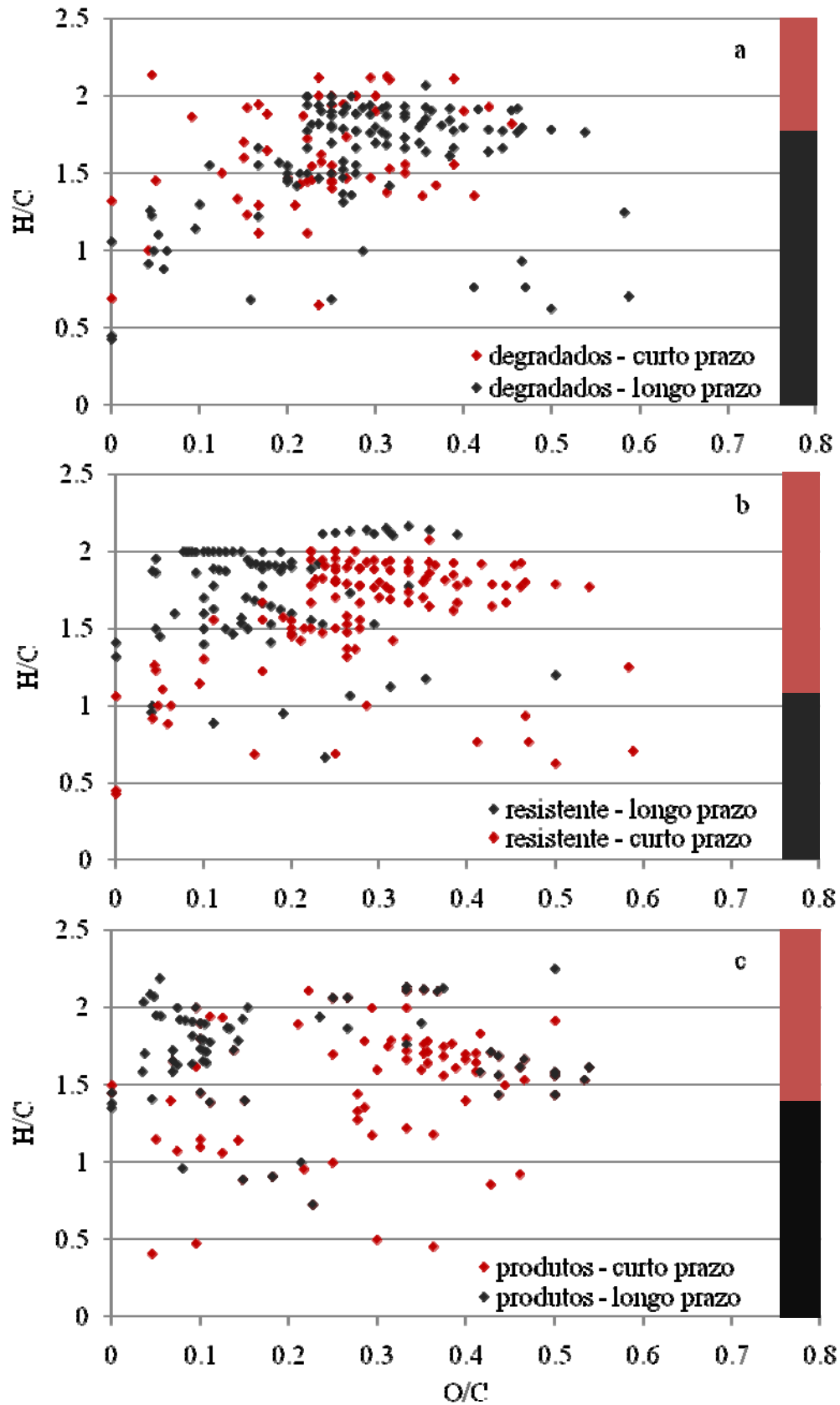


Figura 9. Diagrama de Van Krevelen dos compostos (a) degradados, (b) resistentes e (c) produzidos devido à exposição de curto (0.5 d) e longo prazo (7 d) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* à radiação UVB. As barras representam a proporção dos grupos na amostra.

A Figura 10 mostra a fotodegradabilidade das diferentes classes de compostos da MOD EXTRA, classificados quanto à composição atômica (CHO, CHON, CHOS e CHOP) e quanto à estrutura (alifáticos, aromáticos e CRAM) proporcionalmente às quantidades iniciais de cada classe. Dentre as classes estruturais (Figura 10a), alifáticos foram os mais resistentes, enquanto aromáticos e CRAM foram considerados os mais susceptíveis à fotodegradação, especialmente CRAM, por ter sido a classe de compostos proporcionalmente mais fotodegradada pela exposição por 0.5 dia. Os compostos nitrogenados (CHON) foram os mais preferencialmente fotodegradados, embora isso tenha ocorrido devido à exposição de longo prazo (Figura 10b). A fotodegradação preferencial de compostos CHON está de acordo com o padrão de degradação das moléculas encontradas na região das proteínas do diagrama de VanKrevelen. Compostos CHOS foram os mais fotorresistentes, seguidos por compostos CHO. A resistência de compostos CHO está de acordo com a localização de compostos resistentes na região dos lipídeos no diagrama. Finalmente, compostos ricos em fósforo (CHOP) não foram degradados em 0.5 dia de exposição, sendo que 50 % deles foi resistente e 50 % fotodegradado em longo prazo.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado aos valores de DBE/C das três amostras de MOD EXTRA analisadas por FTICRMS para avaliar a variação da aromaticidade desta MOD em função do tempo de exposição. O valor de mediana de DEB/C (0.2632) da MOD inicial foi ligeiramente menor do que da amostra irradiada por 0.5 dia (0.2778), porém esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($p = 0.3026$). A mediana de DBE/C da amostra irradiada por 7 dias (0.1603), por outro lado, foi significativamente menor do que das duas outras amostras ($p < 0.0001$), o que mostra que a exposição de longo prazo reduz significativamente a aromaticidade da MOD EXTRA.

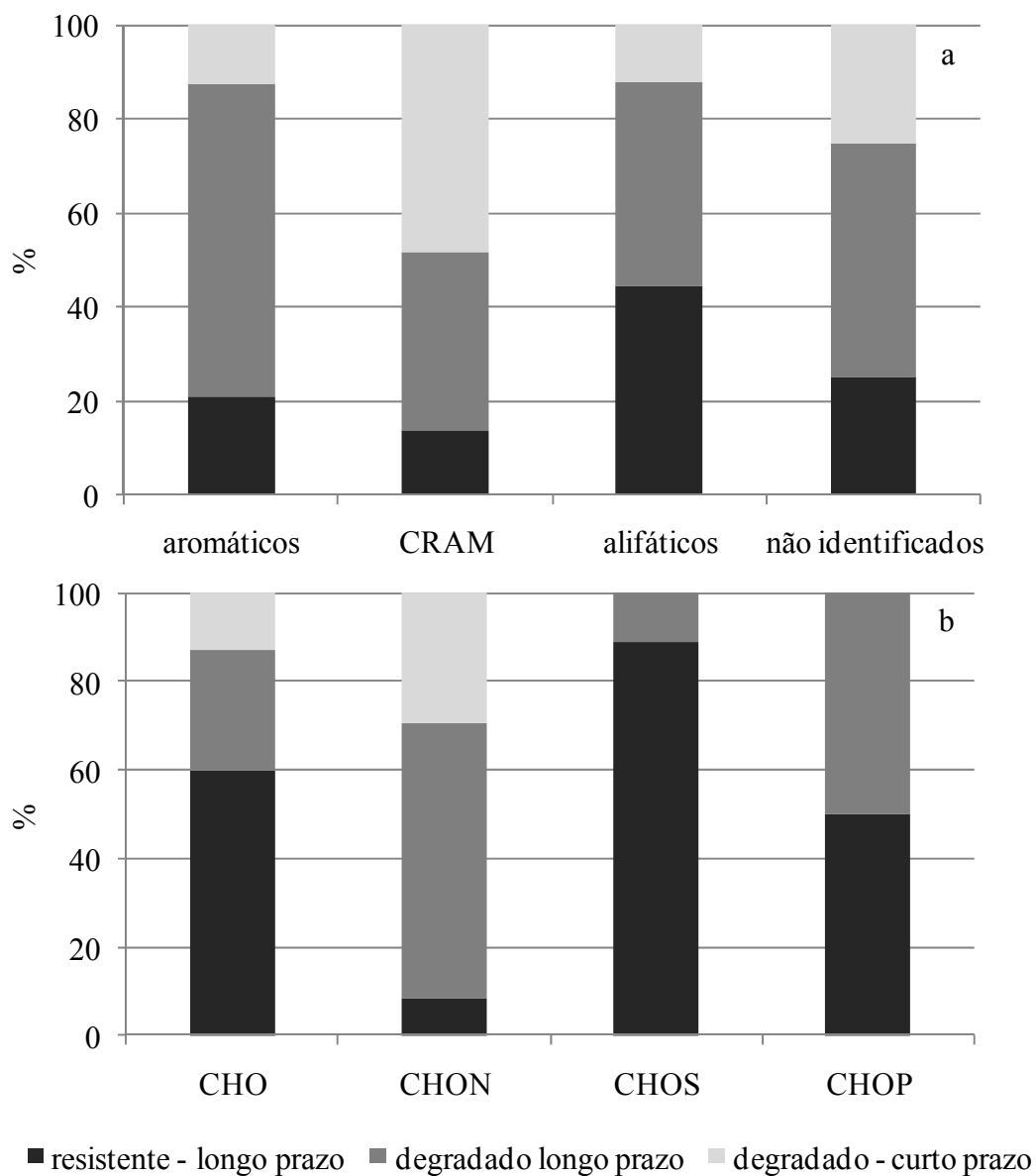


Figura 10. Proporção (%) de compostos resistentes a longo prazo (7 dias) e degradados em curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias), pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* exposta à radiação UVB.

Similarmente à MOD EXTRA, a irradiação de curto prazo da MOD BB causou um pequeno aumento de 11 % no número total de picos detectados pela técnica (de 400 para 445), e a irradiação de longo prazo resultou em redução mais expressiva (58 %) no número de moléculas identificadas (de 400 para 166) (Tabela I). A Figura 11 mostra a caracterização da MOD BB, inicial e irradiada por 0.5 e 7 dias, quanto à composição estrutural (diagramas de Van Krevelen, Figura 11a-c) e composição atômica (Figura 11d-f). A caracterização da MOD BB mostrou que a proporção de CRAM nesta MOD (Figura 11a) é consideravelmente maior do que na MOD EXTRA de *M. aeruginosa*. Houve redução proporcional na contribuição desta classe de compostos em função do tempo de irradiação (Figuras 11b e c). A composição atômica da MOD BB, por outro lado, não variou significativamente, tendo sido dominada por compostos CHO nas amostras inicial e irradiadas (Figuras 11 d, e, f).

A Figura 12 mostra os grupos de moléculas degradadas, resistentes e produzidas a partir da MOD BB inicial, em irradiação de curto e longo prazo. A Figura 12a demonstrou que compostos com razão O/C mais baixa (~ 0.2) foram degradados primeiro, enquanto que compostos com O/C mais alta (~ 0.35) foram degradados apenas pela exposição de longo prazo. Dentre os compostos mais resistentes, destacaram-se alifáticos, com baixa razão O/C (Figura 12b), conforme foi também observado nas análises da MOD EXTRA. Dentre os fotoprodutos, que foram distribuídos em todas as áreas no diagrama, a maior parte foi produzida como resultado da exposição de curto prazo (Figura 12c). Dentre os fotoprodutos, destaca-se a produção de compostos oxidados (O/C 0.4 – 0.6).

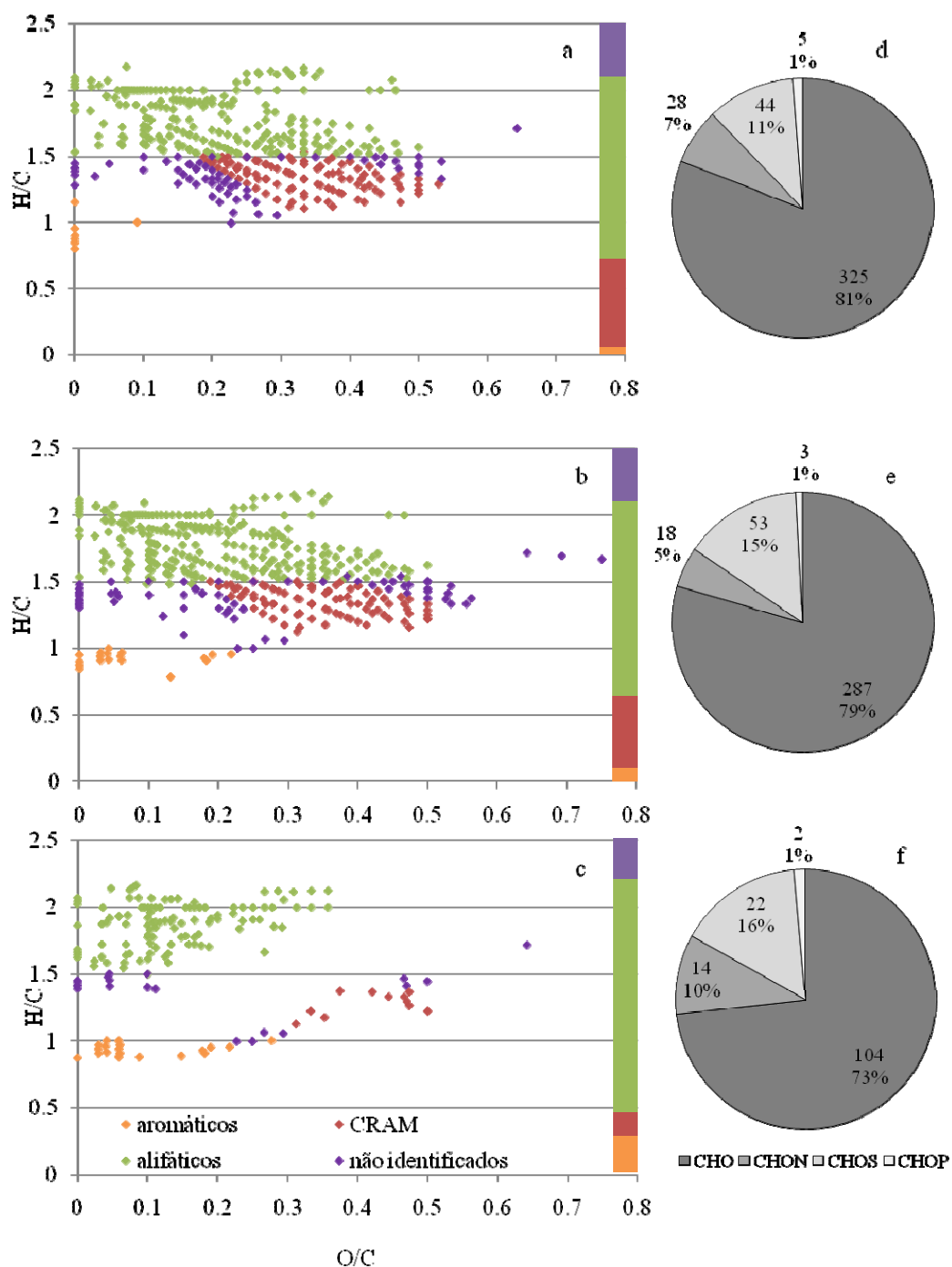


Figura 11. Caracterização química da MOD do reservatório de Barra Bonita: diagrama de Van Krevelen da MOD (a) inicial e irradiada por (b) 0.5 e (c) 7 dias (as barras representam a proporção de cada classe de compostos na amostra); e composição atômica da MOD (d) inicial e irradiada por (e) 0.5 e (f) 7 dias, em número de compostos e porcentagem (%).

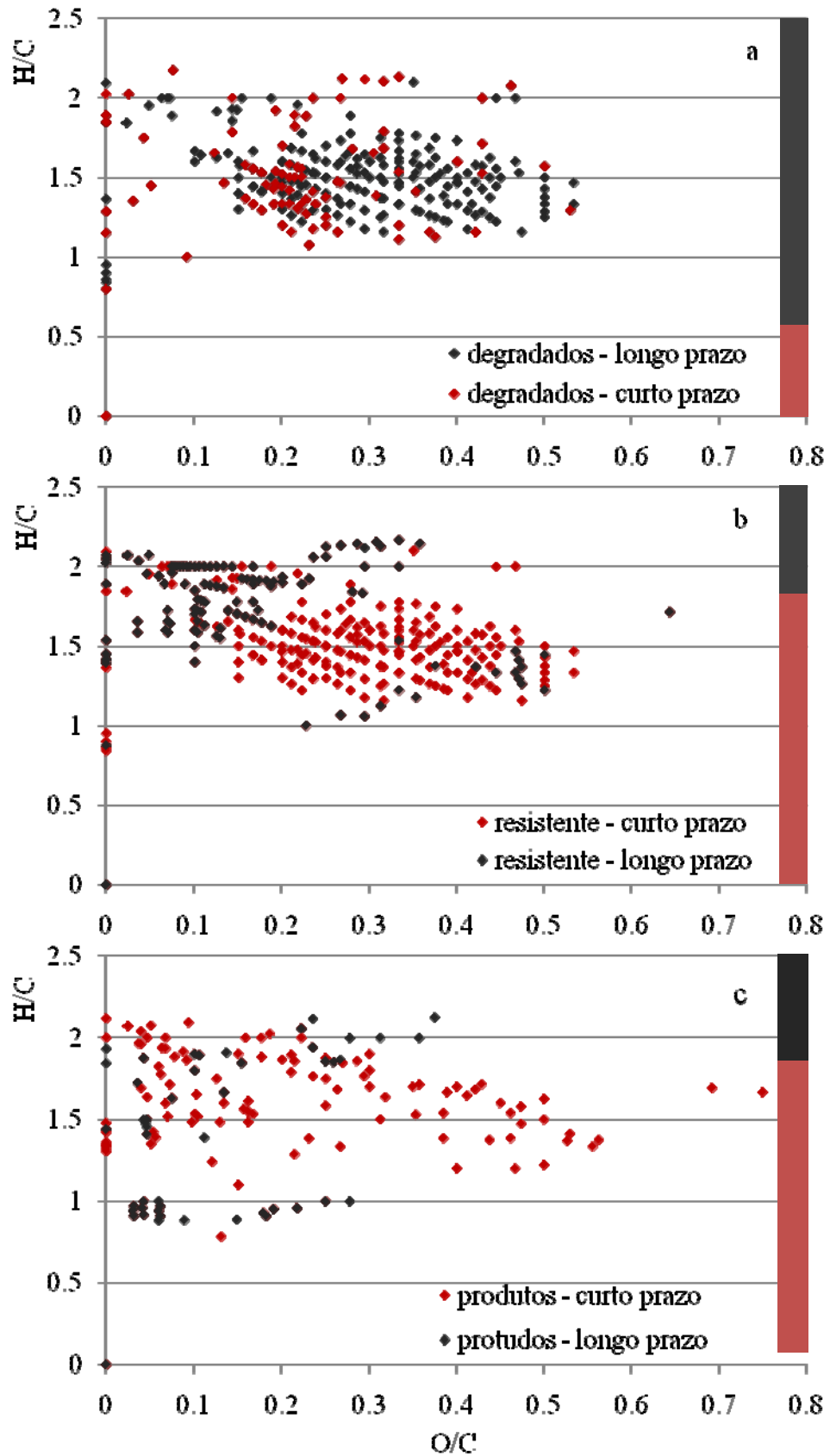


Figura 12. Diagrama de Van Krevelen dos compostos (a) degradados, (b) resistentes e (c) produzidos em exposição de curto (0.5 d) e longo prazo (7 d) da MOD do reservatório de Barra Bonita à radiação UVB. As barras representam a proporção dos grupos na amostra.

Finalmente a Figura 13 mostra que tendências bastante divergentes daquelas observadas para a MOD EXTRA foram reveladas pela análise da degradabilidade das várias classes de compostos da MOD BB. Compostos nitrogenados da MOD BB foram os mais resistentes à fotodegradação, embora a maior parte dentre os CHON fotodegradáveis tenha sido removida em curto prazo. As classes de composição atômica CHO e CHOS foram bastante degradáveis, embora este processo tenha sido mais efetivo em longo prazo do que em curto prazo. Os compostos ricos em fósforo do reservatório (CHOP), por outro lado, mostraram-se extremamente fotodegradáveis: 100 % deles foram degradados em apenas 0.5 dia de exposição. Por outro lado, a tendência de menor fotoresistência de aromáticos e CRAM comparada aos alifáticos, observada na MOD EXTRA, confirmou-se nas análises químicas da MOD BB.

A avaliação estatística da aromaticidade da MOD BB foi similar à obtida para a MOD EXTRA: em resumo, a irradiação de curto prazo não alterou significativamente os valores de DBE/C da MOD (0.2829×0.2667 , $p = 0.4789$), enquanto que a exposição por 7 dias causou redução extremamente significativa na aromaticidade da MOD (0.1667 , $p < 0.0001$).

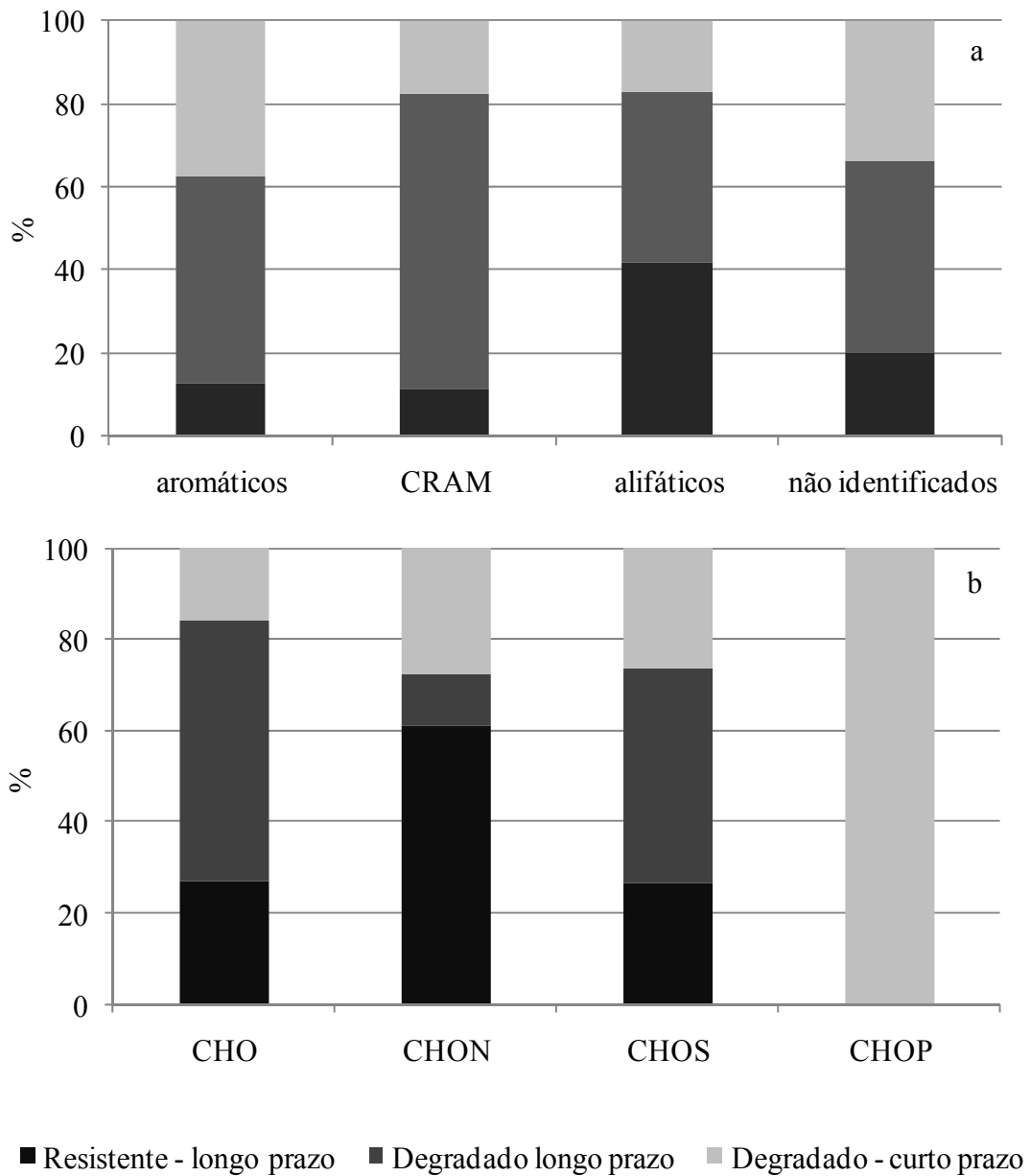


Figura 13. Proporção (%) de compostos resistentes (7 dias) e degradados em curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias), pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD do reservatório de Barra Bonita exposta à radiação UVB.

A análise comparativa da MOD EXTRA inicial e MOD BB inicial revelou que 83 moléculas foram encontradas em ambas amostras. Estas 83 moléculas comuns representaram 20.75 % do total de moléculas da MOD BB. A Tabela II ainda detalha estes compostos comuns de acordo com a classe estrutural e de composição atômica a que pertencem, e apresenta a porcentagem que representam na MOD BB inicial. Os dados nesta Tabela podem ser interpretados como a quantidade (em número e proporção) de compostos presentes na MOD BB que têm origem na excreção por *M. aeruginosa*. Dentre as diversas classes em que as moléculas foram classificadas, 68 compostos alifáticos e 64 compostos CHO liberados por *M. aeruginosa* foram identificados na MOD do reservatório. Estas classes representaram, portanto, as mais importantes dentre os compostos presentes na MOD do reservatório cuja origem foi atribuída à excreção por *M. aeruginosa*.

Tabela II. Número de compostos comuns à MOD EXTRA inicial e MOD BB inicial, pertencentes às diferentes classes estruturais e de composição atômica, e porcentagem que estes compostos comuns representam na MOD BB inicial (%).

Classes	# Comuns	% na MOD BB
Total	83	20.75
Alifáticos	68	31
CRAM	5	4.6
CARS	0	0
Não identificados	10	15.4
CHO	64	22.3
CHON	4	22.2
CHOS	13	24.5
CHOP	1	33.3
outros	1	9.7

2.4 Discussão

2.4.1 Caracterização das MODs

Os três tipos de MOD apresentam propriedades cromofóricas. A presença de MOD-C no ambiente tem importantes implicações na formação da camada eufótica em lagos e outros sistemas aquáticos (McKnight et al 2001), além de atuar como filtro que protege a biota dos efeitos deletérios da radiação UV sobre o DNA (Gao e Zepp 1998, Walsh et al 2003), e ao mesmo tempo reduz a quantidade de radiação PAR (*photosynthetically active radiation*) disponível à atividade fitoplanctônica (Blough e Del Vecchio 2002). Alguns autores sugerem que a principal fonte de MOD-C em ambientes naturais é a MOD terrestre (Bracchini et al 2006), i.e., MOD alóctone com origem em plantas superiores e solos, que entra no corpo d'água pelo escoamento da água da chuva a partir das margens (Sulzberger e Durisch-Kaiser 2009) e por ressuspensão a partir do sedimento (Boss et al 2001). Outros estudos demonstraram que a MOD-C de origem terrestre é mais reativa do que a de origem fitoplanctônica (Obernosterer e Benner 2004, Opsahl e Benner 1998, Vatahalo e Wetzel 2004) devido à alta porcentagem de aromáticos na primeira (Minor et al 2007, Stubbins et al 2008). Embora a proporção entre a MOD-C de origem terrestre e fitoplanctônica no reservatório de Barra Bonita seja desconhecida, o presente estudo demonstrou que a MOD extracelular e intracelular produzida por *M. aeruginosa* contêm frações que absorvem luz, que certamente contribuem com a MOD-C do reservatório. Estes resultados somam-se a estudos prévios que demonstraram a ocorrência de produção de MOD-C a partir do fitoplâncton em águas naturais, devido à excreção (Bricaud et al 1981, Carder et al 1989) e lise celular (Momzikoff et al 1992).

Além da porção cromofórica, os três tipos de MOD apresentaram compostos fluorescentes. A MOD extracelular de *M. aeruginosa* apresentou 4 picos fluorescentes, enquanto a MOD intracelular apresentou 3 picos. Como as amostras de MOD EXTRA foram obtidas a partir de culturas axênicas, pode-se afirmar que os fluoróforos encontrados foram liberados pelas

células de *M. aeruginosa*, e portanto não foram produzidos ou modificados por atividade heterotrófica. Estes resultados são interessantes porque demonstram que a espécie *M. aeruginosa* é fonte potencial de todos os tipos de fluoróforos (picos A, C, T e M) observados em ambientes de água doce (Mopper e Schultz 1993, Coble 1996, Wu e Tanoue 2001, Alberts et al 2004), já que trata-se de uma espécie cosmopolita (Marshall 2009). O pico M é tipicamente associado a material recente de origem metabólica; sua presença na MOD extracelular e ausência na MOD intracelular de *M. aeruginosa* reforçaram a teoria de que se trata, de fato, de um produto de excreção do metabolismo da cianobactéria. A presença do pico M na MOD do reservatório de Barra Bonita corroborou a importância do material extracelular de *M. aeruginosa* na composição da MOD do reservatório.

A caracterização química da MOD extracelular de *M. aeruginosa* e da MOD do reservatório de Barra Bonita mostrou que ambas são dominadas por compostos alifáticos. Embora o valor total de compostos comuns à MOD extracelular da cianobactéria e MOD do reservatório (83 moléculas) e a porcentagem que representam na MOD de Barra Bonita (20.75 %) possam parecer valores baixos, é preciso considerar que a MOD BB analisada foi uma amostra integrada da coluna d'água e não apenas da zona eufótica, onde a densidade de células fitoplanctônicas é mais alta, principalmente nas condições em que a coleta foi realizada: presença de florescimento de *Microcystis* sp e ausência de vento, que favorece a flutuação das células. Dentre as moléculas produzidas por *M. aeruginosa* que aparecem na composição da MOD do reservatório, os alifáticos e CHO são as classes de compostos quantitativamente mais representativas. Especialmente a proporção de alifáticos da MOD do reservatório de Barra Bonita cuja origem foi atribuída à excreção por *M. aeruginosa* (31 %) demonstra que a liberação de MOD pela cianobactéria tem um forte impacto na composição da MOD no reservatório. Esta observação é especialmente relevante se considerarmos que a MOD extracelular de *M. aeruginosa* analisada foi obtida em culturas axênicas, e portanto, é composta por material

recente e inalterado, enquanto a MOD coletada no reservatório esteve previamente sujeita à transformações bióticas e abióticas do ambiente.

A alta proporção de compostos nitrogenados na MOD extracelular em oposição à escassez destes compostos na MOD de Barra Bonita reforça o caráter recente e intacto da MOD extracelular obtida em culturas axênicas. Por outro lado, as altas proporções de CRAM e de compostos CHO na MOD de Barra Bonita são características tipicamente associadas a MOD de águas naturais, previamente submetidas a diversos processos de transformação química e biológica, como observado por Sleighter e Hatcher (2008) e Stubbins et al (2010).

2.4.2 Efeito do tempo de exposição à radiação UV sobre as propriedades ópticas da MOD

Durante a irradiação por 0.5 dia (UVA e UVB) da MOD EXTRA, a absorvância da MOD-C aumentou em comprimentos de onda de 350-420 nm, enquanto que na região de 250 a 350 nm do espectro a absorvância não foi alterada significativamente. Estes resultados mostram que o aumento na absorvância não foi simples resultado de reestruturação de MOD-C que deixou de absorver luz em determinados comprimentos de onda e passou a absorver em outros. Em oposição a isso, o aumento em absorvância da MOD-C foi interpretado como fotoprodução de novos compostos cromofóricos, mediada pela radiação UV, e que estes produtos tiveram compostos originalmente não cromofóricos como precursores. A produção de MOD-C a partir de MOD não cromofórica pode ser atribuída à reações de condensação, envolvendo produtos celulares como carboidratos, aminoácidos, ácidos policarboxílicos e lipídeos, resultando em formação de anéis aromáticos e aumento na absorvância (Nissebaum e Kaplan 1972). Vários estudos sugerem ainda que a produção de MOD-C está relacionada à presença de compostos orgânicos nitrogenados na MOD (Bushaw et al 1996, Reitner et al 2002, Vähätalo e Zepp 2005), o que reforça o caráter potencial da fotoprodução de MOD-C da MOD EXTRA, rica em compostos CHON (item anterior).

Ainda em relação à MOD EXTRA, é interessante notar que os fotoprodutos cromofóricos foram rapidamente gerados (0.5 dia) e lentamente degradados (3-60 dias), potencialmente perdurando no ambiente por considerável período de tempo. Um forte indício desta afirmação é a presença dos picos de material resistente encontrados na MOD-C de Barra Bonita irradiada por 43 dias (Figura 3). Considerando o tempo de residência da água do reservatório de Barra Bonita (37 dias no verão e 137 no inverno, Vieira et al 2008), a incidência contínua de radiação UV devido à sua localização subtropical, e a grande contribuição da MOD EXTRA de *M. aeruginosa* na MOD do reservatório, sugerimos que a produção de material cromofórico a partir de material não cromofórico é um processo bastante significativo neste ambiente, e importante devido às funções ecológicas da MOD-C mencionadas no item anterior. O conjunto de compostos resistentes (i.e., picos, Figura 1) observados no espectro de absorbância da MOD EXTRA ao longo do tempo de irradiação e na MOD BB irradiada por 43 dias (Figura 3) também reforça a contribuição de *M. aeruginosa* na porção cromofórica fotoresistente da MOD do reservatório. Finalmente, os indícios de transformação de compostos não cromofóricos em cromofóricos compromete ainda mais o uso do índice $a_{250}:a_{365}$ como parâmetro de variação na massa molecular da MOD como um todo.

Dentro do período de 0.5 dia de irradiação, as EEMs das MODs EXTRA e INTRA tornaram-se qualitativamente mais semelhantes à EEM da MOD BB, porque a contribuição dos diferentes picos à fluorescência total mudou notavelmente, passando de um carácter protéico a um carácter húmico, devido à relativa fotoresistência do material húmico. A irradiação por 0.5 dia, portanto, mascara o carácter autóctone da MOD fluorescente EXTRA e INTRA, tornando-as mais semelhantes ao da MOD alóctone (i.e., terrestre). Desta forma pode ser justificada a ausência do material protéico fluorescente de *M. aeruginosa* na MOD do reservatório, ou seja, a incidência de radiação solar no reservatório causaria a degradação do pico protéico, mas não do material húmico. Em outras palavras, o balanço entre a exposição à radiação UV e a produção

contínua de MOD-F por excreção e lise celular de *M. aeruginosa* no reservatório resultaria no caráter húmico da porção fluorescente da MOD BB. O estudo mais aprofundado no ambiente, incluindo medidas de circulação da água e de tempos reais de exposição à radiação solar, é fundamental na compreensão da dinâmica entre estes dois mecanismos. Além disso, naturalmente, outros processos, como a biodegradação, também contribuem na manutenção das características da MOD do reservatório.

Para fins teóricos, é importante ressaltar que a fluorescência das proteínas é associada ao seu conteúdo de tirosina e triptofano, aminoácidos aromáticos que absorvem luz, responsáveis pelo pico protéico das EEMs (Coble 1996). Portanto, a redução do pico protéico não significa necessariamente a fotodegradação completa de proteínas, mas sim daquelas que contêm estes aminoácidos em sua composição, ou mesmo somente destes sítios específicos das moléculas. Compostos com características húmicas, por outro lado, são caracterizados por vários anéis aromáticos (Nissebaum e Kaplan 1972, Kieber et al 1997).

Finalmente, vale ressaltar a importância da avaliação das propriedades ópticas no estudo da fotoquímica da MOD, já que estes parâmetros revelam combinações entre degradação e produção, e susceptibilidade/resistência relativas, que não seriam detectáveis por medidas quantitativas. Estes parâmetros revelam transformações que ocorreram na MOD antes da alteração inicial na concentração de COD, e/ou quando a concentração de COD já parou de variar (Saadi et al 2006). Neste estudo, embora a remoção de COD em função do tempo pareça ter sido relacionada à concentração inicial de COD das diversas amostras de MOD, as condições em que os experimentos foram planejados não fornecem dados suficientes para o estabelecimento definitivo desta relação. Além disso, estudos prévios demonstraram que o grau de fotooxidação da MOD depende não somente da concentração, mas também da composição inicial da MOD em estudo (Benner e Biddanda 1998).

2.4.3 Efeito da exposição de curto (0.5 dia) e longo prazo (7 dias) à UVB sobre as características químicas e moleculares da MOD EXTRA e MOD BB.

Um dos resultados mais interessantes e surpreendentes revelados pela caracterização química da MOD EXTRA foi a produção de compostos CARS em 0.5 dia de exposição. O aumento na quantidade de CARS pode estar relacionado ao aumento na absorbância da MOD-C, revelado pelo espectro de absorbância da MOD EXTRA irradiada. Além da fotoprodução de CARS, a perda de CRAM durante a exposição de curto prazo também pode estar relacionada à reações de condensação que, de acordo com Nissenbaum e Kaplan (1972), envolve modificações químicas como perda de grupos carboxílicos (COOH) e outros grupos oxigenados, dehidrogenação (i.e., redução na razão H/C) e fechamento de anéis aromáticos, e resultam em aumento da absorbância. O conjunto destes resultados indica que a irradiação de curto prazo causa polimerização da MOD EXTRA.

Por outro lado, a irradiação por 7 dias causou a remoção de CARS, iniciais e fotoproduzidos em 0.5 dia, além da redução estatisticamente significativa da aromaticidade da MOD (DBE/C). Por serem compostos reativos à radiação, CARS são frequentemente consideradas estruturas fotoinstáveis, e portanto, comumente identificadas entre compostos mais fotodegradáveis da MOD (Tremblay et al 2007). De maneira geral, o efeito da irradiação de longo prazo sobre a MOD EXTRA e MOD BB foi não somente a redução na aromaticidade, mas também a perda de riqueza e heterogeneidade molecular, resultados consistentes com estudos prévios da fotoquímica da MOD fracionada (ácidos fúlvicos do Rio Swanee, Kujawinski et al 2004) e total (Rio Congo, Stubbins et al 2010, e *Cape Fear River*, Gonsior et al 2009). Além da remoção de CARS, a redução na aromaticidade da amostra irradiada por longo prazo foi devida também à fotoresistência e fotoprodução de material alifático monosaturado e saturado, em comparação com seus correspondentes insaturados (Hama 1991).

Resguardadas as considerações feitas no item anterior acerca das propriedades fluorescentes vs concentração de proteínas, compostos orgânicos nitrogenados são considerados susceptíveis à fotooxidação (Choi et al 2004, Biers et al 2007). De fato, os compostos nitrogenados da MOD EXTRA foram proporcionalmente os mais fotodegradados. Estes resultados têm importantes implicações ecológicas, no sentido em que a fotodegradação de compostos nitrogenados resulta em produção de íons facilmente assimiláveis pelo fitoplâncton, como o nitrato (NO_3^-), mas também em compostos menos disponíveis como amônio (NH_4^+) e nitrito (NO_2^-), e até mesmo a forma gasosa do nitrogênio (N_2), que seria eliminado do sistema (Hidaka et al 2008). É interessante observar que a porção CHON da MOD de Barra Bonita foi a mais resistente à fotodegradação. Isso mostra que embora apresentem a mesma composição atômica, estas moléculas possuem diferentes níveis de susceptibilidade à radiação, o que pode estar relacionado principalmente à 'idade' deste material nitrogenado; por ter estado previamente sujeito à radiação solar e também à biodegradação, o grupo de moléculas nitrogenadas presente na MOD BB seria composto apenas por material refratário acumulado. Além disso, o grau de reatividade à UV está relacionado à estrutura tridimensional destas moléculas, que não é revelada por FTICRMS.

A fotoprodução de compostos com altas razões O/C mostraram a tendência de oxidação tanto da MOD EXTRA quanto da MOD BB, principalmente devido à fotoprodução de compostos oxidados, como observado por outros autores (Hansell et al 1997, Gonsior et al 2009). A oxidação pode ocorrer via mecanismos diretos e indiretos de ionização pela radiação UV. Mecanismos diretos envolvem absorção de radiação que causa a ionização direta da porção cromofórica da MOD (Zepp et al 1987, Bruccoleri et al 1993, Blough and Zepp 1995). Já a porção não cromofórica da MOD pode sofrer oxidação indireta, por meio da reação com radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (Gao e Zepp 1998, Anesio e Granéli 2004) formados pela fotólise do nitrato (NO_3^-) (Mack e Bolton 1999), que torna a MOD reativa ao oxigênio molecular (Blough e Zepp

1995). Ambos os mecanismos direto e indireto de oxidação da MOD provavelmente ocorreram simultaneamente, já que além de possuírem uma porção cromofórica, a MOD EXTRA e MOD BB são compostas por fração não cromofórica, e a irradiação foi realizada em meio rico em nitrato (meio de cultura ASM-1 e água do reservatório), o que pode ter favorecido a produção de $\cdot\text{OH}$ e desencadeado o mecanismo indireto de oxidação.

Finalmente, a irradiação de longo prazo tornou a composição atômica da MOD EXTRA mais similar à composição atômica da MOD BB, devido à remoção dos compostos CHON e ao caráter resistente das moléculas CHO, dominantes em águas naturais (Sleighter e Hatcher 2008), mostrando que a irradiação reduz a diversidade de composição atômica da MOD recém excretada.

Capítulo 3. Efeitos da radiação UV e da atividade microheterotrófica, separadamente e em associação, sobre a matéria orgânica dissolvida extracelular liberada por *Microcystis aeruginosa* em culturas axênicas.

3.1 Objetivos

(1) Avaliar o processo de biodegradação da MOD extracelular liberada por *M. aeruginosa* em culturas axênicas.

(2) Analisar os efeitos da radiação UVA e UVB sobre a biodisponibilidade da MOD extracelular liberada por *M. aeruginosa* em culturas axênicas,

(3) Analisar as alterações nas características químicas da MOD extracelular liberada por *M. aeruginosa* em culturas axênicas, causadas pelas atividades fotoquímica e biológica, separadamente e em associação.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Obtenção da MOD

Os experimentos descritos neste capítulo foram realizados exclusivamente com a MOD extracelular obtida em culturas axênicas de *M. aeruginosa*. A obtenção destas amostras de MOD foi realizada como já descrito em detalhes no Capítulo 2. Em resumo, a cianobactéria foi cultivada em condições axênicas em meio de cultura ASM-1, pH 7 (Gorham et al 1964), previamente autoclavado (121° C, 40 min). As culturas foram mantidas em sala acondicionada a 23°C (\pm 1), com ciclo luz:escuro de 12:12 h e intensidade de luz de 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas de 40 W do tipo ‘luz do dia’ e aeradas por agitação manual dos frascos, duas a três vezes ao dia. Após 60 dias de cultivo, ao final da fase exponencial do crescimento, as células foram separadas da MOD extracelular da cultura por filtração tangencial em cartuchos com membranas de polipropileno de 0.22 μm de diâmetro de poro (Pellicon Millipore), sob pressão máxima de 10 psi. O sistema de filtração foi pré-lavado com solução de NaClO 5 % e

enxaguado várias vezes com água ultrapura antes e após a filtração. A MOD extracelular menor que 0.22 μm foi utilizada nos experimentos.

3.2.2 Experimentação

No primeiro experimento, a amostra de MOD extracelular foi dividida em três alíquotas: a primeira não foi irradiada (chamada ao longo do texto de MOD inicial) e as demais foram irradiadas por 0.5 dia, uma com radiação UVA e a outra com UVB. No segundo experimento, a amostra de MOD extracelular foi dividida em MOD inicial (não irradiada) e MOD irradiada por 7 dias com radiação UVB. No terceiro experimento, a MOD extracelular foi dividida em MOD inicial (não irradiada) e irradiada por 7 dias com radiação UVA. Os períodos de 0.5 e 7 dias de irradiação foram baseados nos resultados obtidos no Capítulo 2. A irradiação destas amostras foi realizada em frascos de quartzo com 500 mL de capacidade, e as intensidades de radiação UVB e UVA foram iguais àquelas medidas na superfície do reservatório de Barra Bonita (3 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ e 25 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, respectivamente).

Imediatamente após a irradiação, foi adicionado o inóculo bacteriano às alíquotas de MOD não irradiada (= MOD inicial) e previamente irradiadas nas diversas condições descritas acima (= MOD pré irradiada). A coleta e preparação do inóculo bacteriano foi feita em sincronia com o fim de cada pré irradiação da MOD. O inóculo bacteriano foi coletado no *Little Creek Reservoir* (Norfolk, VA, EUA), que é um reservatório de água doce com nível de eutrofização ligeiramente menor do que o do reservatório de Barra Bonita onde há ocorrência de *Microcystis* sp. Uma amostra de água deste reservatório foi coletada a cerca de 30 cm da superfície em garrafa de vidro pré autoclavada e calcinada, de modo a evitar a contaminação com bactérias do ar. No laboratório, a amostra foi filtrada em membranas de fibra de vidro pré calcinadas de 1.2 μm de diâmetro de poro para remoção de zooplâncton, fitoplâncton e outras partículas maiores. O filtrado contendo as bactérias foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min a 4°C (Beckman J2-21) para sedimentação das células bacterianas e remoção da MOD proveniente do reservatório. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células bacterianas

sedimentadas foram ressuspensas e homogeneizadas em água ultra pura, e imediatamente inoculadas em igual volume nas alíquotas de MOD inicial e pré irradiada.

As culturas bacterianas em MOD inicial e pré irradiada nas condições descritas acima (em réplicas) foram mantidas a 30°C no escuro e aeradas por agitação manual dos frascos, e foram amostradas durante 27-28 dias, mais frequentemente durante os primeiros 5 dias. Ao longo do tempo de cultivo das bactérias, alíquotas das culturas contendo as células bacterianas foram obtidas para medidas de incorporação de timidina tritiada (H^3 -timidina). Outras amostras das culturas foram filtradas para retirada das bactérias em membranas de policarbonato de 0.22 μ m de diâmetro de poro previamente lavadas com 500 mL de água ultrapura. Nestas amostras foram realizadas as análises da MOD descritas no Capítulo 1.

3.3 Resultados

3.3.1 Incorporação de H^3 -Timidina e remoção de COD pelas bactérias

Os dados apresentados na Figura 1 indicaram que, de maneira geral, as culturas em MOD inicial apresentaram taxa de incorporação de H^3 -Timidina mais alta do que em MOD pré irradiada. Quando a MOD foi pré irradiada com UVA e UVB por 0.5 d (Figura 1a), as diferenças na taxa de incorporação foram mais significativas durante os primeiros 6 dias de cultivo das bactérias. A partir do 9º dia até o final do experimento, as diferenças foram menores. As três culturas apresentaram a mesma dinâmica ao longo do tempo, com aumento exponencial na produtividade até o 21º dia de cultivo, e declínio no 28º dia.

Quando a MOD foi pré irradiada por mais tempo (7 dias), a redução na taxa de incorporação de H^3 -Timidina foi mais acentuada (Figura 1b e 1c). Este efeito também foi mais evidente nos primeiros 5 dias de cultivo e a partir do 8º dia as diferenças diminuíram. A pré-irradiação da MOD por 7 dias causou a ocorrência de uma fase *lag* na produtividade bacteriana, que durou de 1 a 2 dias. Este ‘atraso’ no início da atividade bacteriana não foi observado nas culturas em MOD inicial.

As medidas de remoção de carbono orgânico dissolvido (COD) pela respiração não revelaram diferenças significativas no consumo de MOD inicial e pré irradiada (Figura 2a, b e c). É notável que a maior parte do carbono orgânico foi consumido durante os primeiros 5 ou 6 dias de cultivo, período coincidente com a maior produtividade bacteriana na MOD inicial. Após o 6º dia, quando as diferenças nas taxas de produtividade entre a MOD inicial e pré-irradiada tornaram-se menores, a maior parte do COD da MOD já havia sido removido.

3.3.2 Biodegradação da MOD-C

De maneira geral, as pré irradiações feitas com UVA e UVB resultaram em redução similar na absorbância da MOD cromofórica (MOD-C), especialmente em comprimentos de onda curtos (250 a 350 nm). Como apresentado no Capítulo 2, a irradiação da MOD extracelular por 0.5 dia resultou em produção de MOD-C de alta massa molecular, porém a filtração das amostras em membranas de 0.22 µm realizada nos experimentos de biodegradação removeu esta porção da MOD-C, que portanto não aparece no espectro de absorbância das Figuras 3 e 4.

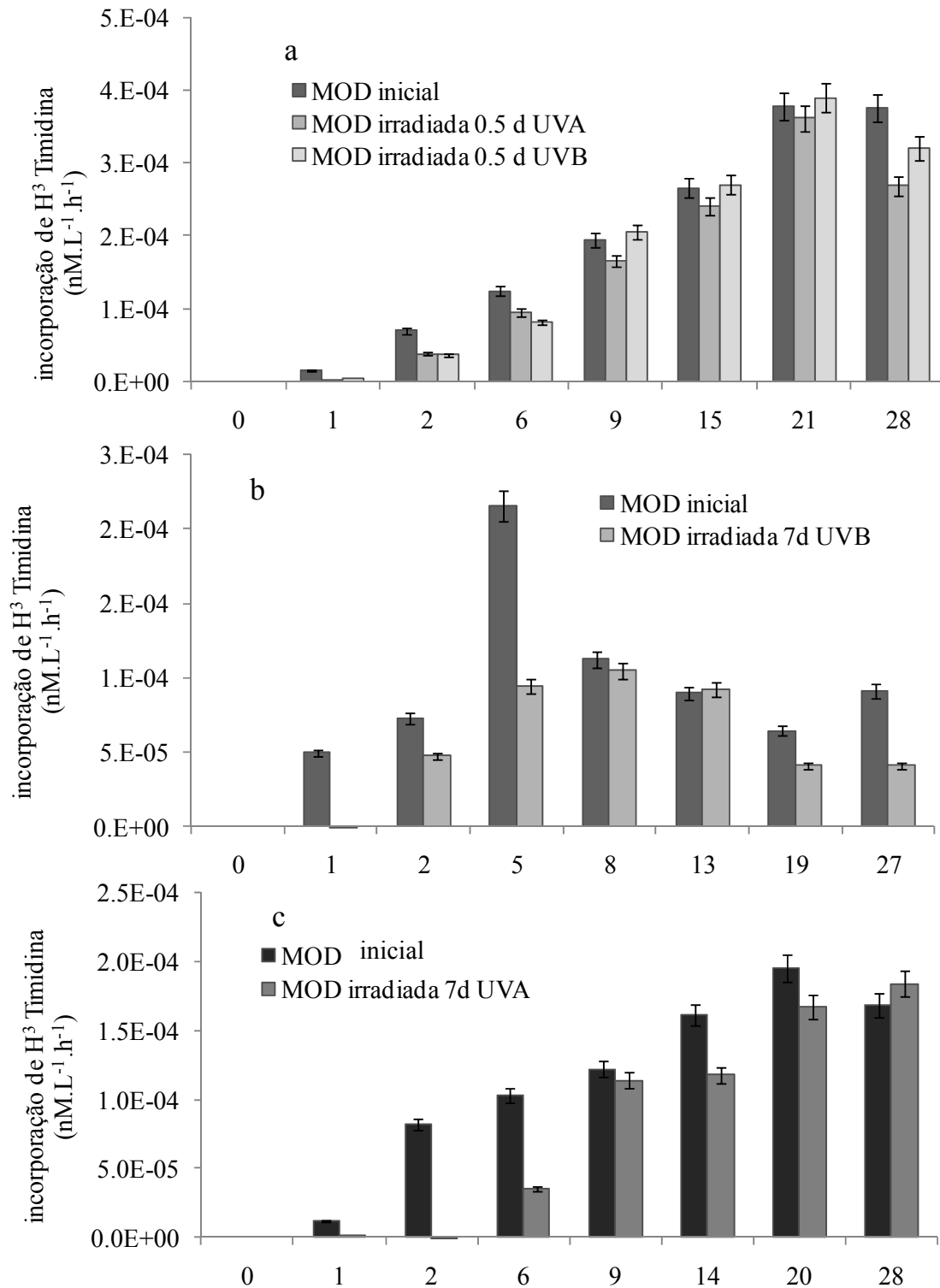


Figura 1. Variação na taxa de incorporação de H³-Timidina (nM.L⁻¹.h⁻¹) ao longo do tempo de cultivo da comunidade microheterotrófica em MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; inicial e pré irradiada por 7 dias com (b) UVB e (c) UVB; barras representam o desvio padrão.

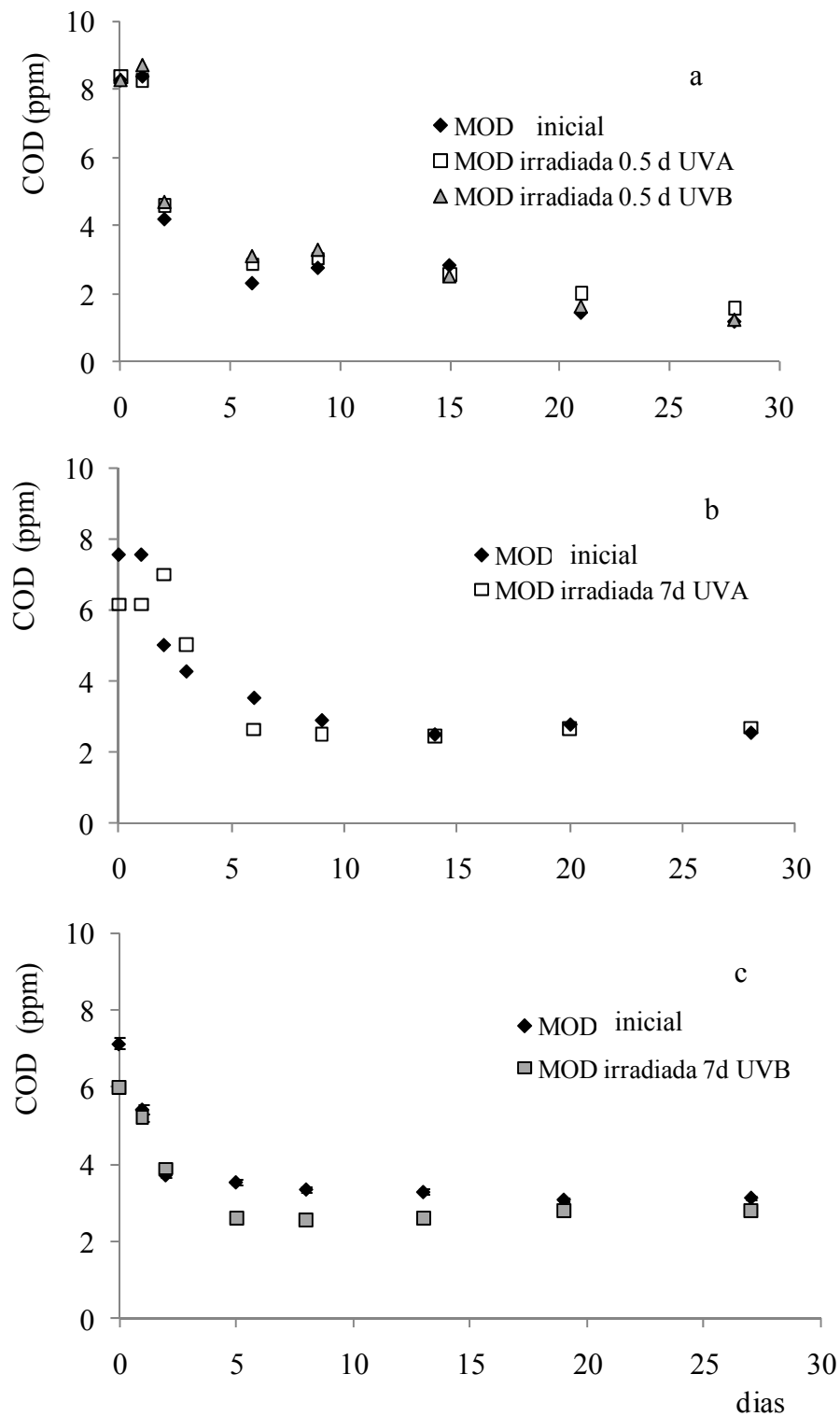


Figura 2. Variação na concentração de carbono orgânico dissolvido (COD, ppm) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; inicial e pré irradiada por 7 dias com (b) UVA e (c) UVB em função do tempo de cultivo das bactérias.

A redução da absorvância da MOD-C inicial resultante da atividade bacteriana foi mais acentuada do que a ocorrida na MOD-C das culturas de MOD pré irradiada por 0.5 dia (Figura 3a-c). Esta diferença pode ser mais facilmente observada pela comparação dos espectros de absorvância da última amostragem feita em cada cultura (dias 27 ou 28).

A pré-irradiação por 7 dias causou redução acentuada na absorvância da MOD-C, e revelou dois picos de material resistente à fotodegradação (Capítulo 2 e Figura 4). Durante a incubação com as bactérias, a MOD-C na amostra inicial foi gradualmente consumida ao longo do tempo, revelando que os mesmos picos resistentes à fotodegradação são também resistentes à biodegradação (Figura 4a e b). Na MOD-C pré irradiada por 7 dias não houve mudanças na intensidade nem na forma do espectro de absorvância ao longo do tempo de cultivo das bactérias, devido à remoção prévia da porção biodegradável nesta MOD-C pela exposição à UV (Figura 4c e d). Não houve fotoprodução detectável de MOD-C durante a atividade bacteriana durante o período estudado.

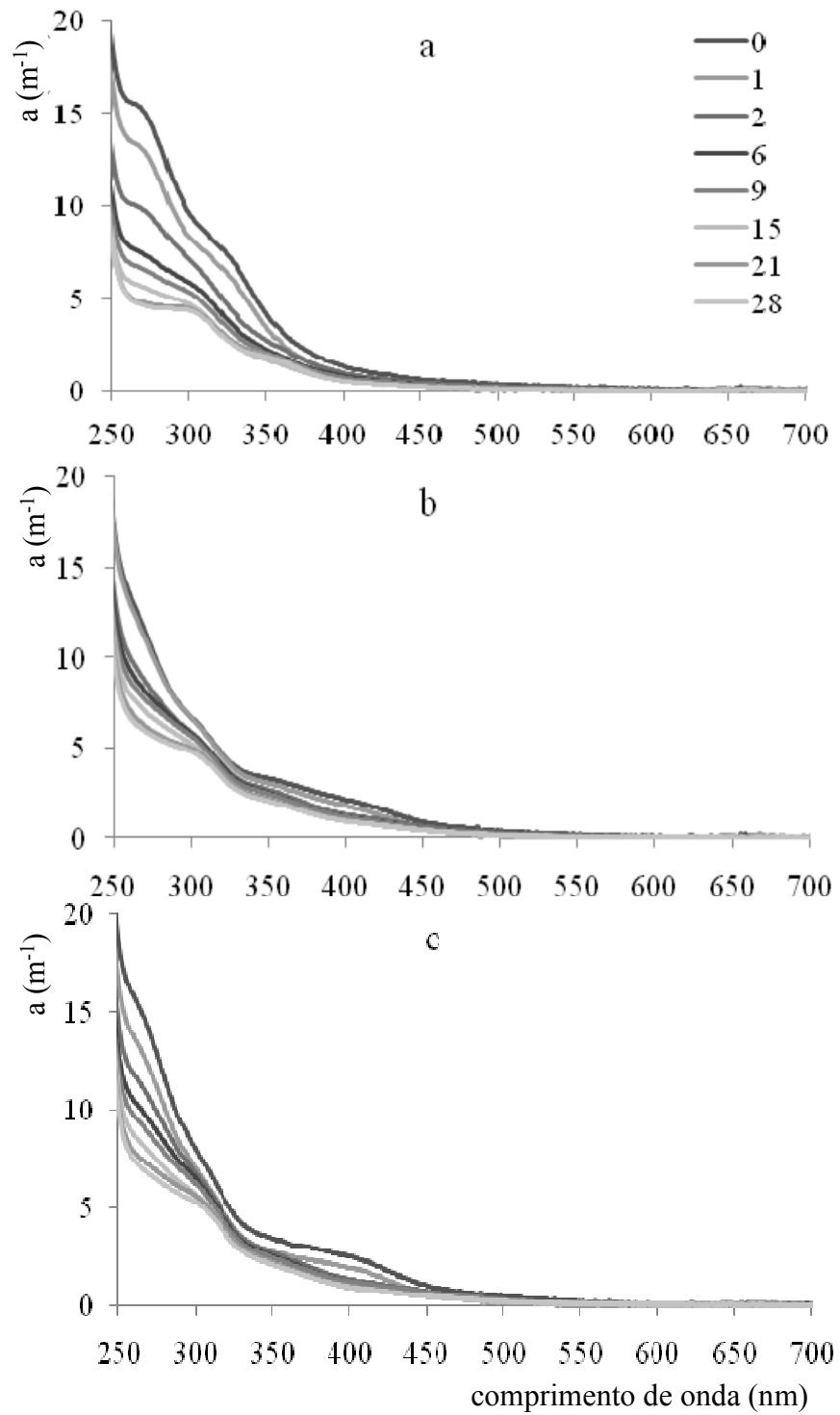


Figura 3. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*, inicial (a) e pré irradiada por 0.5 dia com (b) UVA e (c) UVB em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 28 dias).

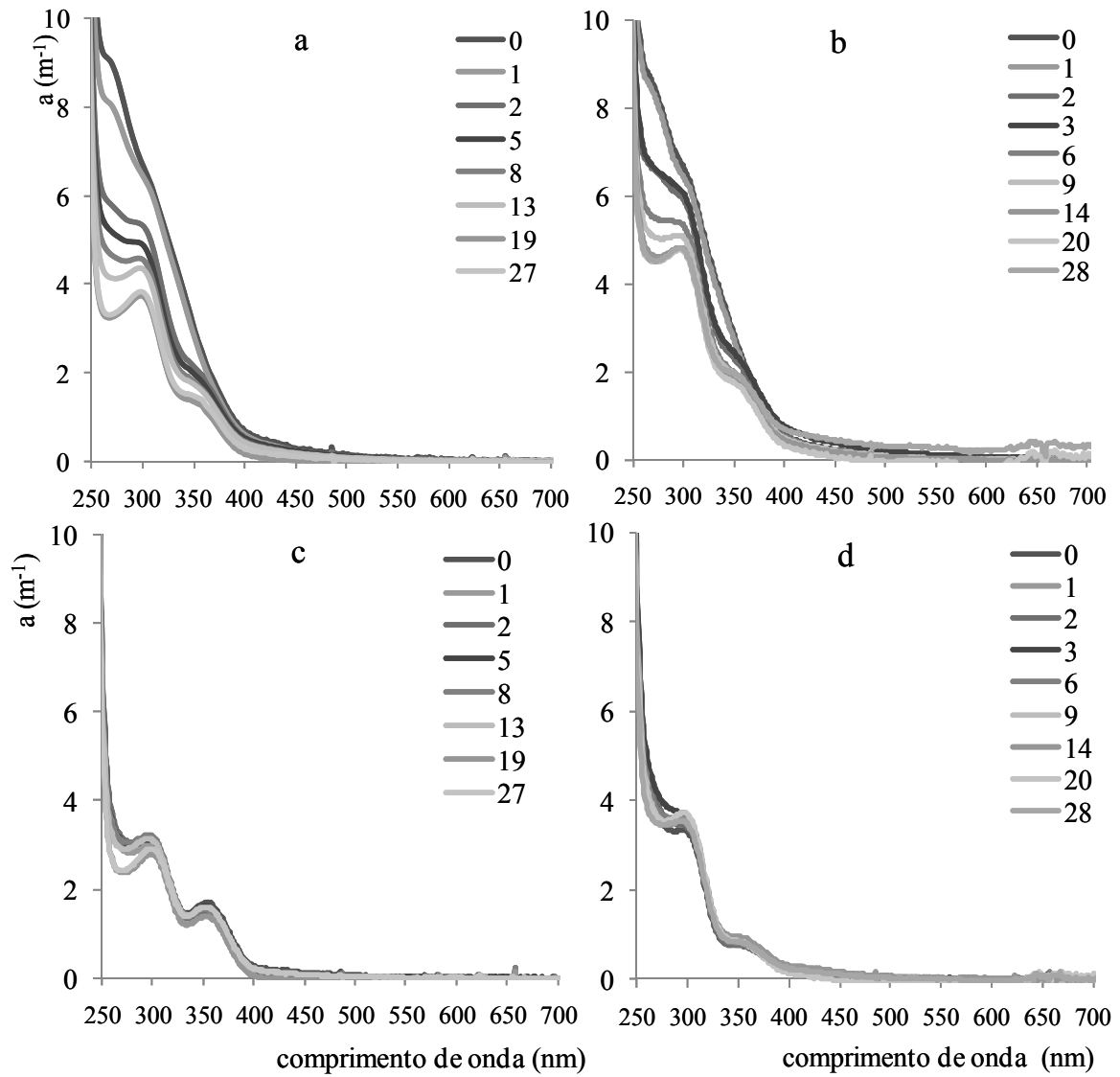


Figura 4. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*, (a e b) inicial e pré irradiada por 7 dias com (c) UVB e (d) UVA em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 27/28 dias).

3.3.3 Biodegradação da MOD-F

As análises da porção fluorescente da MOD (MOD-F) mostraram que *M. aeruginosa* excreta compostos com as características dos três tipos de material húmico encontrados na MOD-F de diversos ambientes naturais – picos A, C e M – e material protéico, T (Figuras 5a, 6a e 7a). Durante a incubação da MOD (inicial e pré irradiada) com a comunidade bacteriana, fluoróforos foram consumidos e produzidos. De maneira geral, a irradiação por 0.5 dia causou a remoção do pico correspondente ao material protéico, mas não do material húmico da MOD-F (Figuras 8a e 9a). Já a irradiação de longo prazo reduziu a intensidade de fluorescência de todos os fluoróforos (Figuras 10a e 11a), e nestas amostras o único pico observado foi o referente ao material húmico A, em intensidade de fluorescência bastante reduzida.

De maneira geral e a despeito das diferenças iniciais causadas pela pré irradiação na MOD-F, a dinâmica dos fluoróforos ao longo do processo de biodegradação da MOD inicial e pré irradiada por 0.5 e 7 dias foi bastante similar. O padrão observado foi o seguinte: o pico de fluorescência correspondente às proteínas foi drasticamente reduzido nos primeiros 3 dias de biodegradação da MOD inicial e a intensidade de fluorescência dos materiais húmicos A e C também diminuiu em função do tempo devido à atividade bacteriana, porém mais lentamente do que a redução da fluorescência do material protéico (Figuras 5, 6 e 7). Notavelmente, o material húmico A foi degradado mais lentamente do que os demais, estando presente até o final dos experimentos em que esteve presente inicialmente (MOD inicial e pré irradiada por 0.5 dia, Figuras 5-9). Em todos os experimentos (Figuras 5-11), um terceiro processo foi observado durante a biodegradação e se refere ao surgimento e aumento na intensidade de fluorescência do material M, da metade até a fase final do cultivo das bactérias. A formação deste material parece ter ocorrido pela transformação dos compostos húmicos do pico C, pela tendência de redução nos comprimentos de onda de emissão e excitação deste fluoróforo, que pode ser observada pela formação gradual de um ‘rastros’ que conecta os picos C e M.

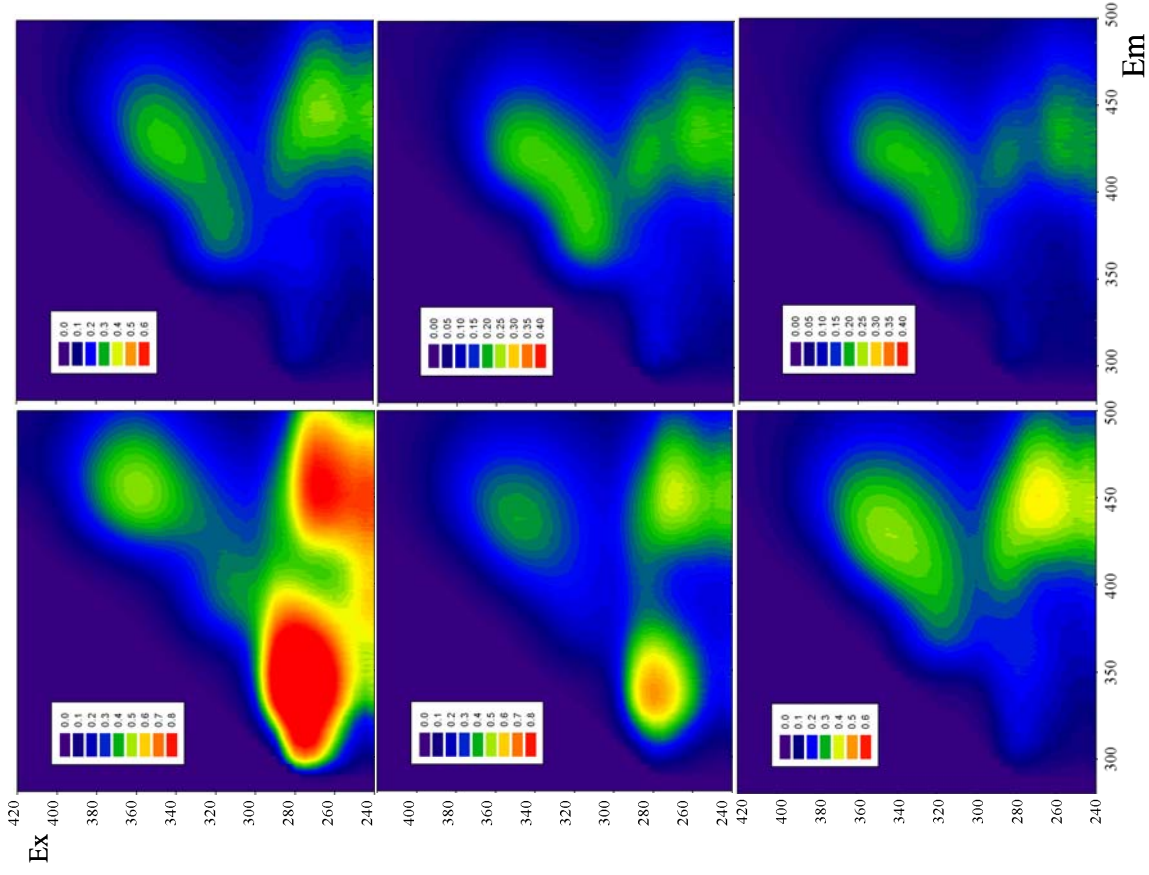


Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias.

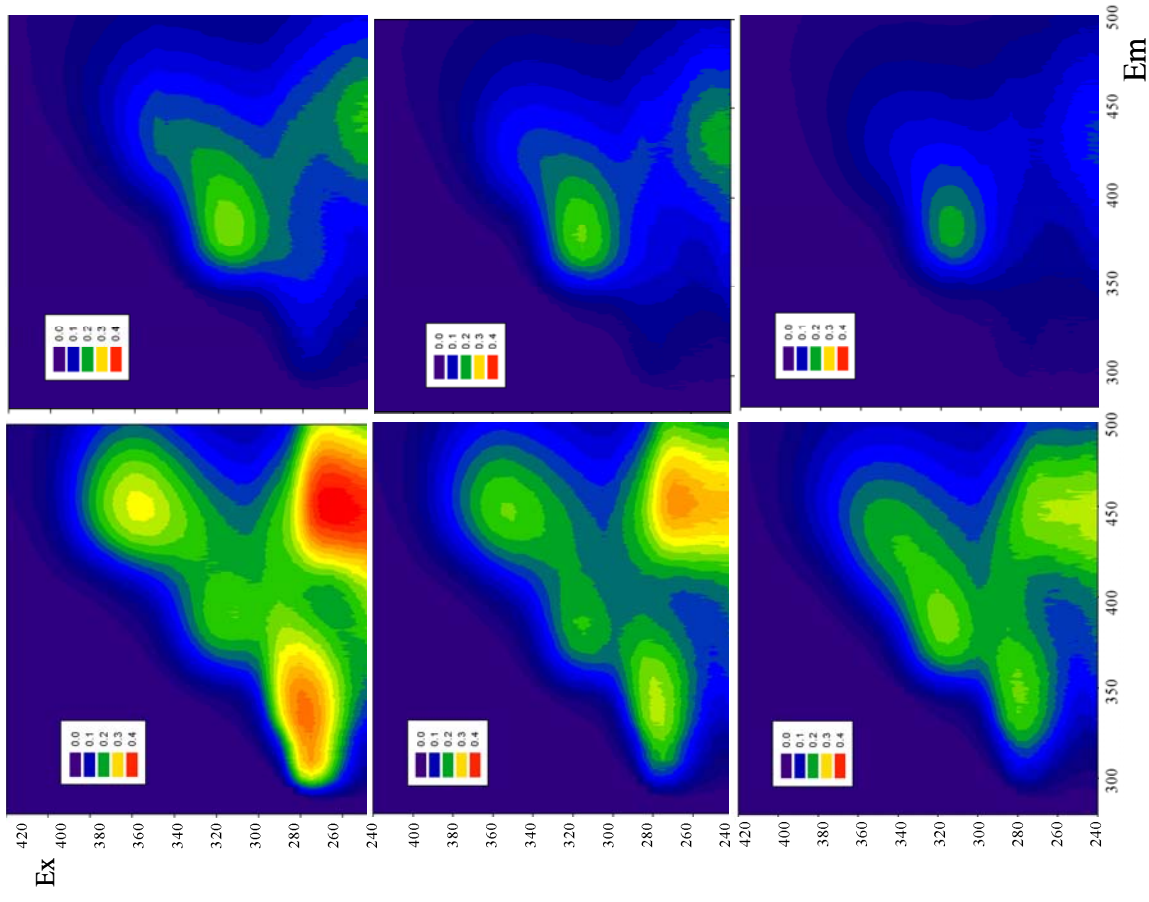


Figura 6. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 3, (d) 6, (e) 14 e (f) 28 dias.

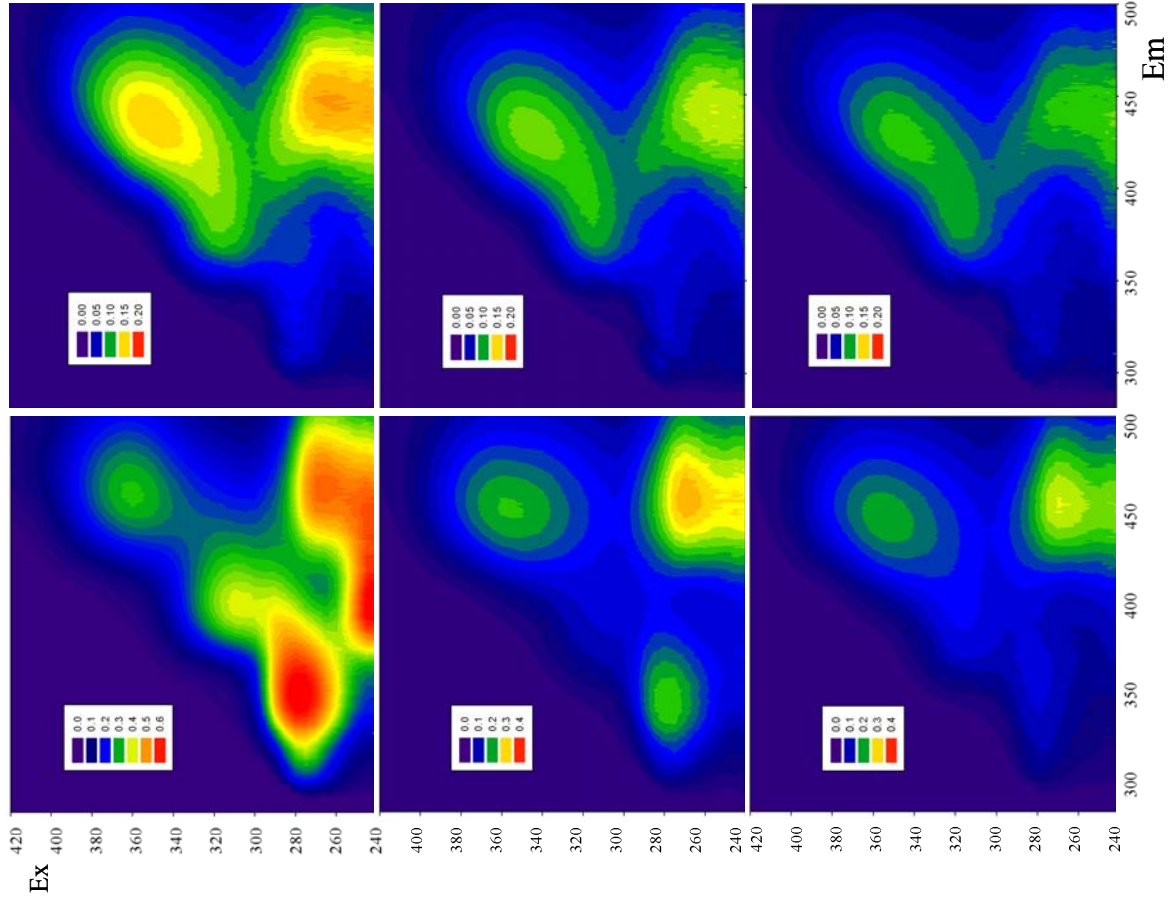


Figura 7. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial excretada por *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 5, (d) 13, (e) 19 e (f) 27 dias.

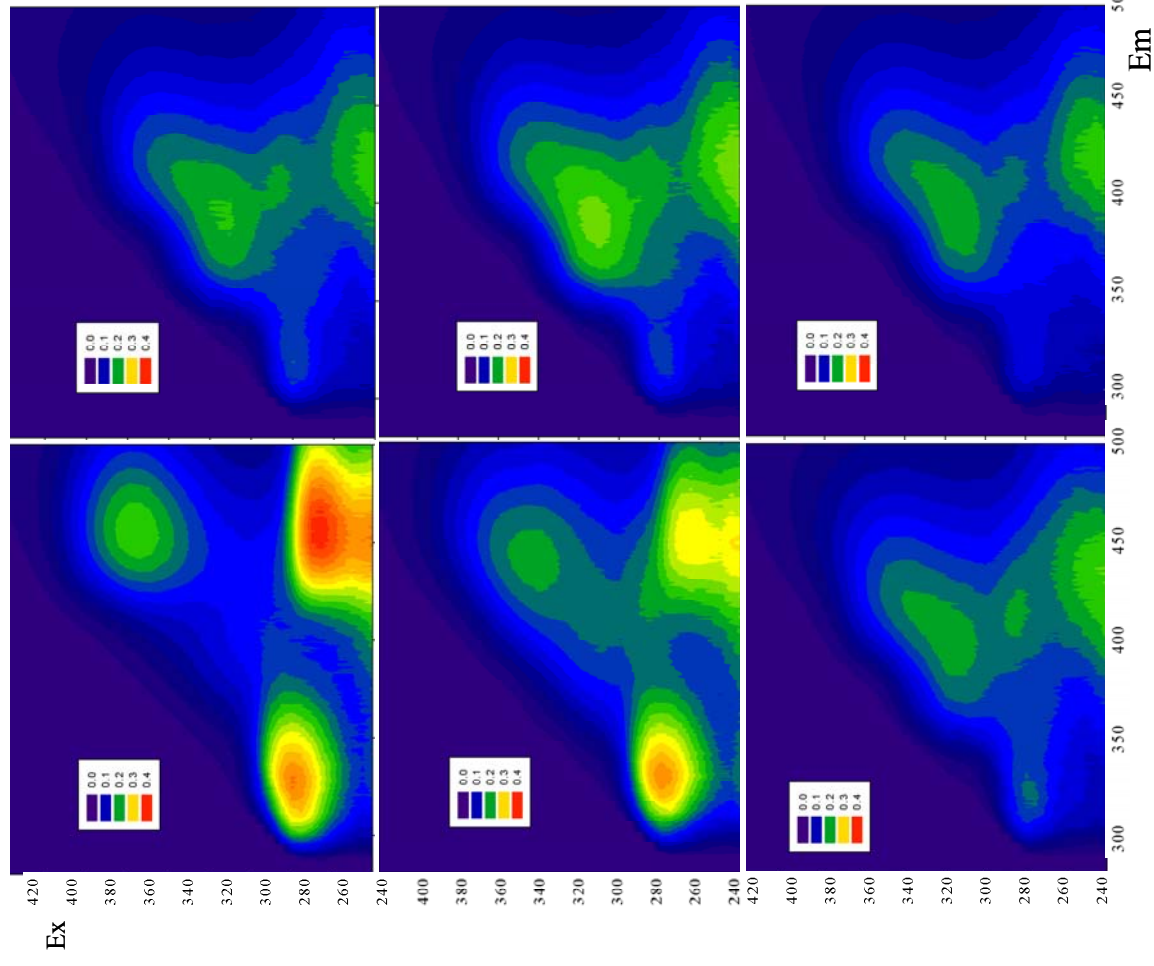


Figura 8. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias.

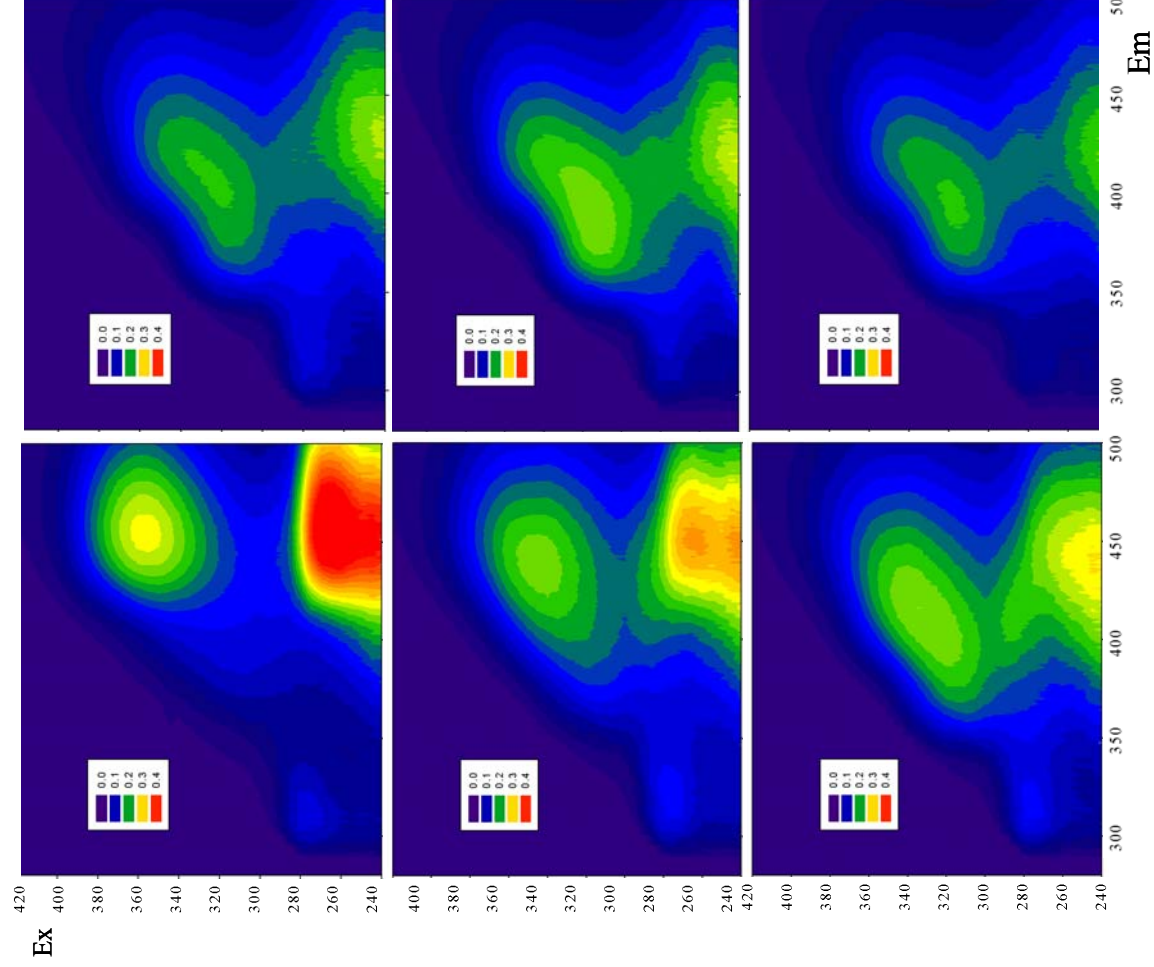


Figura 9. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 6, (d) 9, (e) 15 e (f) 28 dias.

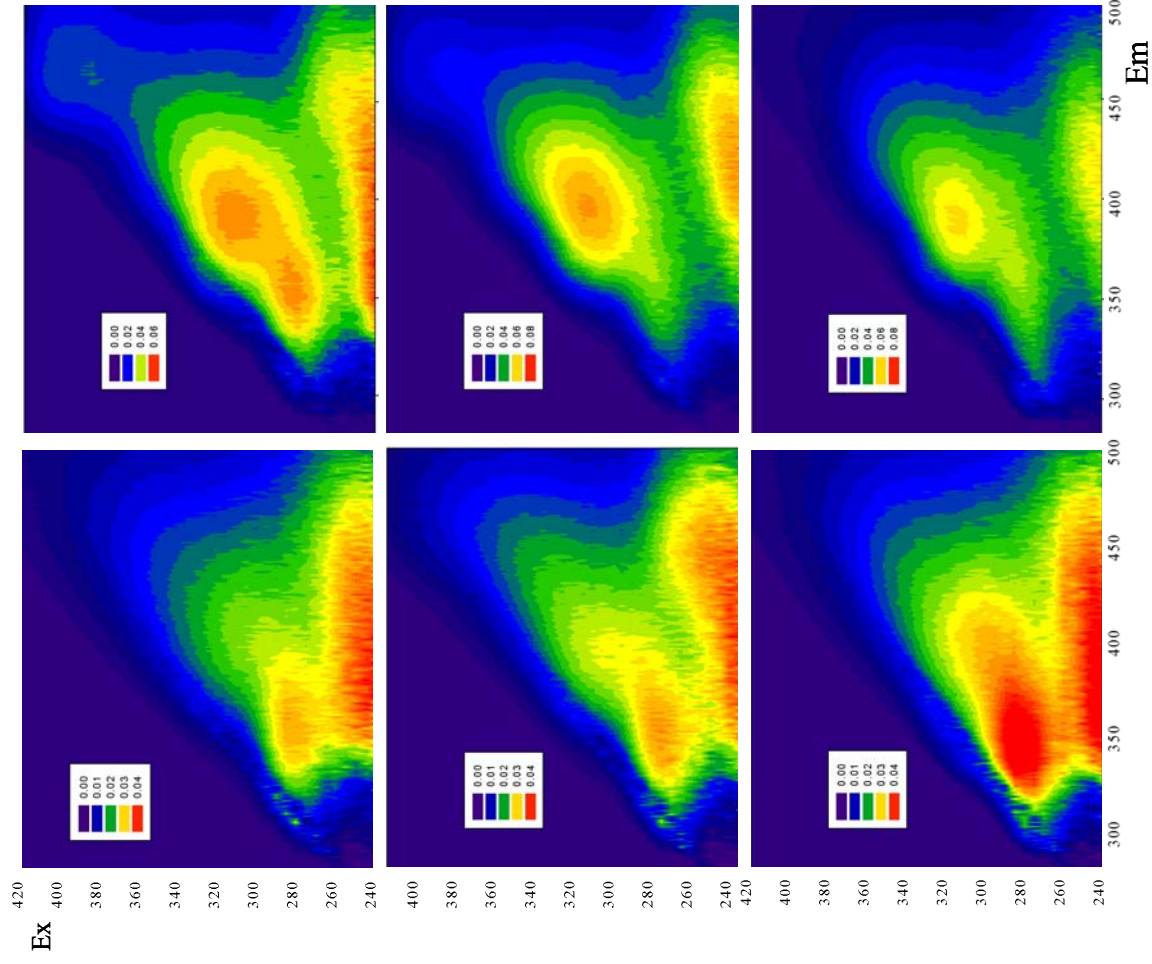


Figura 10. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 3, (d) 6, (e) 14 e (f) 28 dias.

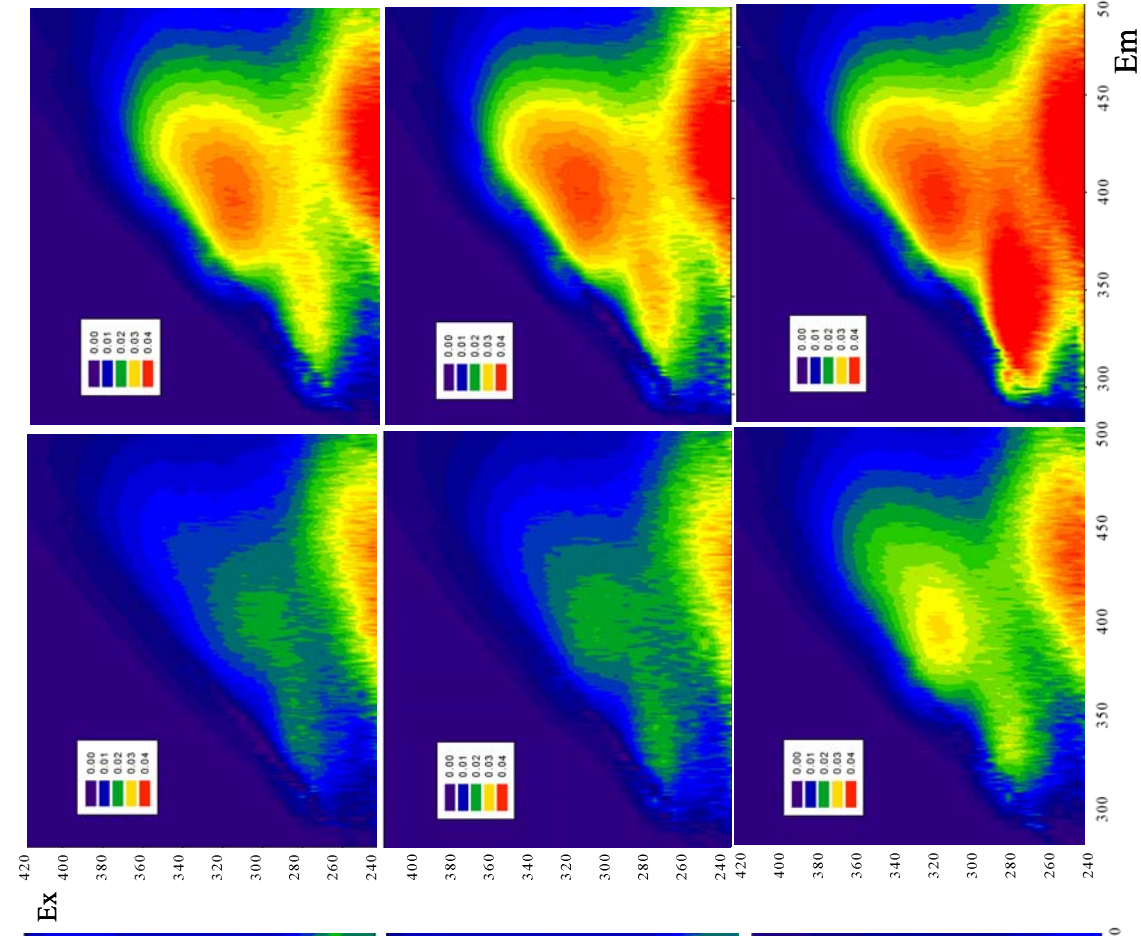


Figura 11. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F excretada por *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 2, (c) 5, (d) 13, (e) 19 e (f) 27 dias.

3.3.4 Espectrometria de massa (FTICRMS) da MOD foto e/ou bioalterada

Quatro amostras deste conjunto de experimentos foram escolhidas para análises de FTICRMS no modo positivo de ionização: MOD inicial, MOD irradiada (UVB, 7 dias), MOD inoculada (bioprocessada, após 2 dias de cultivo), e MOD irradiada (UVB, 7 dias) e em seguida inoculada (bioprocessada, após 2 dias de cultivo); para efeitos práticos esta última poderá ser referida como MOD irradiada + inoculada. As análises pareadas destas amostras possibilitaram a análise dos processos químicos e biológicos, separadamente e associados, e a identificação de grupos de compostos lábeis (bio ou fotodegradados), refratários (bio ou fotorresistentes) e produzidos (bio ou fotoprodutos), e também a elucidação do processo de redução da biodisponibilidade da MOD causada pela pré exposição à UV.

A classificação dos compostos identificados por FTICRMS foi feita quanto à estrutura química das moléculas, em compostos alifáticos, aromáticos ou moléculas alicíclicas ricas em grupos carboxílicos (CRAM). Este critério de classificação permitiu a identificação de 84 - 90 % dos compostos nas quatro amostras. As moléculas foram também agrupadas quanto à composição química das fórmulas CHO, CHON, CHOS. Apesar de 8 tipos de fórmulas químicas terem sido encontrados, estas três composições foram as mais abundantes, representando juntas 43 – 52 % dos compostos. A Tabela I apresenta de maneira genérica a composição das quatro amostras analisadas.

A Figura 12a mostra as características da MOD inicial excretada por *M. aeruginosa* no diagrama de Van Krevelen, composta em sua maioria por material alifático, de baixa razão O/C. Quanto às fórmulas químicas, observou-se que os 3 tipos estudados representaram frações significantes do total identificado (Figura 12b), especialmente os compostos nitrogenados (CHON).

Tabela I. Caracterização da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* inicial, irradiada, inoculada e irradiada + inoculada: número total de compostos; número e contribuição percentual de compostos resistentes e produzidos devido à atividade biológica e fotoquímica; e contribuição proporcional dos tipos estruturais e de composição atômica (fórmulas químicas).

MOD	Componentes	Total	%	Tipos estruturais (%)				Fórmulas químicas (%)			
				% identificada	Alifáticos	GRAM	Aromáticos	% identificada	CHO	CHON	CHOS
inicial	n/a	468	100	84	78.6	3.4	1.9	49	13.6	22.0	13.6
irradiada	Fotoprodutos	361	100	90	83.9	4.1	2.2	52	21.6	22.4	8.0
	Fotoresistentes	137	38.0								
inoculada	Bioprodutos	620	100	89	85.1	2.6	1.4	43	13.0	19.5	10.6
	Bioresistentes	457	73.7								
irradiada + inoculada	Bioprodutos	163	26.3								
	Bio e fotoresistentes	456	100	86	80.9	3.3	1.7	46	14.9	21.7	9.8
	Fotoprodutos bioresistentes	280	61.4								
		75	16.4								
		101	22.1								

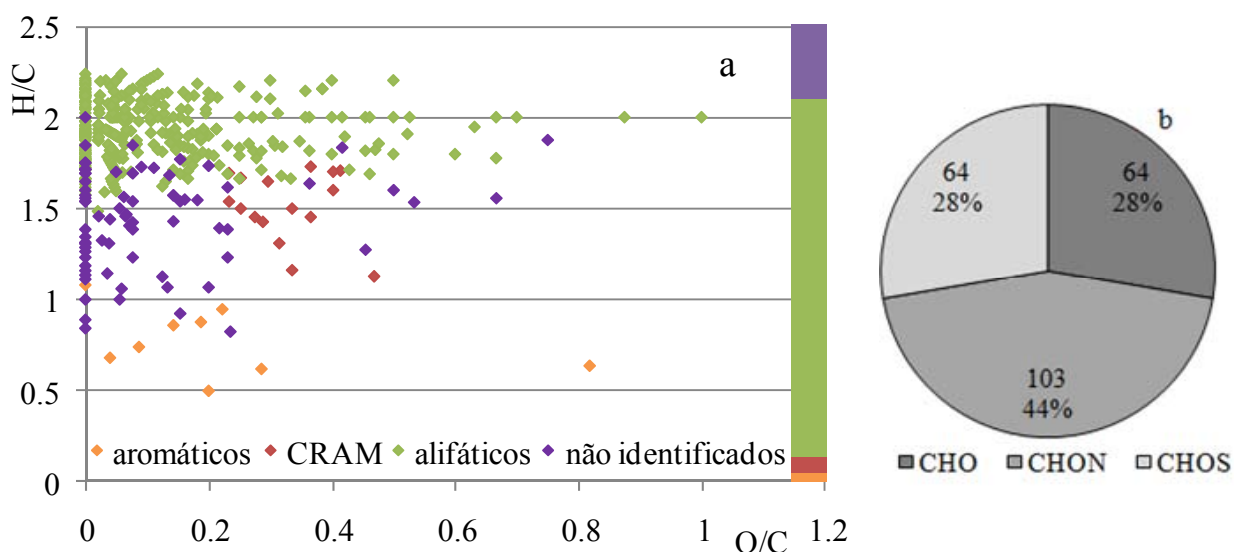


Figura 12. Caracterização química da MOD extracelular inicial de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica, em número de compostos e proporção (%).

Como resultado do processo de irradiação da MOD e incubação com as bactérias, parte da MOD foi degradada e parte permaneceu intacta. Além destes dois grupos de compostos identificados (nomeados foto ou biodegradados, e foto ou biorresistentes), também foi identificado o grupo de compostos produzidos por estes processos (foto e bioprodutos, respectivamente). A Figura 13 mostra a distribuição estrutural no diagrama de Van Krevelen destes três grupos de compostos resultantes da atividade bacteriana (13a-c) e fotoquímica (13d-f) da MOD. É possível observar que os diagramas dos compostos biorresistentes (13a) e fotorresistentes (13d) são bastante similares, assim como os compostos biodegradados (13b) e fotodegradados (13d). Notavelmente, os bioprodutos foram muito mais numerosos do que os fotoprodutos (13c e 13f, Tabela I), embora ambos tenham sido dominados por compostos alifáticos.

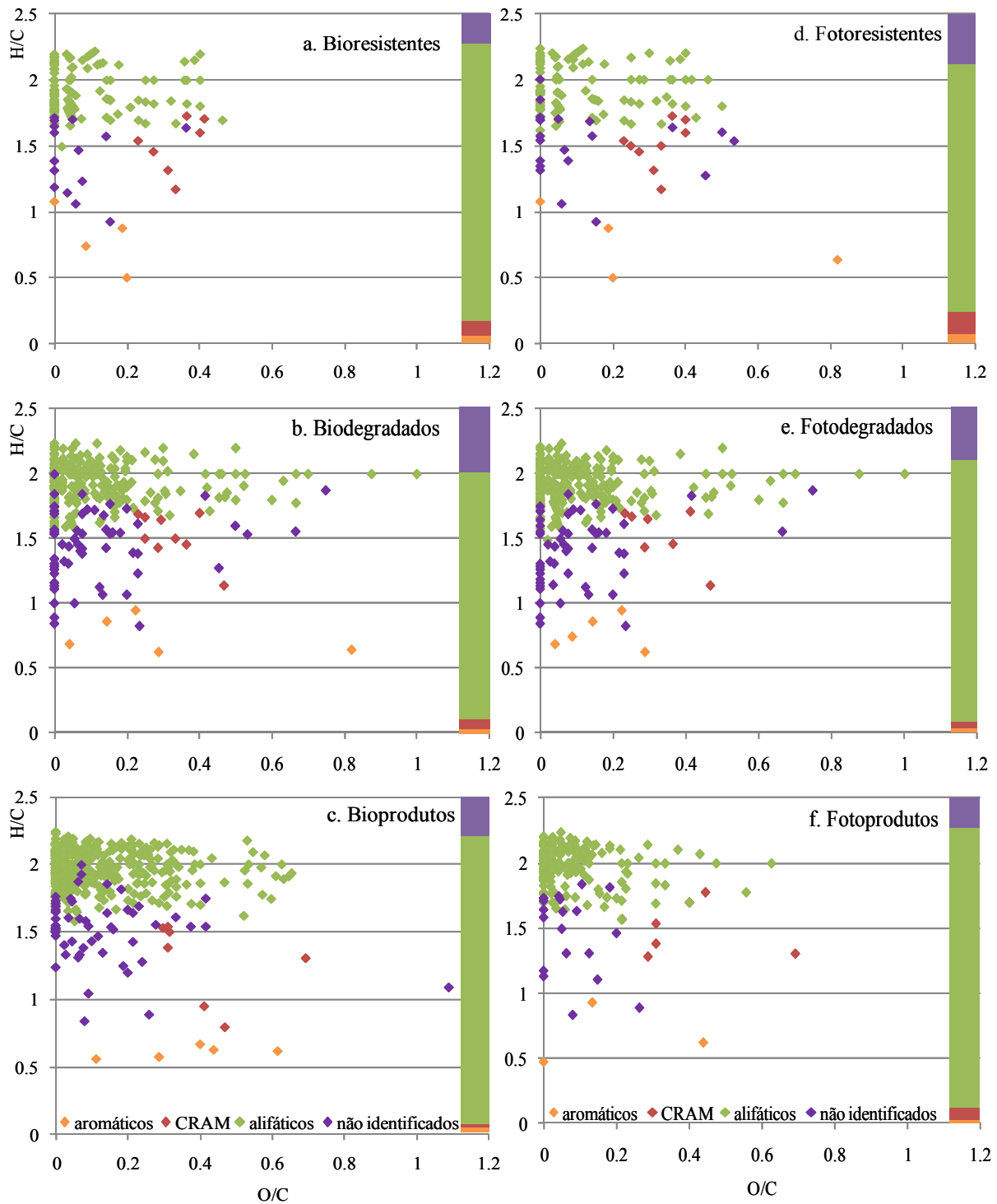


Figura 13. Diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural dos compostos degradados, resistentes e produzidos após 2 dias de atividade biológica (a, b, c, respectivamente) e 7 dias de atividade fotoquímica (d, e, f, respectivamente) sobre a MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*. As barras representam a contribuição porporcional de cada classe.

Alguma semelhança entre os compostos resistentes e degradados pelos dois processos também foi observada quando a MOD foi classificada de acordo com as fórmulas químicas (Figura 14). Os compostos CHO compuseram uma importante fração dos compostos bio e foto resistentes (14a e 14d); os compostos contendo enxofre (CHOS) foram os mais abundantes dentre os biorresistentes (14a). Compostos nitrogenados (CHON) representaram a maioria dos compostos degradados por ambos processos (14b e 14e). Os bio e fotoprodutos foram bastante similares quanto à sua composição atômica, sendo ambos dominados por compostos contendo nitrogênio (14c e 14f).

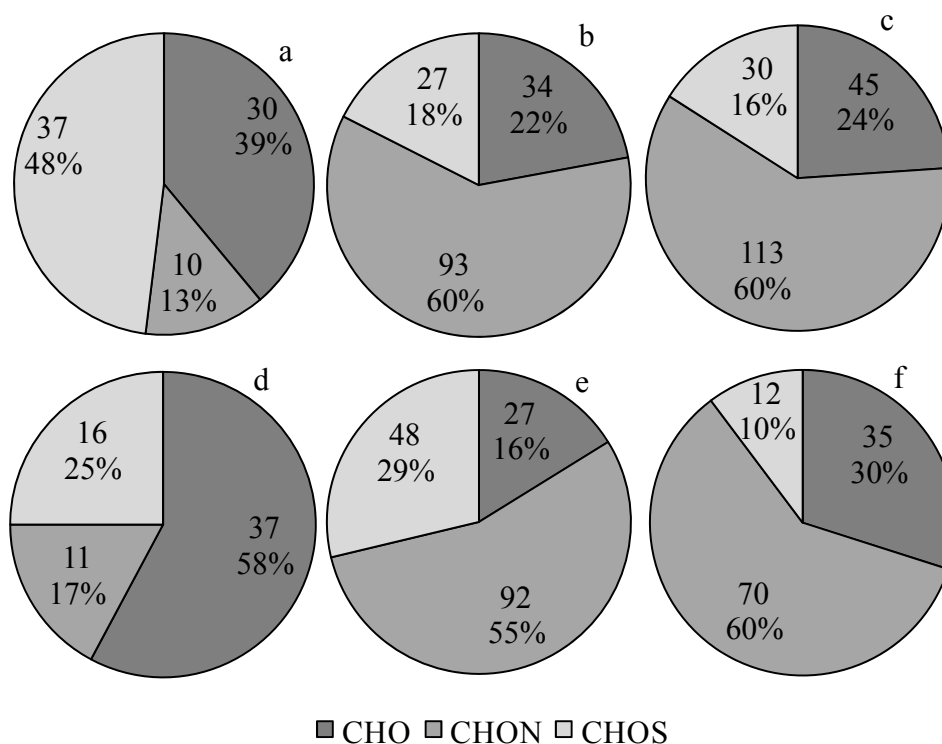


Figura 14. Composição atômica, em número e contribuição proporcional (%), dos grupos de compostos (a) biorresistentes, (b) biodegradados e (c) bioproduzidos após 2 dias de atividade biológica e (d) fotorresistentes, (e) fotodegradados e (f) fotoproduzidos após 7 dias de atividade fotoquímica sobre a MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*.

A avaliação quanto à estrutura e fórmulas químicas dos compostos degradados e resistentes a ambos processos em relação proporcional à composição da MOD inicial permitiu avaliar tendências ou preferências de cada processo relativas aos tipos moleculares estruturais e atômicos (Figuras 15 e 16). Foi observado, por exemplo, que compostos CHON foram preferencialmente biodegradados (Figura 15a). Embora alifáticos tenham representado a maior parte dos compostos biodegradados, eles foram considerados apenas o segundo grupo preferencialmente biodegradado, após o grupo de compostos não identificados (Figura 15b). A atividade fotoquímica removeu principalmente os compostos CHON, mas também causou degradação de grande parte dos compostos CHOS (Figura 16a). Alifáticos e compostos não identificados foram preferencialmente fotodegradados em comparação com aromáticos e CRAM (Figura 16b).

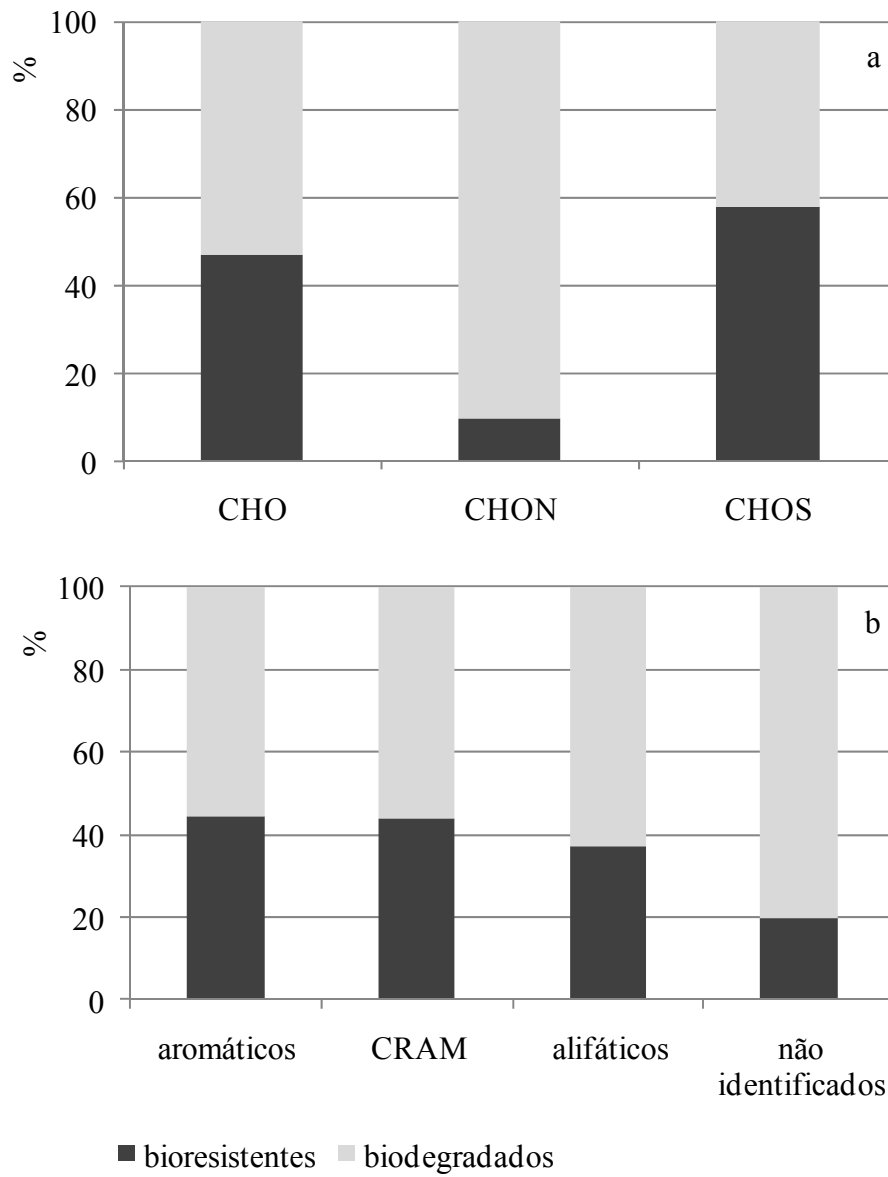


Figura 15. Proporção (%) entre compostos biorresistentes e biodegradados, pertencentes às diversas classes (a) de composição atômica e (b) estruturais da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*.

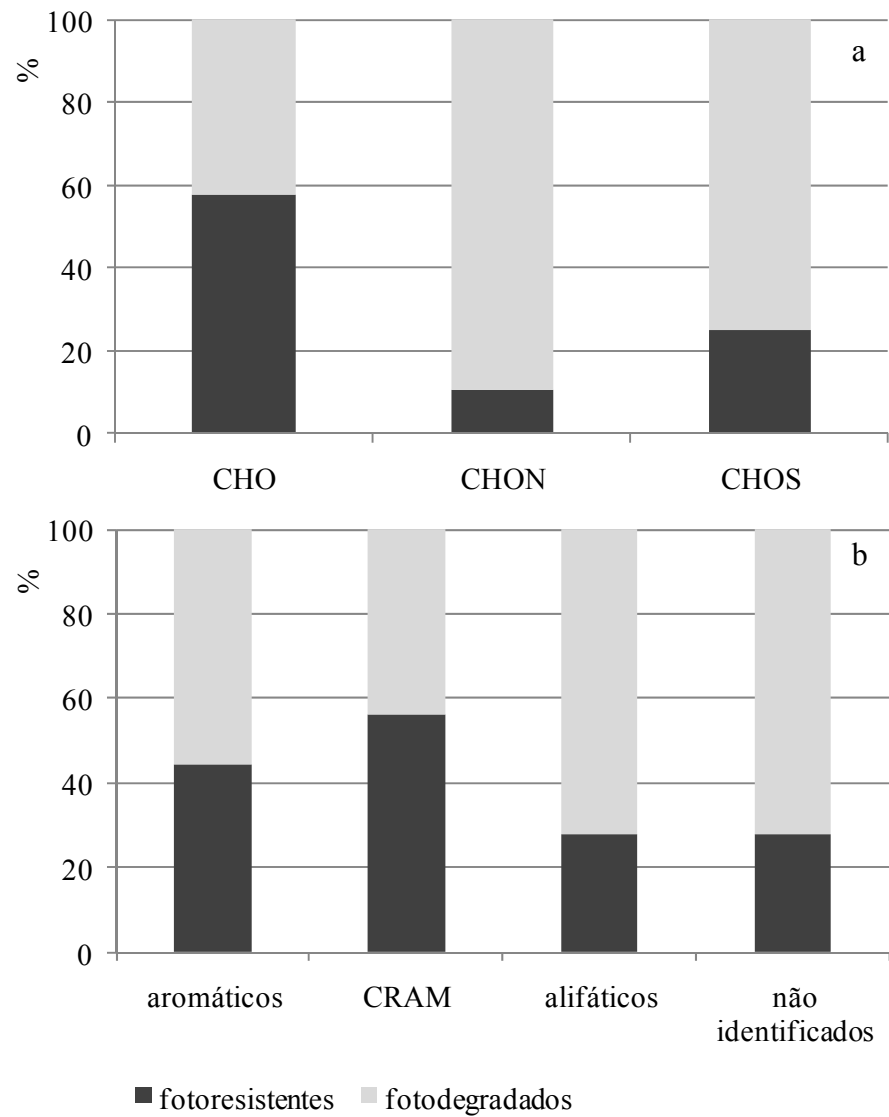


Figura 16. Proporção (%) entre compostos fotoresistentes e fotodegradados, pertencentes às diversas classes (a) de composição atômica e (b) estruturais da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*.

Em resumo, a análise da MOD por FTICRMS nestas amostras mostrou que os tipos de compostos preferencialmente biodegradados foram em sua maioria coincidentes com aqueles que foram preferencialmente fotodegradados. A análise da absorvância da MOD também indicou que a porção biodegradável da MOD-C foi coincidente com a porção fotodegradável. A lista de moléculas que foram apontadas como simultaneamente bio e fotodegradadas foi obtida pela comparação entre os grupos ‘biodegradados’ e ‘fotodegradados’. Foram encontrados 264 compostos presentes na MOD inicial, que foram degradados pelos dois processos, o que representa 56 % da MOD inicial. Trata-se, portanto, de uma fração considerável da MOD que sofre a competição entre estes dois mecanismos de degradação. A Figura 17 mostra que este grupo de moléculas é dominado por compostos alifáticos (17a) e nitrogenados (64%, 17b) e a Figura 18 mostra que proporcionalmente às quantidades iniciais, a competição atinge de fato preferencialmente compostos nitrogenados (CHON, 18a) e alifáticos e não identificados (18b).

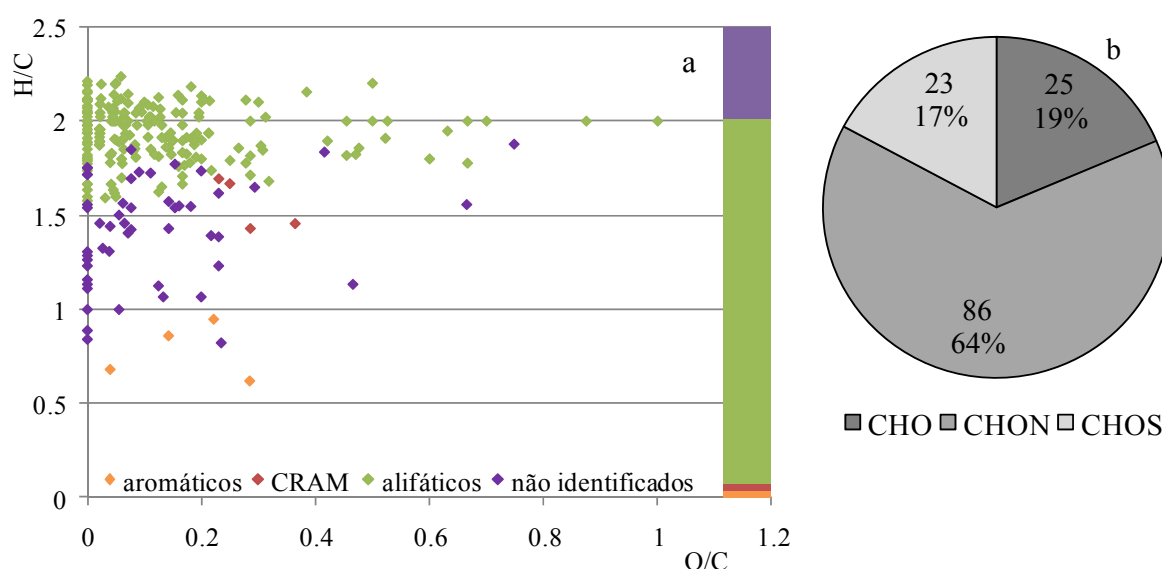


Figura 17. Composição química dos compostos simultaneamente bio e fotodegradados da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica em número e proporção (%).

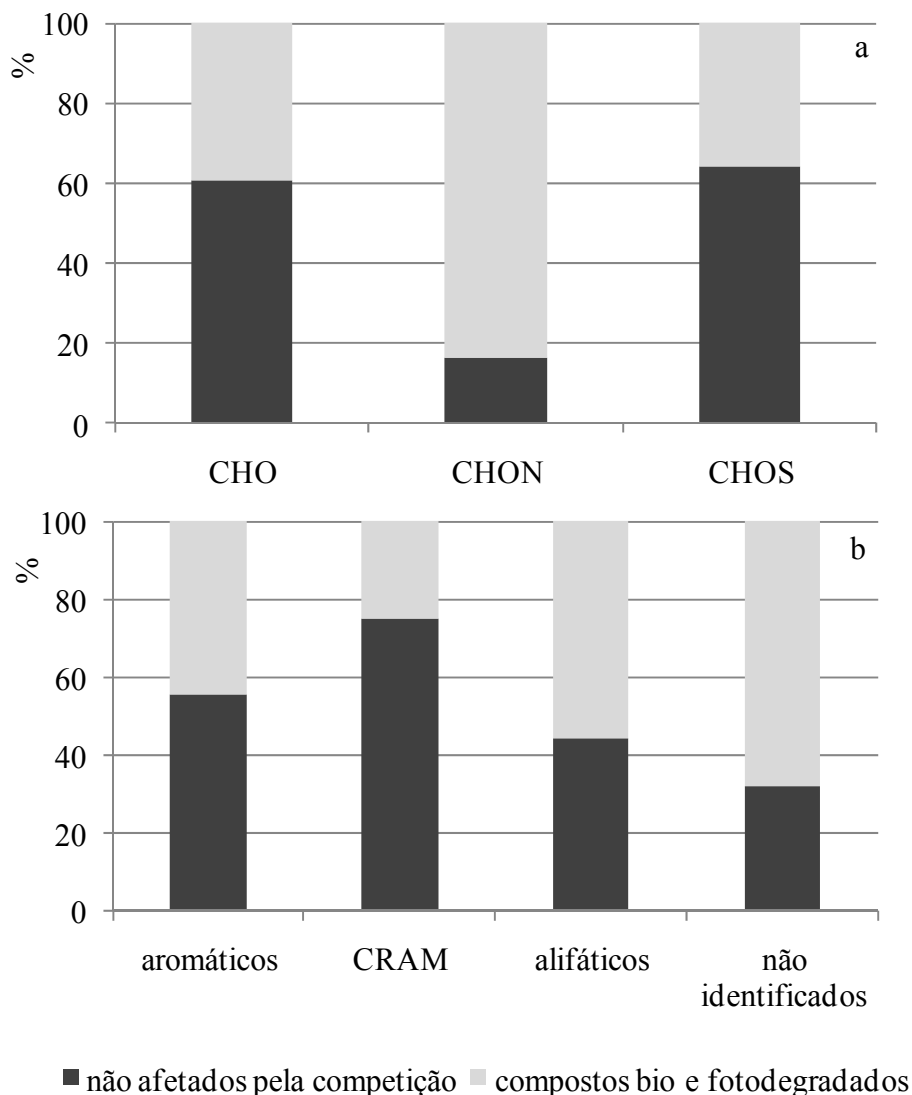


Figura 18. Proporção (%) entre compostos simultaneamente bio e fotodegradados e compostos resistentes a ambos processos, pertencentes às diversas classes (a) estruturais e (b) de composição atômica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*.

Por outro lado, apenas 75 compostos foram identificados como os mais resistentes da MOD inicial, tendo sido preservados após a irradiação e a subsequente atividade biológica sobre a MOD pré irradiada, ou seja, compostos que foram encontrados na MOD inicial, MOD irradiada e MOD irradiada + inoculada. Esta porção mais resistente da MOD representou apenas 16 % da MOD inicial, e foi notavelmente dominada por moléculas CHO (72%, Figura 19).

Outra maneira de identificar os compostos refratários seria pela comparação entre os grupos ‘biorresistentes’ e ‘fotorresistentes’; este procedimento identificou 96 compostos comuns, 20 % da MOD inicial. Ambos os meios de identificação dos compostos refratários resultaram em proporções semelhantes, mostrando que os procedimentos experimentais distintos, ou seja, análise em separado e em associação dos dois processos, não alterou significativamente estes resultados.

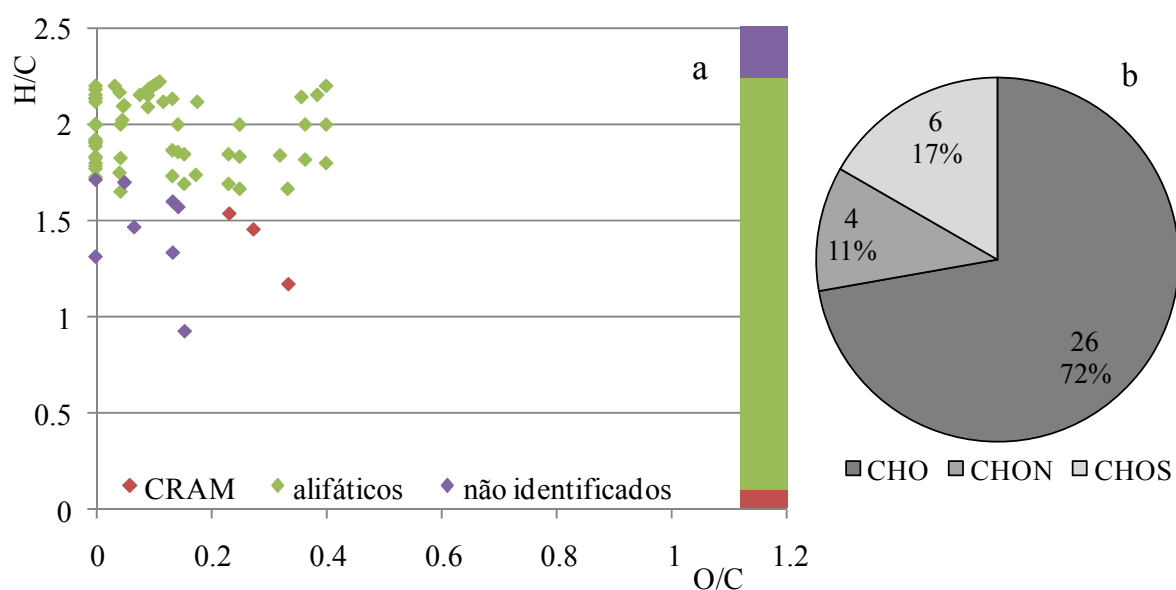


Figura 19. Composição química dos compostos resistentes à degradação biológica e fotoquímica da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica, em número e proporção (%).

Embora a pré-irradiação tenha causado notável redução no número de bioprodutos (Tabela I, Figura 20), a composição estrutural de ambos foi amplamente dominada por compostos alifáticos (Figura 20a e b). Compostos sulfurosos (CHOS), no entanto, foram menos representativos dentre os bioprodutos da MOD inicial, do que dentre os da MOD pré irradiada (Figura 20c e d).

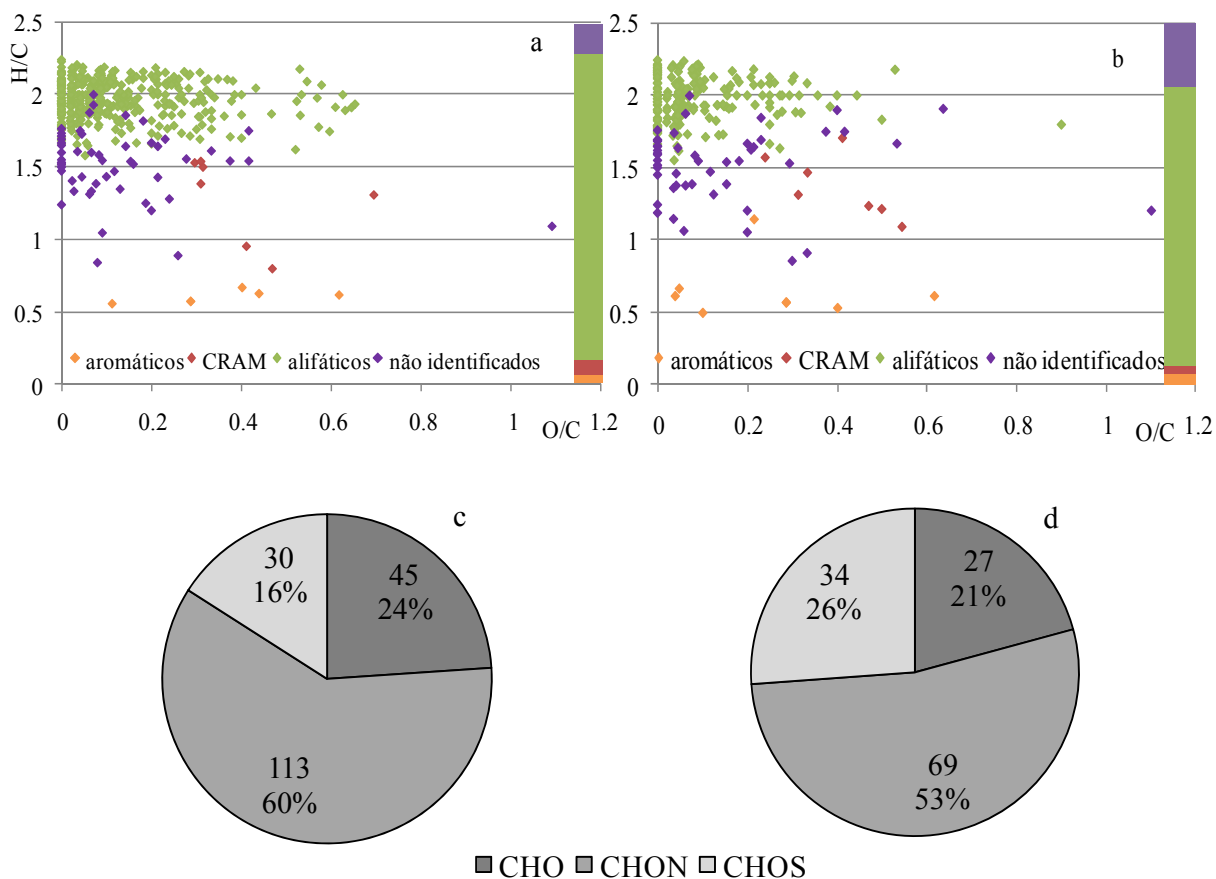


Figura 20. Composição química dos bioprodutos da atividade biológica sobre a MOD extracelular inicial (painéis a e c) e pré irradiada (painéis b e d) de *Microcystis aeruginosa*: (a e b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%).

Além da atividade biológica sobre a MOD inicial ter resultado em número maior de bioprodutos do que a atividade sobre a MOD pré irradiada, os últimos foram também caracterizados por menores massas moleculares (436 x 619, Mann-Whitney, $p < 0.0001$). Esta diferença em termos de massa molecular dos bioprodutos está provavelmente relacionada à redução da ‘qualidade’ da MOD pré irradiada disponível às bactérias, já que em termos de massa molecular a irradiação não alterou significativamente a massa molecular da MOD (437 x 419, Mann-Whitney, $p = 0.1693$).

Dentre os fotoprodutos, 55 % foram consumidos em seguida pelas bactérias nas culturas em MOD pré irradiada, enquanto 44 % foram preservados, dentro de 2 dias de cultivo. Dentre os elementos estruturais dos fotoprodutos, aromáticos e CRAM fotoproduzidos foram preferencialmente consumidos em relação a alifáticos e não identificados (Figura 21a e b). Quanto à composição ou fórmula química, os fotoprodutos biodegradados e biorresistentes foram muito semelhantes (Figura 21c e d). O consumo bacteriano de fotoprodutos não foi direcionado pela massa molecular, já que as diferenças em massa molecular entre fotoprodutos biodegradados (675) e biorresistentes (614) não foram estatisticamente significativas (Mann-Whitney, $p = 0.6847$).

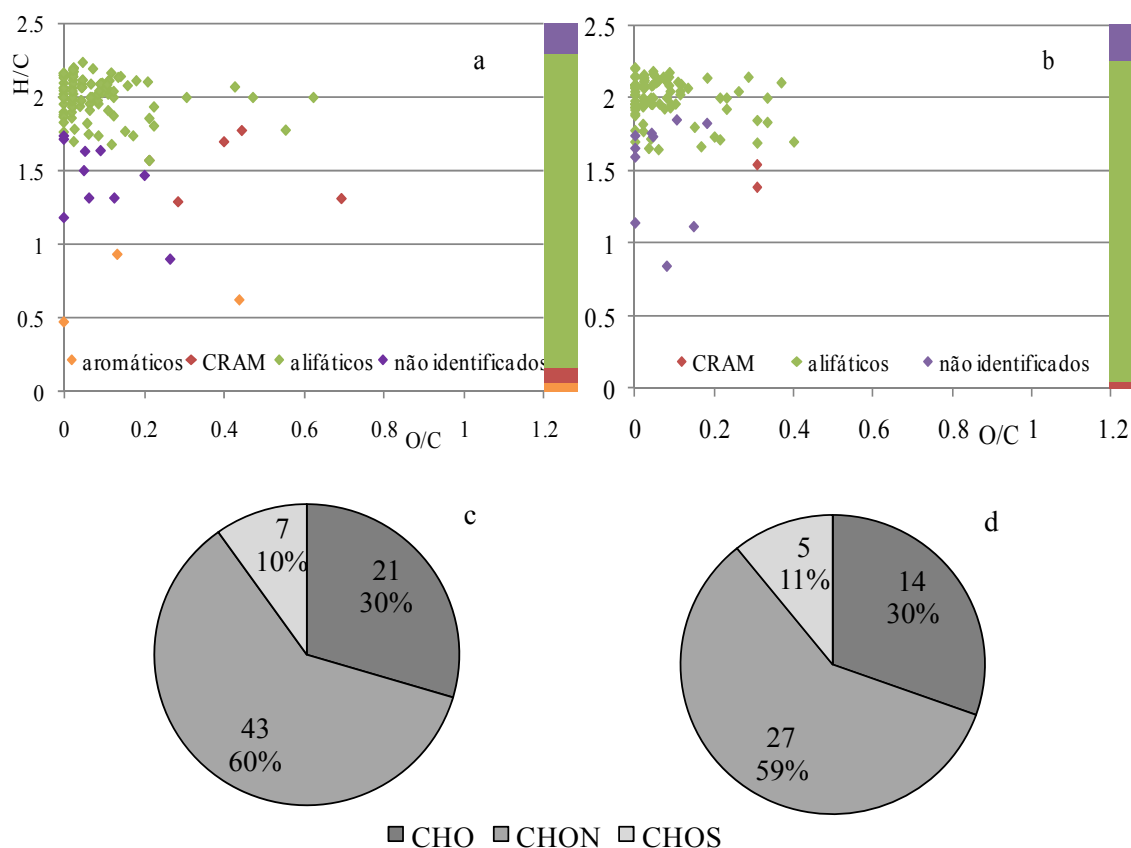


Figura 21. Composição química dos fotoprodutos da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* biodegradados (painéis a e c) e biorresistentes (painéis b e d): (a e b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%).

Outra forma de análise dos dados fornecidos por FTICRMS é a avaliação das massas moleculares dos diversos grupos gerados pela atividade fotoquímica e biológica. A Tabela II mostra que os processos fotoquímico e biológico de degradação da MOD ocorreram preferencialmente sobre compostos de massa molecular distintamente maior, do que aqueles que foram foto e biorresistentes ($p < 0.0001$). A Tabela II mostra também que não houve diferença significativa em termos de massa molecular entre os compostos bio e fotodegradados ($p = 0.4242$), o que indica que a competição entre estes dois processos envolve não somente a composição química, mas é enfatizada pela coincidência no intervalo de massa molecular preferencialmente degradado por ambos mecanismos.

Tabela II. Comparações entre as massas moleculares (Da) dos grupos de compostos da MOD extracelular de *Microcystis aeruginosa* resistentes e degradados pela atividade biológica e fotoquímica separadamente, e aplicação do teste não paramétrico de Mann Whitney.

Combinações entre os grupos	Massa Molecular (Da)		Teste de Mann-Whitney
bioresistentes x fotoresistentes	411	369	$p = 0.0045$, **
biodegradados x fotodegradados	436	447	$p = 0.4242$, n/s
biodegradados x bioresistentes	436	411	$p < 0.0001$, ***
fotodegradados x fotoresistentes	447	369	$p < 0.0001$, ***

** muito significatne, *** extremamente significante, n/s nãosignificante

3.4 Discussão

3.4.1 Transformações biológicas e fotoquímicas da MOD extracelular

As análises realizadas na MOD ao longo destes experimentos possibilitaram sua caracterização e conseqüentemente facilitaram o entendimento dos processos fotoquímico e biológico. As análises dos espectros de absorvância mostraram que a biodegradação da MOD-C extracelular é um processo relativamente lento quando comparado à fotodegradação, já que a redução em intensidade de absorvância e a forma do espectro observados após 7 dias de irradiação da MOD foram observadas apenas após mais de 20 dias de incubação com as bactérias. Desta forma, a rápida fotodegradação desta porção da MOD não somente reduz a possibilidade de sua utilização como fonte de energia e nutrientes pela comunidade bacteriana (Nelson et al 2004), mas também, por ser a porção que absorve e atenua a radiação em ambientes naturais, causa a exposição das células aos efeitos prejudiciais diretos da radiação UV sobre o DNA (Walsh et al 2003).

A dinâmica da biodegradação da MOD-F, em termos qualitativos, parece não ter sido afetada pela irradiação, mesmo levando em conta que a fluorescência total das amostras pré irradiadas foi reduzida proporcionalmente ao tempo de pré exposição à radiação UV. As análises de fluorescência demonstraram que a MOD de origem fitoplantônica é composta por uma porção de características húmicas, além do material protéico. O material M foi produzido como resultado da atividade microheterotrófica, o que indica semelhanças entre o metabolismo autotrófico desta cianobactéria e o metabolismo microbiano heterotrófico. A produção biológica deste material com características húmicas soma-se ao material húmico formado pelo processo já conhecido de polimerização de material dissolvido e contribui para o acúmulo desta fração no ambiente (Parlanti et al 2000). Biers et al (2007) sugerem que o processo de degradação microbiana de manosaminas (i.e., manose contendo um grupo amina) está relacionado à produção dos fluoróforos que compõem o pico M. Embora informações sobre a produção de manosaminas por *M. aeruginosa* não tenham sido encontradas na literatura, o monossacarídeo

manose foi previamente identificado como parte da composição de carboidratos poliméricos excretados por esta espécie (Gouvea 2004), além de ser frequentemente associado à florescimentos de *Microcystis* sp no reservatório de Barra Bonita (Colombo 2006).

Nossos resultados também reforçam afirmações de estudos anteriores de que a MOD de origem fitoplanctônica é lábil à atividade bacteriana (Pakulski e Benner 1994, Wetzel 2001), já que 65 % dos compostos da MOD inicial identificados por FTICRMS e 52 % do COD foram biodegradados em apenas 2 dias de cultivo das bactérias. Em concordância, apenas 75 (16 %) dos compostos identificados na MOD inicial por FTICRMS foram classificados como simultaneamente bio e fotorresistentes, considerando o período estudado. Estes resultados, somados à biodegradação preferencial de compostos nitrogenados (90 %) da MOD extracelular, reforçam a importância do caráter lábil desta MOD na manutenção das associações entre microorganismos autótrofos e heterótrofos (Giroldo 2003).

3.4.2 Efeitos da radiação UV sobre a biodisponibilidade

Neste trabalho, a redução da biodisponibilidade refletiu em menor produtividade bacteriana na MOD pré irradiada, principalmente no início das culturas. A existência da fase lag nas culturas bacterianas em MOD pré-irradiada pode ter ocorrido devido à fotoprodução de espécies e radicais tóxicos às bactérias, como H_2O_2 , OH , O_2^- , HO_2 (Obermosterer et al 2001, O'Sullivan et al 2005).

As causas da redução na biodisponibilidade foram em geral relacionadas à remoção da porção mais biodegradável da MOD pelas reações fotoquímicas, ou seja, competição entre os processos fotoquímico e biológico pela mesma fração da MOD, e/ou à substituição de compostos originais lábeis por fotoprodutos menos biodisponíveis.

As análises da MOD-C demonstraram que a redução na biodisponibilidade da MOD pré irradiada pode ter sido reflexo da redução na absorvância da MOD-C, já que a exposição de longo prazo à radiação causou maior redução na absorvância da MOD-C e maior redução na sua biodisponibilidade do que a exposição de curto prazo. Isso demonstra que a porção cromofórica

da MOD é importante na sustentabilidade das bactérias, e que sua remoção reflete em alterações proporcionais na produtividade bacteriana.

A irradiação por 7 dias demonstrou ainda que os mesmos grupos de cromóforos que são lábeis à radiação UV são também biodegradáveis, e ao mesmo tempo, os compostos resistentes à fotodegradação também são resistentes à biodegradação. Somando-se às análises de MOD-C, as análises da composição química da MOD por FTICRMS indicaram que 56 % da MOD inicial é ao mesmo tempo bio e fotodegradável, dentre os quais compostos nitrogenados estão entre os mais numerosos. Estes dados em conjunto apontam para o processo de competição entre foto e biodegradação como a principal razão da redução na biodisponibilidade da MOD extracelular pré irradiada. Mais especificamente, a relativa abundância dos compostos CHON dentre o grupo de moléculas afetadas pela competição indica que a redução na biodisponibilidade desta MOD pode estar relacionada ao acesso ao nitrogênio, mais do que à fonte de carbono em si. Isso é reforçado pelas análises de COD, que mostraram que o consumo de carbono não foi significativamente afetado pela pré irradiação da MOD. A fotooxidação de compostos nitrogenados, portanto, pode ter causado a remoção de nitrogênio na forma acessível, resultando em restrição na assimilação deste composto, que por ser o componente essencial do DNA e proteínas, afeta diretamente a divisão celular, refletindo em redução da taxa de incorporação de H^3 -Timidina.

A competição entre os dois processos foi observada também no que se refere à massa molecular dos compostos da MOD extracelular. Sabe-se que a atividade microbiana é direcionada pela massa molecular e nossas análises demonstraram que a porção da MOD degradada pela atividade fotoquímica apresentou um intervalo de massa molecular sobreposto àquele da porção preferencialmente degradada pelas bactérias. A atividade fotoquímica atua independentemente da massa molecular, preferencialmente sobre compostos que absorvem luz e portanto são excitáveis e instáveis fotoquimicamente (Mopper e Kieber 2000), sofrendo os efeitos diretos da irradiação. No caso da MOD extracelular estudada, esta porção fotosensível é

caracterizada por um intervalo de massa molecular que coincide com aquele preferencialmente utilizado pelas bactérias, causando o efeito negativo da fotoquímica sobre a biodisponibilidade. Estes dados representam um avanço na compreensão de resultados obtidos por estudos anteriores, que demonstraram que, de maneira geral, os efeitos da irradiação sobre a biodisponibilidade de MOD ocorrem no sentido de reverter sua disponibilidade inicial, ou seja, MOD inicialmente biodisponível tende a se tornar mais refratária devido às reações fotoquímicas, e vice-versa (Benner e Biddanda 1998, Naganuma et al 1996).

A análise do bioprocessamento dos fotoprodutos mostrou que aproximadamente a metade deles (55 %) foi subsequentemente biodegradada e não foram detectados tipos estruturais ou atômicos preferencialmente degradados ou preservados. Isso pode ser devido à análise da atividade biológica por FTICRMS ter sido realizada em apenas um ponto do cultivo das bactérias, após 2 dias de incubação, e portanto a comunidade bacteriana pode não ter sido exposta aos fotoprodutos por tempo suficiente para que uma avaliação de sua biodisponibilidade fosse mais precisa. De qualquer forma, os fotoprodutos compreenderam 62 % da MOD pré irradiada 'oferecida' à comunidade bacteriana e, pelo menos neste ponto do cultivo, pode-se dizer que eles não foram capazes de estimular efetivamente o crescimento bacteriano ao ponto de compensar ou anular o efeito negativo da competição.

Capítulo 4. Efeitos da radiação UV e da atividade microheterotrófica, separadamente e em associação, sobre a matéria orgânica intracelular de *Microcystis aeruginosa*.

4.1 Objetivos

(1) Avaliar o processo de biodegradação da MOD intracelular de *M. aeruginosa* (células cultivadas no modo axênico).

(2) Analisar os efeitos da radiação UVA e UVB sobre a biodisponibilidade da MOD intracelular de *M. aeruginosa*.

(3) Analisar as alterações nas características químicas da MOD intracelular de *M. aeruginosa* causadas pelas atividades fotoquímica e biológica, separadamente e em associação.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Obtenção da MOD

Os experimentos descritos neste Capítulo foram realizados exclusivamente com a MOD intracelular obtida pela lise das células de *M. aeruginosa* cultivadas em modo axênico. A obtenção destas amostras de MOD foi realizada como já descrito em detalhes no Capítulo 2. Em resumo, a cianobactéria foi cultivada em condições axênicas em meio de cultura ASM-1, pH 7 (Gorham et al 1964), previamente autoclavado (121° C, 40 min). As culturas foram mantidas em sala condicionada a 23°C (± 1), com ciclo luz:escuro de 12:12 h e intensidade de luz de 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proveniente de lâmpadas de 40 W do tipo 'luz do dia' e aeradas por agitação manual dos frascos, duas a três vezes ao dia. Após 60 dias de cultivo, as células foram separadas da MOD extracelular da cultura por filtração tangencial em cartuchos com membranas de 0.22 μm de diâmetro de poro, e imediatamente congeladas. O sistema de filtração tangencial foi pré-lavado com solução de NaClO 5 % e enxaguado várias vezes com água ultrapura antes e após a filtração. Após duas semanas no *freezer*, o concentrado de células foi descongelado e mantido em banho de ultrassom por 15 min. Este ciclo de congelamento-descongelamento-

sonificação foi repetido várias vezes para garantir a ruptura da maior parte das células. Em seguida, a amostra foi filtrada a vácuo em três etapas consecutivas em filtros de 10, 5 e 0.7 μm de diâmetro de poro, para retirada das células inteiras resistentes ao procedimento e outras partículas maiores, e obtenção da MOD intracelular dissolvida. Finalmente, a amostra foi assepticamente filtrada em sistema de filtração tangencial em cartuchos com membranas de 0.22 μm de diâmetro de poro e a MOD coletada, menor que 0.22 μm , foi utilizada nos experimentos. A eficiência deste procedimento foi verificada experimentalmente por meio de contagem de células antes e após os ciclos congelamento-descongelamento-sonificação, e por medidas de carbono orgânico dissolvido ao longo das etapas de filtração (dados não apresentados), e mostraram que a maioria das células (90 %) foi lisada e a maior parte do carbono orgânico intracelular (80 %) foi obtido na fração menor que 0.22 μm por este procedimento.

4.2.2 Experimentação

Os experimentos descritos neste Capítulo se assemelham aos já descritos no Capítulo 3. Foram realizados dois experimentos nos quais as amostras de MOD intracelular foram divididas em três alíquotas: a primeira não foi irradiada (chamada ao longo do texto de MOD inicial) e as demais foram irradiadas, uma com UVA e a outra com UVB. No primeiro experimento, a irradiação durou 0.5 dia e no segundo experimento, a irradiação foi de 7 dias. A escolha dos períodos de 0.5 e 7 dias de irradiação foi baseada nos resultados obtidos no Capítulo 2. A irradiação destas amostras foi realizada em frascos de quartzo com 500 mL de capacidade, e as intensidades de radiação UVB e UVA foram iguais àquelas medidas na superfície do reservatório de Barra Bonita (3 W.m^{-2} e 25 W.m^{-2} , respectivamente).

Imediatamente após a irradiação, foi adicionado o inóculo bacteriano às alíquotas de MOD não irradiada (MOD inicial) e previamente irradiadas nas diversas condições descritas acima (MOD pré irradiada). A coleta e preparação do inóculo bacteriano foi feita como descrito no Capítulo 3.

As culturas bacterianas em MOD inicial e pré irradiada nas condições descritas acima (em réplicas) foram mantidas a 30°C no escuro e aeradas por agitação manual dos frascos, e foram amostradas durante 41-45 dias, mais frequentemente durante os primeiros 5 dias. Ao longo do tempo de cultivo das bactérias, alíquotas das culturas contendo as células bacterianas foram obtidas para medidas de incorporação de timidina tritiada (H^3 -timidina). Outras amostras das culturas foram filtradas para retirada das bactérias em membranas de polycarbonato de 0.22 μ m de diâmetro de poro previamente lavadas com 500 mL de água ultrapura. As análises da MOD descritas no Capítulo 1 foram realizadas nestas amostras filtradas.

4.3 Resultados

4.3.1 Incorporação de H^3 -Timidina e remoção de COD pelas bactérias

As medidas de incorporação de H^3 -Timidina pelas bactérias nas culturas de MOD inicial e pré-irradiada com UVB e UVA, tanto por 0.5 (Figura 1a) quanto por 7 dias (Figura 1b), não revelaram efeitos consistentes, positivos ou negativos, da pré-irradiação sobre a biodisponibilidade da MOD intracelular. A dinâmica da produtividade bacteriana nas culturas foi semelhante nos dois experimentos e nos três tratamentos (pré-irradiação com UVA e UVB, e não irradiação) e não foram observadas diferenças quantitativas entre eles. Também não foram observadas diferenças significativas na remoção do carbono orgânico dissolvido (COD) entre os diferentes tratamentos de irradiação, reforçando que a pré irradiação por 0.5 ou 7 dias não interferiu significativamente no consumo da MOD (Figura 2a e b).

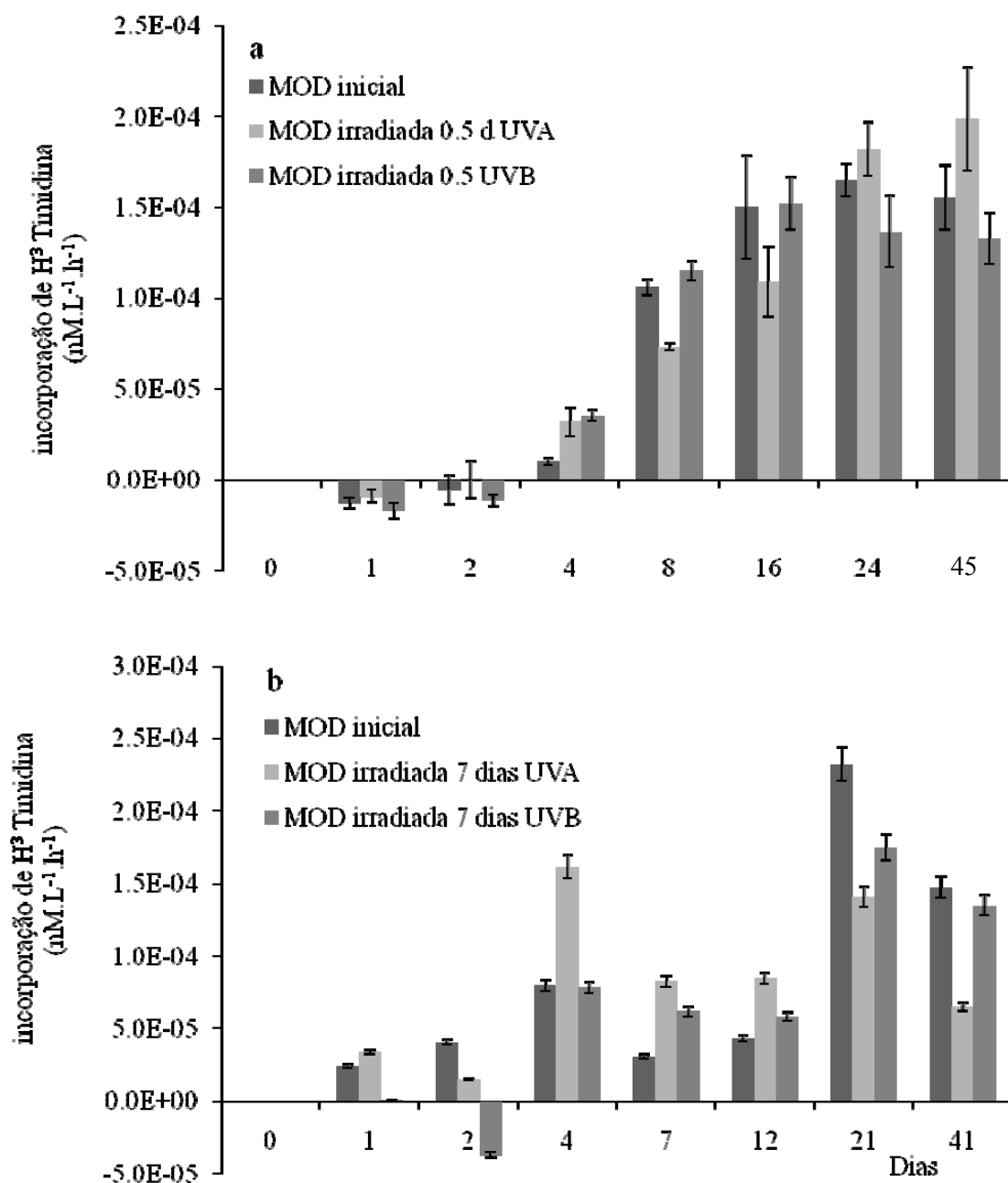


Figura 1. Variação na taxa de incorporação de H³-Timidina (nM.L⁻¹.h⁻¹) ao longo do tempo de cultivo da comunidade microheterotrófica em MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; (b) inicial e pré irradiada por 7 dias com UVA e UVB; barras representam o desvio padrão.

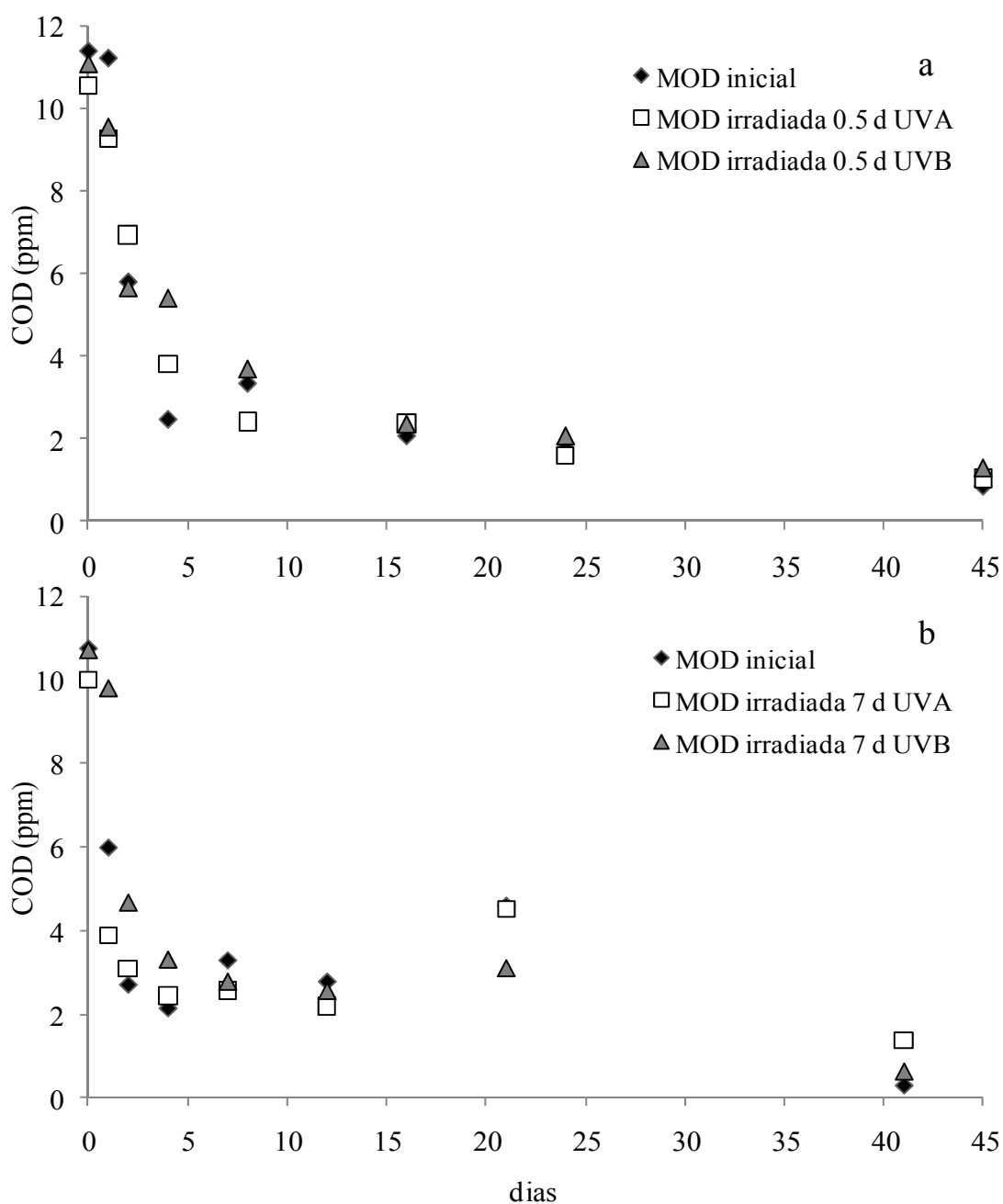


Figura 2. Variação na concentração de carbono orgânico dissolvido (COD, ppm) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* (a) inicial e pré irradiada por 0.5 dia com UVA e UVB; (b) inicial e pré irradiada por 7 dias com UVA e UVB, em função do tempo de cultivo das bactérias.

4.3.2 Biodegradação da MOD-C

No que se refere à transformação da MOD cromofórica (MOD-C), a pré-irradiação da MOD intracelular por 0.5 dia, especialmente com a radiação UVB, causou ligeira redução na absorbância em comprimentos de onda maiores do que 300 nm (maiores detalhes sobre a fotodegradação da MOD intracelular foram apresentados e discutidos no Capítulo 2). Nitidamente a ficocianina, pigmento intracelular com absorbância máxima em torno de 630 nm, foi fotodegradada durante a exposição à radiação com UVA e UVB (Figura 3) por 0.5 dia.

Ao longo do período de cultivo das bactérias, a absorbância da MOD-C pré-irradiada por 0.5 dia e inicial (Figura 3a, b e c) foi gradualmente reduzida; a redução mais drástica ocorreu no primeiro dia da atividade bacteriana. Na MOD inicial, o pico correspondente à ficocianina foi removido pela biodegradação após 2 dias de cultivo. A redução gradual da absorbância da MOD-C foi similar nas três culturas. Já a pré-irradiação por 7 dias (Figura 4) da MOD intracelular causou redução mais evidente na absorbância da MOD-C, embora a forma do espectro tenha sido mantida. Esta redução foi similar quando a MOD foi pré-irradiada com UVA e UVB (Figura 4, e detalhes no Capítulo 2). Durante o período de cultivo das bactérias em MOD pré-irradiada por 7 dias (UVA e UVB) e inicial houve redução na absorbância, principalmente em comprimentos de onda curtos (Figura 4a, b e c). Mesmo com a pré exposição da MOD intracelular por 7 dias, que causou redução significativa da absorbância da MOD-C, a atividade bacteriana sobre a MOD-C remanescente não foi afetada.

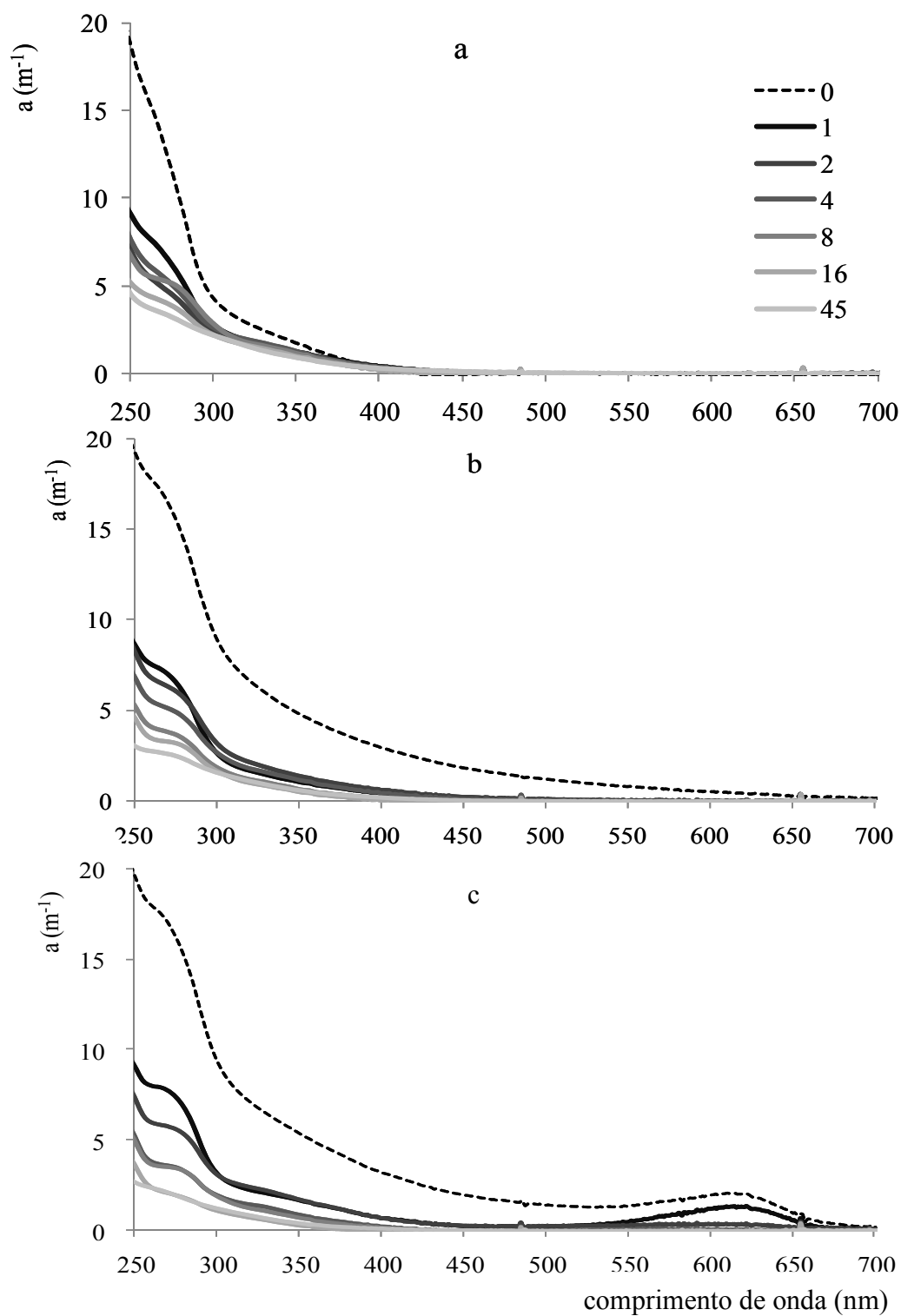


Figura 3. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.m^{-1}$) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com (a) UVB e (b) UVA e inicial (c) em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 45 dias).

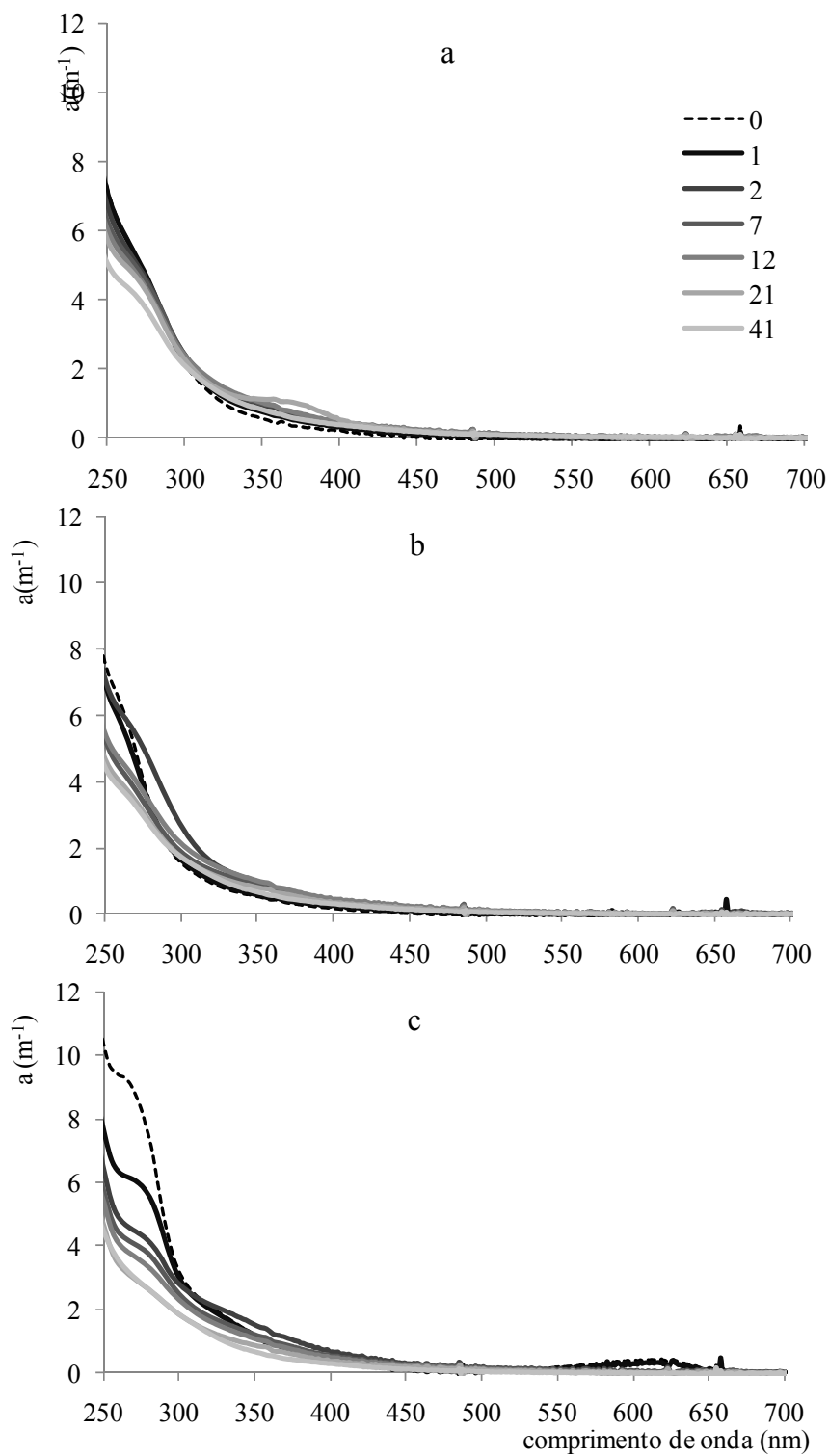


Figura 4. Variação no espectro do coeficiente de absorvância ($a.\text{m}^{-1}$) da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com (a) UVB e (b) UVA e inicial (c) em função do tempo de cultivo da comunidade bacteriana (0 – 41 dias).

4.3.3 Biodegradação da MOD-F

A avaliação das EEMs forneceu informações qualitativas da dinâmica dos fluoróforos da MOD em função do tempo de cultivo. As Figuras 5 e 6 mostram as sequências de EEMs ao longo da biodegradação da MOD intracelular inicial, de cada experimento. As Figuras 7 e 8 mostram a dinâmica dos fluoróforos na degradação biológica da MOD pré-irradiada por 0.5 dias com UVA e UVB, respectivamente; e as Figuras 9 e 10 referem-se à MOD pré-irradiada por 7 dias, com UVA e UVB, respectivamente. Dentre os fluoróforos da MOD-F intracelular inicial, o material protéico apresentou maior intensidade de fluorescência (Figuras 5a e 6a), como também observado na MOD extracelular (Capítulo 3). A fluorescência do material protéico foi reduzida rapidamente, dentro de no máximo 2 dias de incubação das bactérias, e não foi detectada produção deste material até o final do experimento, após 45 e 41 dias, respectivamente. Os picos A e C correspondentes ao material húmico também foram observados, enquanto que o pico M não foi detectado (Figuras 5a e 6a). A pré irradiação de 0.5 dia não eliminou os picos A e C. Nas Figuras 5 a 8 (biodegradação da MOD inicial e irradiada por 0.5 d), a fluorescência do material húmico foi reduzida lentamente devido ao consumo bacteriano, de maneira que estes picos (principalmente o pico A) ainda puderam ser observados ao longo do tempo de cultivo. Em todos os cultivos, a partir do 2º ou 4º dia de experimento, a produção gradual de material do pico M foi iniciada (painel c das Figuras 5-10). A produção deste material pareceu ocorrer a partir do material húmico do pico C; nas amostras correspondentes ao 7º e 8º dia de amostragem (painel d das Figuras 5-10), observou-se claramente um rastro que conecta os dois picos, C e M. Gradualmente até o final do experimento, a fluorescência do material húmico do pico C foi reduzida enquanto que aumentou a intensidade de fluorescência do pico M. Apesar da remoção do pico protéico e da redução em intensidade de fluorescência dos picos húmicos (A e C) causadas pela pré irradiação, a biodegradação da MOD-F pré-irradiada assemelhou-se à biodegradação da MOD-F inicial, em termos qualitativos.

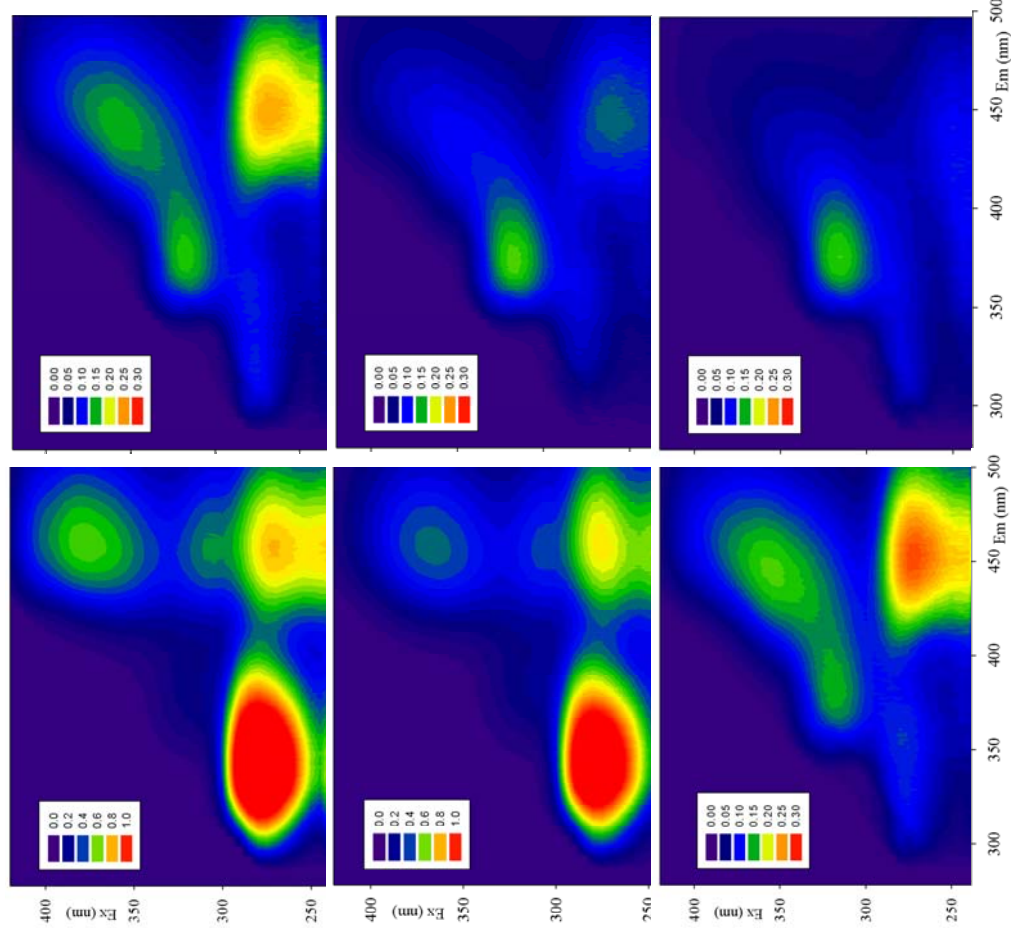


Figura 5. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial intracelular de *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias.

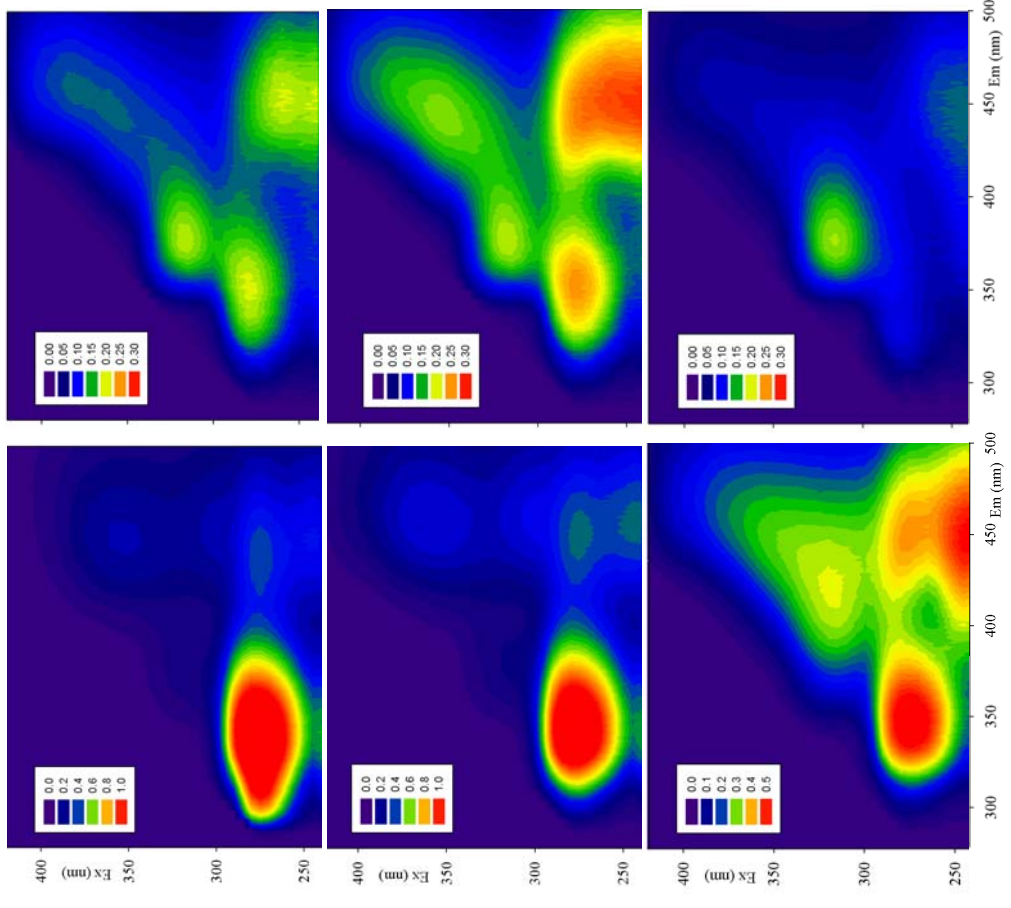


Figura 6. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F inicial intracelular de *Microcystis aeruginosa* em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias.

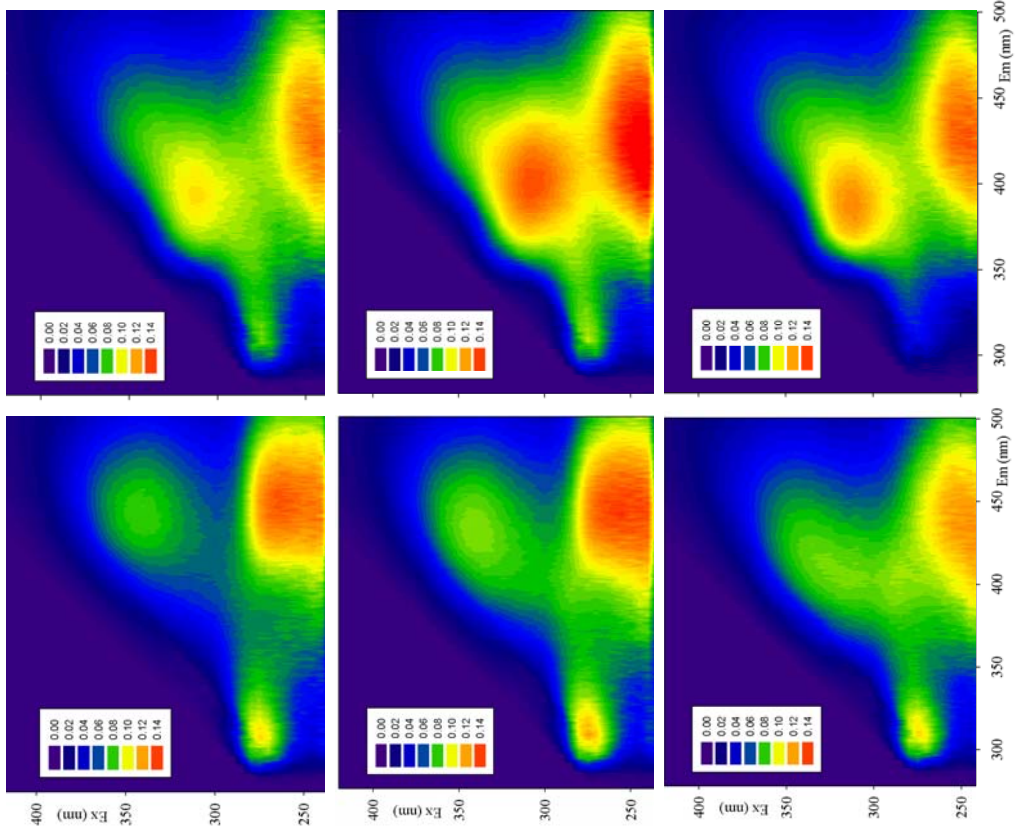


Figura 7. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias.

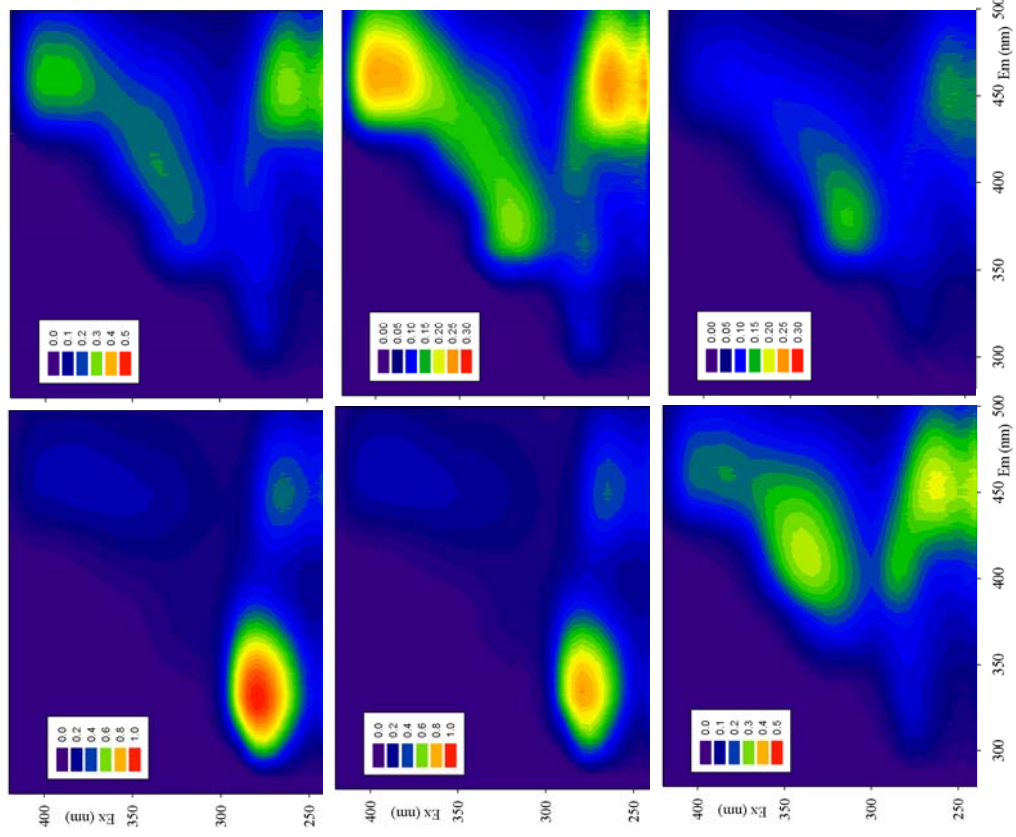


Figura 8. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 0.5 dia com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 8, (e) 16 e (f) 45 dias.

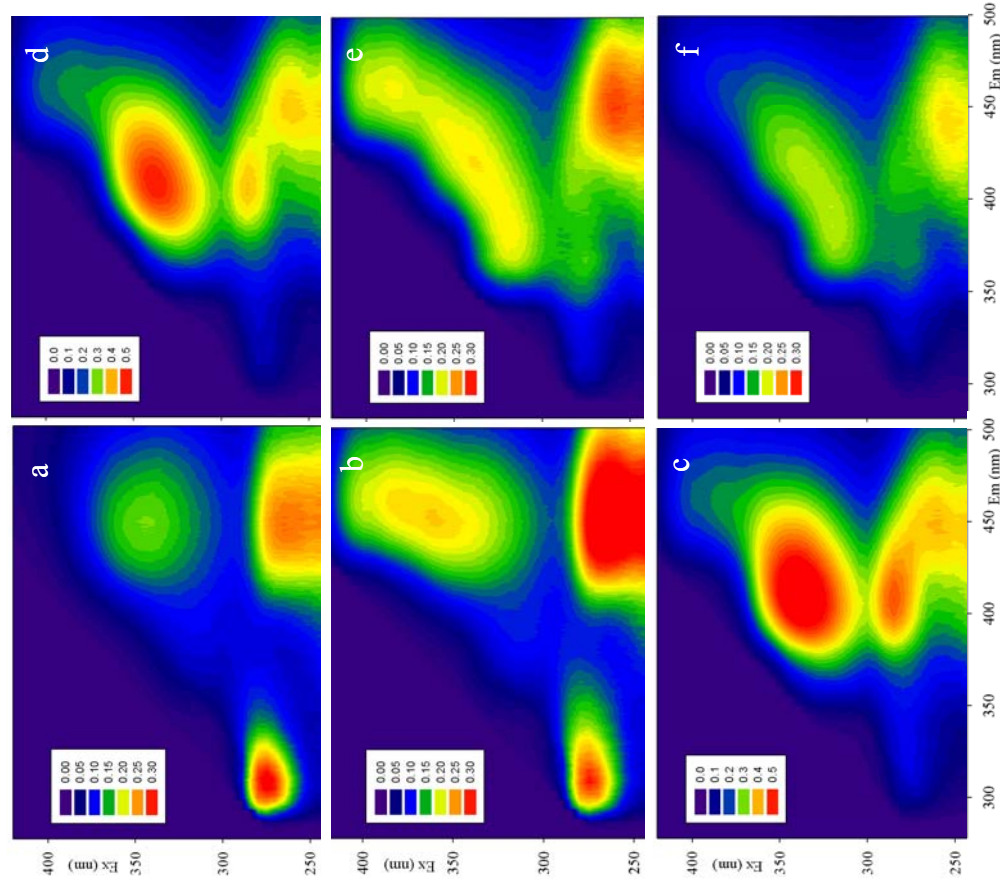


Figura 9. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVA em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias.

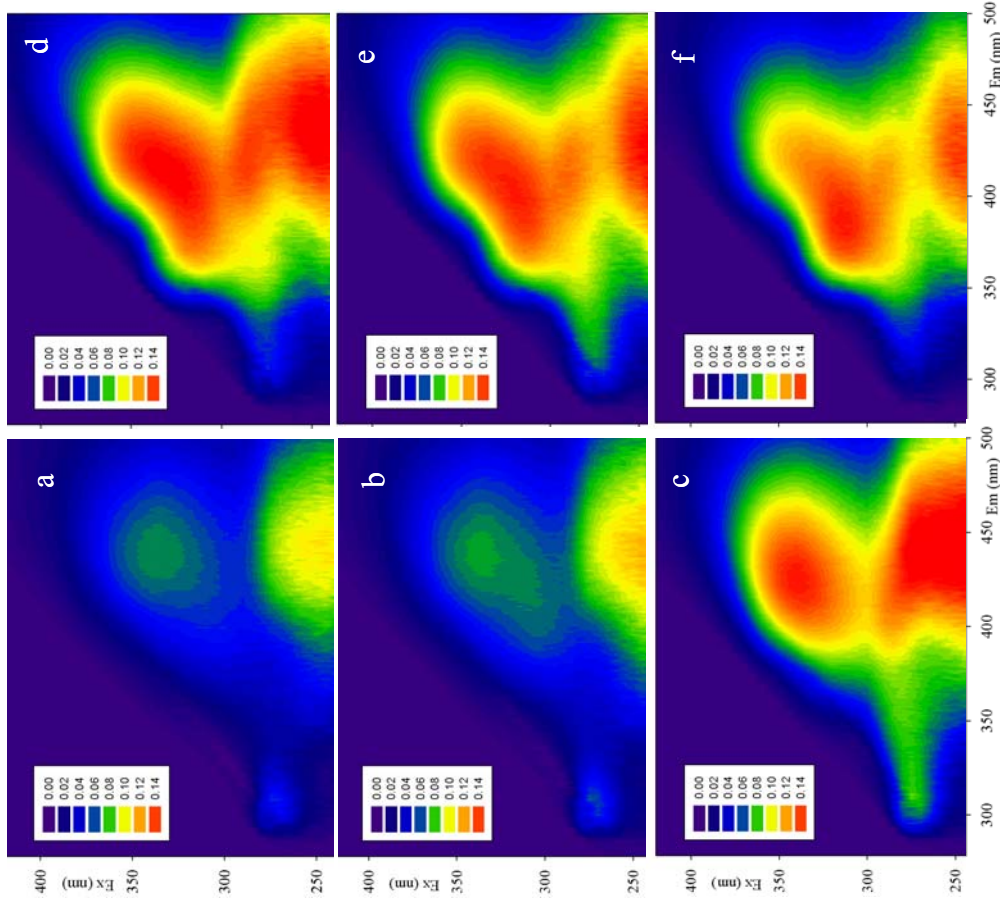


Figura 10. Matrizes de Emissão-Excitação (EEM) da MOD-F intracelular de *Microcystis aeruginosa* pré irradiada por 7 dias com UVB em função do tempo de cultivo das bactérias: (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 7, (e) 12 e (f) 41 dias.

4.3.4 Espectrometria de massa (FTICRMS) da MOD foto e/ou bioalterada

Quatro amostras destes experimentos foram analisadas por FTICRMS no modo negativo de ionização: MOD inicial, MOD inoculada (bioprocessada, após 7 dias de cultivo), MOD irradiada (UVB, 7 dias), e MOD irradiada (UVB por 7 dias) e em seguida inoculada (bioprocessada, após 7 dias de cultivo); para efeitos práticos esta última será referida como MOD irradiada + inoculada. Foram avaliadas resistência, degradabilidade e produtividade, fotoquímica e biológica, de diferentes tipos de compostos. Os compostos resistentes, degradados e produzidos foram classificados quanto à sua fórmula/composição atômica e quanto às suas características estruturais (alifáticos, aromáticos e alicíclicos ricos em grupos carboxílicos – CRAM). Dentre as 4 amostras, as moléculas que foram identificadas quanto às suas características estruturais compreenderam 73 – 87 % dos compostos (Tabela I). Embora existam 15 diferentes fórmulas químicas possíveis, considerando os 6 elementos estudados (C, H, O, N, P, S), a maior parte das moléculas (81 – 92 %, Tabela I) nas 4 amostras pertenceram às classes CHO, CHON, CHOS e CHOP e a fim de facilitar a apresentação e interpretação dos resultados, apenas estas 4 classes serão discutidas. As características gerais das quatro amostras analisadas estão apresentadas na Tabela I e Figura 11. A MOD intracelular inicial é composta em sua maioria por compostos alifáticos (Tabela I, Figura 11a), e os tipos predominantes de fórmulas químicas foram CHO e CHON (Tabela I, Figura 11b). A irradiação causou aumento proporcional na fração CRAM em detrimento de alifáticos e aromáticos, e aumento proporcional em CHO e CHON e redução de compostos CHOS e CHOP (Tabela I). A inoculação da MOD inicial com a comunidade bacteriana causou aumento considerável na proporção de alifáticos e de compostos nitrogenados (CHON) (Tabela I). Na MOD irradiada + inoculada foi observado o aumento na proporção de alifáticos, e aumento proporcional em compostos CHO.

Tabela I. Caracterização da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* inicial, irradiada, inoculada e irradiada + inoculada: número total de compostos; número e contribuição percentual de compostos resistentes e produzidos devido à atividade biológica e fotoquímica; e contribuição proporcional dos tipos estruturais e de composição atômica (fórmulas químicas).

MOD	Componentes	Total	%	Tipos estruturais (%)			Fórmula:		
				% identificados	Alifáticos	CRAM		Aromáticos	% identificados
inicial	n/a	399	100	73	62.4	7.3	4	81	36.3
irradiada		390	100	79	59	18.2	2.1	87	41.3
	Fotoprodutos	173	44.4						
	Fotoresistentes	217	55.6						
inoculada		762	100	86	80.6	4.5	1.3	92	30.3
	Bioprodutos	556	73						
	Bioresistentes	206	27						
irradiada + inoculada		576	100	87	78	8	1.2	88	44.4
	Bioprodutos	415	72						
	Bio e fotoresistentes	123	21.4						
	Fotoprodutos bioresistentes	38	6.6						

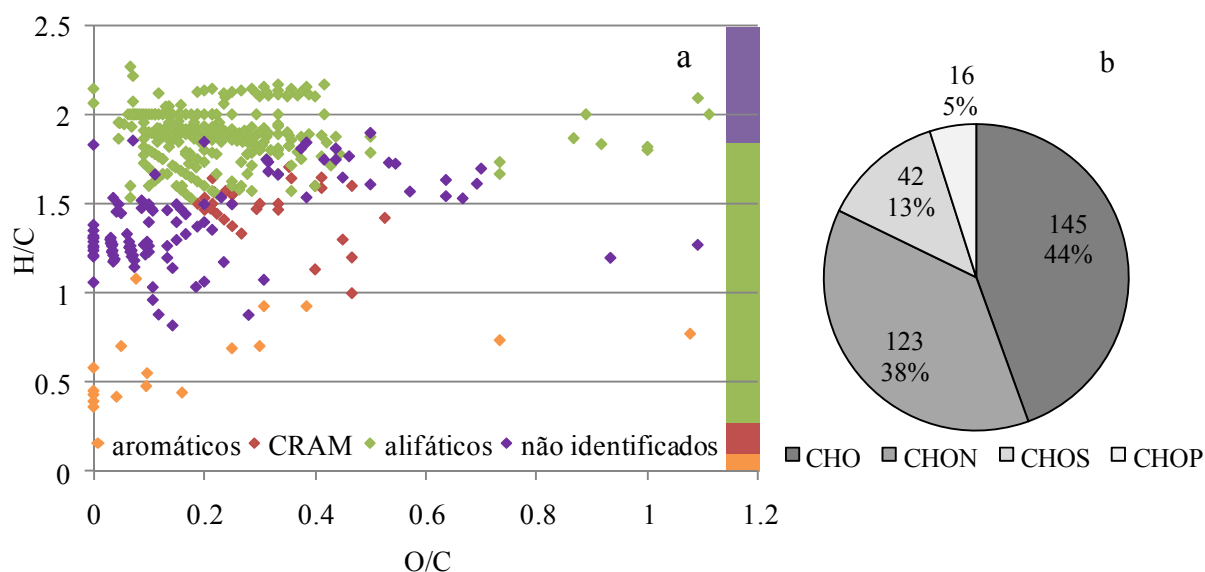


Figura 11. Caracterização química da MOD intracelular inicial de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen, onde a barra representa a contribuição porporcional de cada classe, e (b) composição atômica, em número de compostos e proporção (%).

As atividades biológica e fotoquímica foram avaliadas em separado. A Figura 12 mostra o diagrama de VanKrevelen dos grupos de compostos resistentes, degradados e produzidos devido à atividade biológica (12a-c) e fotoquímica (12d-f), classificados de acordo com suas características estruturais. Os painéis 12a-c mostram que a maior parte dos compostos resistentes à degradação biológica são alifáticos, de baixa razão O/C; estes compostos estão presentes principalmente na região do diagrama correspondente aos lipídeos. Grande porção dos compostos biodegradados não foi identificada e outra grande fração foi composta de alifáticos, por que esta é a classe de compostos mais abundante na amostra inicial. Mais notável, no entanto, é o fato de a maior parte dos compostos biodegradados ser caracterizada por razões O/C relativamente altas quando comparadas aos compostos biorresistentes e bioproduzidos. Alifáticos presentes na região dos lipídeos compreenderam a maioria dos bioprodutos, caracterizados de maneira geral por baixas razões O/C.

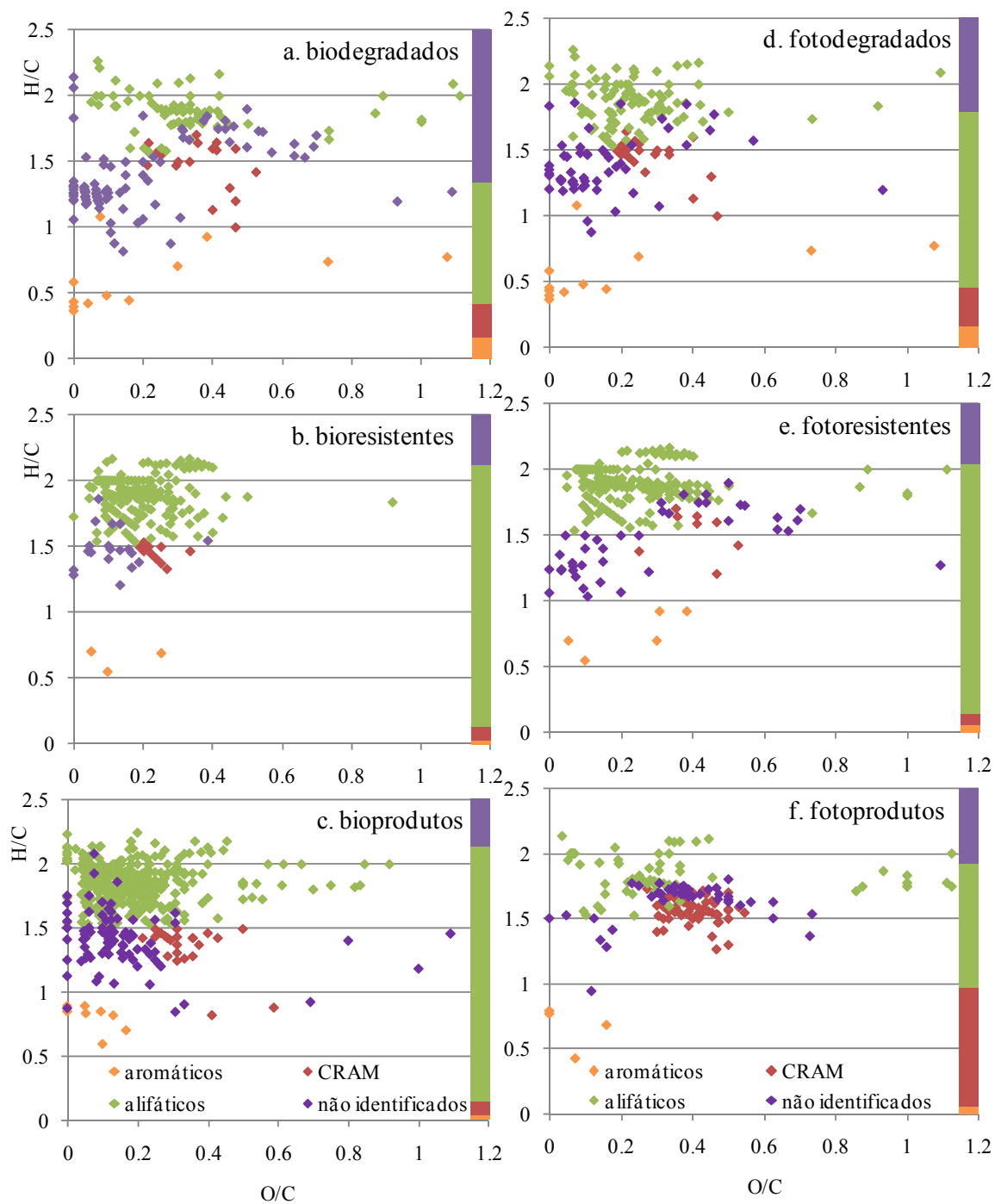


Figura 12. Diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural dos grupos de compostos degradados, resistentes e produzidos após 7 dias de atividade biológica (a, b, c, respectivamente) e 7 dias de atividade fotoquímica (d, e, f, respectivamente) sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*. As barras representam a contribuição porporcional de cada classe.

A irradiação da MOD (Figura 12d-f) demonstrou que os compostos fotorresistentes também são alifáticos em sua maioria, assim como compostos fotodegradados; ambos os grupos são também característicos por baixas razões O/C. CRAM de baixa razão O/C foram preferencialmente fotodegradados em detrimento de CRAM com razão O/C ligeiramente maior. A exposição da amostra à UVB resultou em produção de compostos de altas razões O/C, especialmente os CRAM e os compostos não identificados, mas também dos alifáticos. Outra característica dos fotoprodutos foi a considerável proporção de CRAM gerada pela irradiação (Figura 12f).

Quanto à caracterização por composição atômica (Figura 13), compostos CHON foram muito mais afetados pela biodegradação (63 %) do que pela fotodegradação (41 %). CHO compreendem a maioria dos compostos biorresistentes (64 %). Moléculas CHON e CHO compreenderam a maior parte do conjunto de bioprodutos (54 e 41 %, respectivamente) enquanto que compostos CHON foram a maioria dentre os fotoprodutos (75 %).

De uma maneira geral, houve diferenças sensíveis entre a composição de biodegradados, cuja maior fração foi composta por CHON (63 %), e biorresistentes, claramente dominados por CHO (64 %). Já os compostos fotodegradados e fotorresistentes apresentaram frações semelhantes quanto à proporção de CHO (44 e 43 %, respectivamente) e CHON (41 e 39 %, respectivamente). A semelhança entre os grupos fotodegradados e fotorresistentes indica que alterações fotoquímicas afetam a MOD de maneira mais ou menos indiscriminada quanto à composição atômica, diferentemente da atividade microbiológica, que parece mais seletiva.

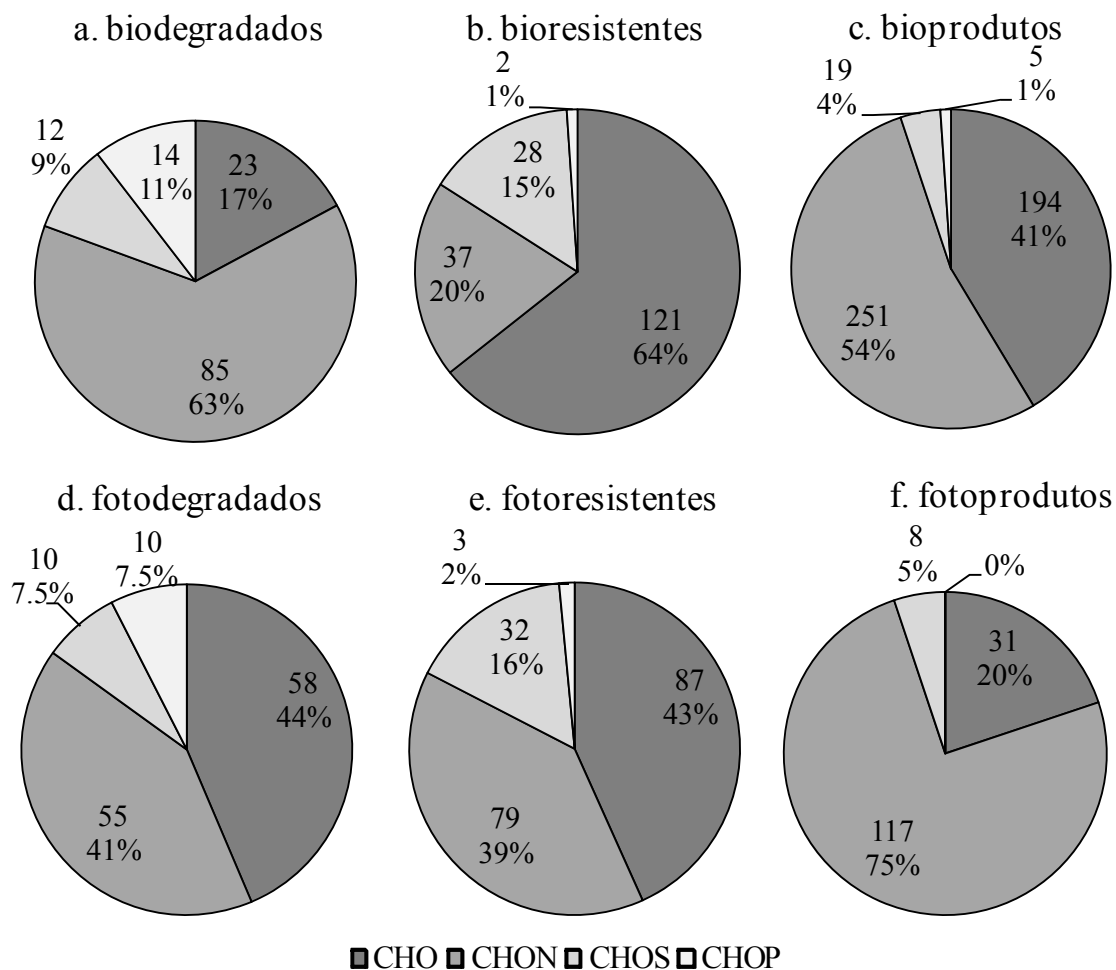


Figura 13. Composição atômica, em número e contribuição proporcional (%), dos grupos de compostos (a) biodegradados, (b) biorresistentes e (c) bioproduzidos após 7 dias de atividade biológica e (d) fotodegradados, (e) fotorresistentes e (f) fotoproduzidos após 7 dias de atividade fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*.

O fato de alifáticos terem sido dominantes na maioria dos conjuntos de compostos exibidos na Figura 12 está relacionado à sua alta proporção na MOD inicial. Numericamente, alifáticos são compostos dominantes, ou representam uma fração considerável, no grupo de resistentes, degradados e produtos. No entanto, analisando a bio e fotodegradação de cada tipo estrutural proporcionalmente às suas quantidades iniciais (i.e., na MOD inicial), é possível identificar que as atividades biológica e fotoquímica modificaram preferencialmente compostos CRAM e aromáticos, em detrimento dos alifáticos (Figura 14a e b).

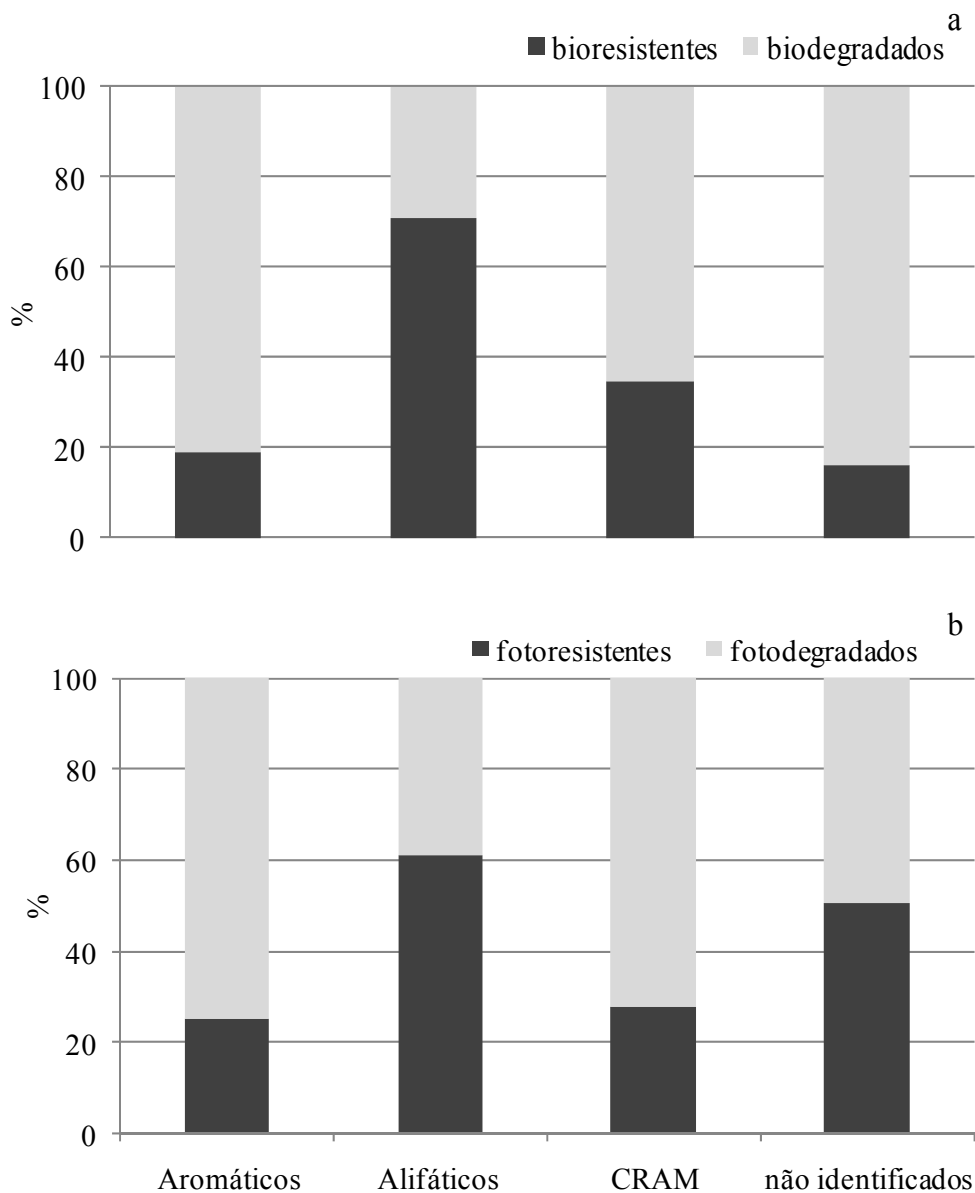


Figura 14. Proporção (%) entre compostos resistentes e degradados, pertencentes às diversas classes estruturais, após 7 dias de atividade (a) biológica e (b) fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*.

A Figura 15 mostra a bio e fotodegradação quando se considera cada tipo de fórmula química relativa à suas quantidades na MOD inicial. É possível observar que houve biodegradação preferencial de compostos CHON e CHOP, enquanto CHO e CHOS são compostos relativamente mais biorresistentes (Figura 15a). As reações fotoquímicas, por outro lado, causaram degradação preferencial de compostos CHOP, mas são em geral menos específicas em relação à composição

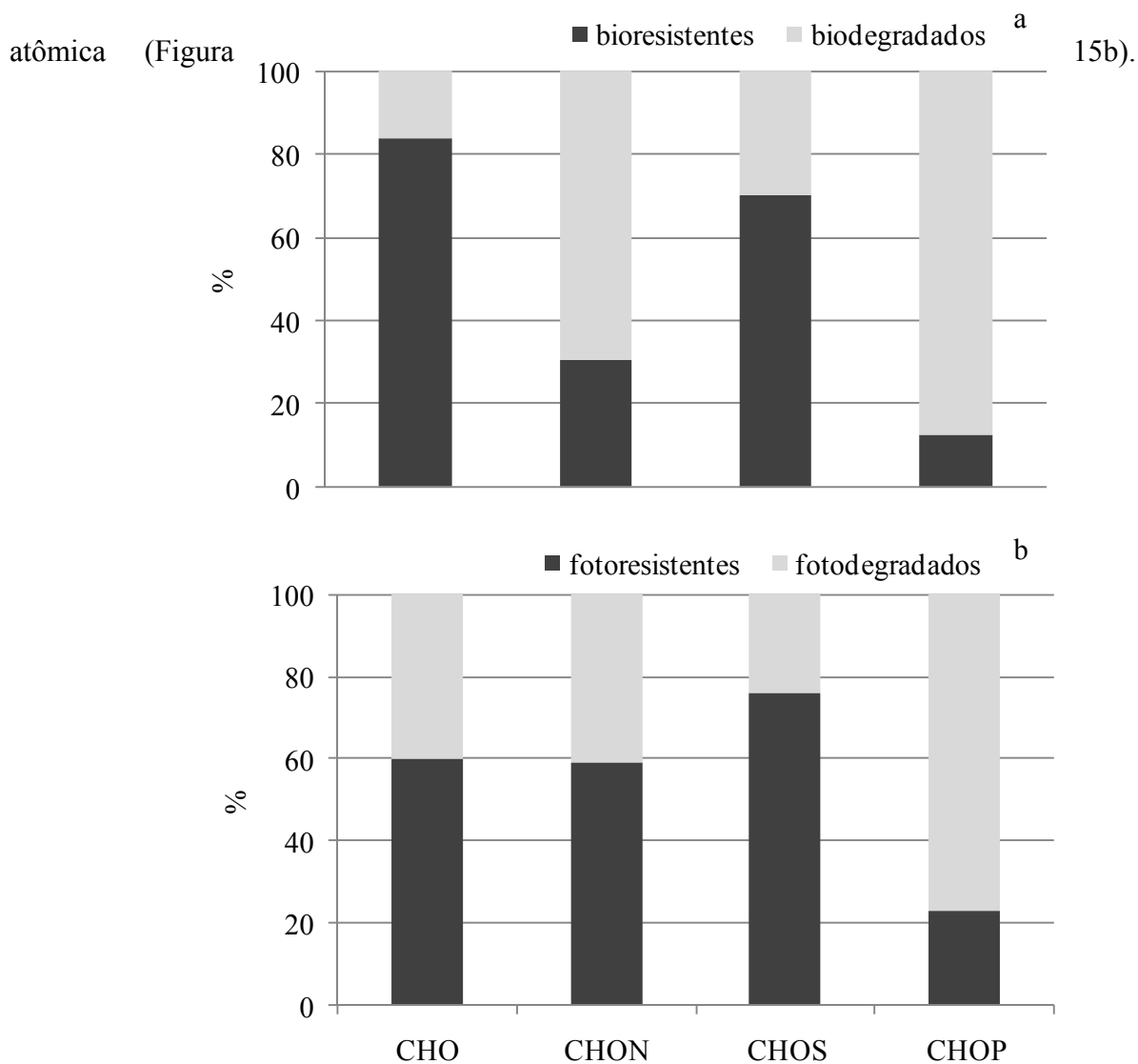


Figura 15. Proporção (%) entre compostos resistentes e degradados, dos diversos tipos de composição atômica, após 7 dias de atividade (a) biológica e (b) fotoquímica sobre a MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*.

Os compostos resistentes simultaneamente a ambos os tipos de degradação foram denominados refratários. Há duas formas possíveis de apontar estes compostos: encontrando as moléculas comuns à MOD inicial, MOD irradiada e MOD irradiada + biodegradada (sequência de eventos); e encontrando as moléculas comuns à MOD bioresistente e fotoresistente (eventos independentes). O primeiro procedimento para identificar a porção mais refratária da MOD foi escolhido, mas ambos resultaram em números semelhantes (123 moléculas comuns às três amostras; 129 moléculas comuns aos grupos ‘fotorresistentes’ e biorresistentes’). Isso indica que resultados semelhantes serão encontrados quando os processos são avaliados individualmente ou sequencialmente, indicando que o procedimento experimental não influencia de maneira significativa este tipo de resultado. A Figura 16 mostra que a maior parte dos compostos refratários aos dois processos é composta por alifáticos (94 %), encontrados na região dos lipídeos do diagrama, e moléculas CHO (63 %). A mesma tendência foi identificada quando a bio e a fotodegradação foram avaliadas individualmente (Figuras 12a, 12d e Figura 13). Os compostos refratários compreenderam 30.8 % da MOD inicial intracelular.

Foram quantificados e identificados também os compostos que foram tanto bio quanto fotodegradáveis, ou seja, em que extensão da MOD intracelular ocorreu a competição entre os dois processos e como se caracteriza a porção da MOD que sofre este efeito. Pela comparação entre os grupos de compostos ‘biodegradados’ e ‘fotodegradados’, foram identificados 103 compostos comuns, que representam 25.8 % dos compostos da MOD inicial. Trata-se de um grupo de compostos diverso quanto à estrutura, principalmente por que CRAM e aromáticos contribuem com porções significativas (Figura 17a). CHON foram os compostos dominantes dentre os afetados pela competição (Figura 17b). Proporcionalmente à amostra de MOD inicial, os compostos aromáticos apareceram como a classe preferencialmente afetada pela competição

entre os processos, enquanto CRAM são os menos afetados (Figura 17c). Em relação às proporções iniciais, moléculas ricas em nitrogênio (CHON) e fósforo (CHOP) foram as classes mais lábeis simultaneamente aos dois processos (Figura 17d).

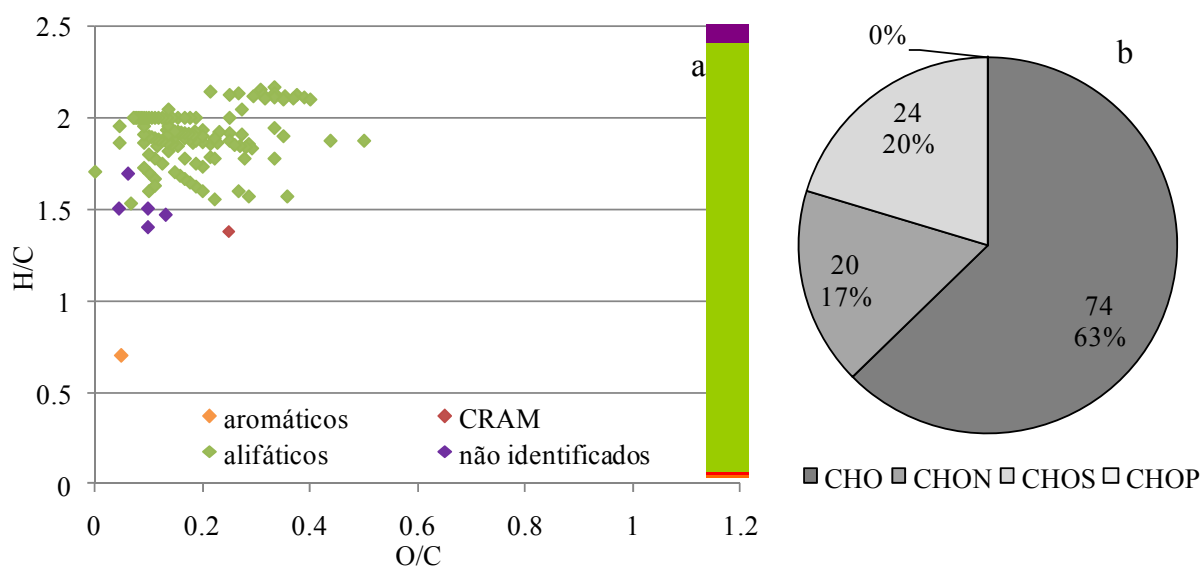


Figura 16. Composição química dos compostos resistentes simultaneamente à degradação biológica e fotoquímica da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe, e (b) composição atômica em número e proporção (%).

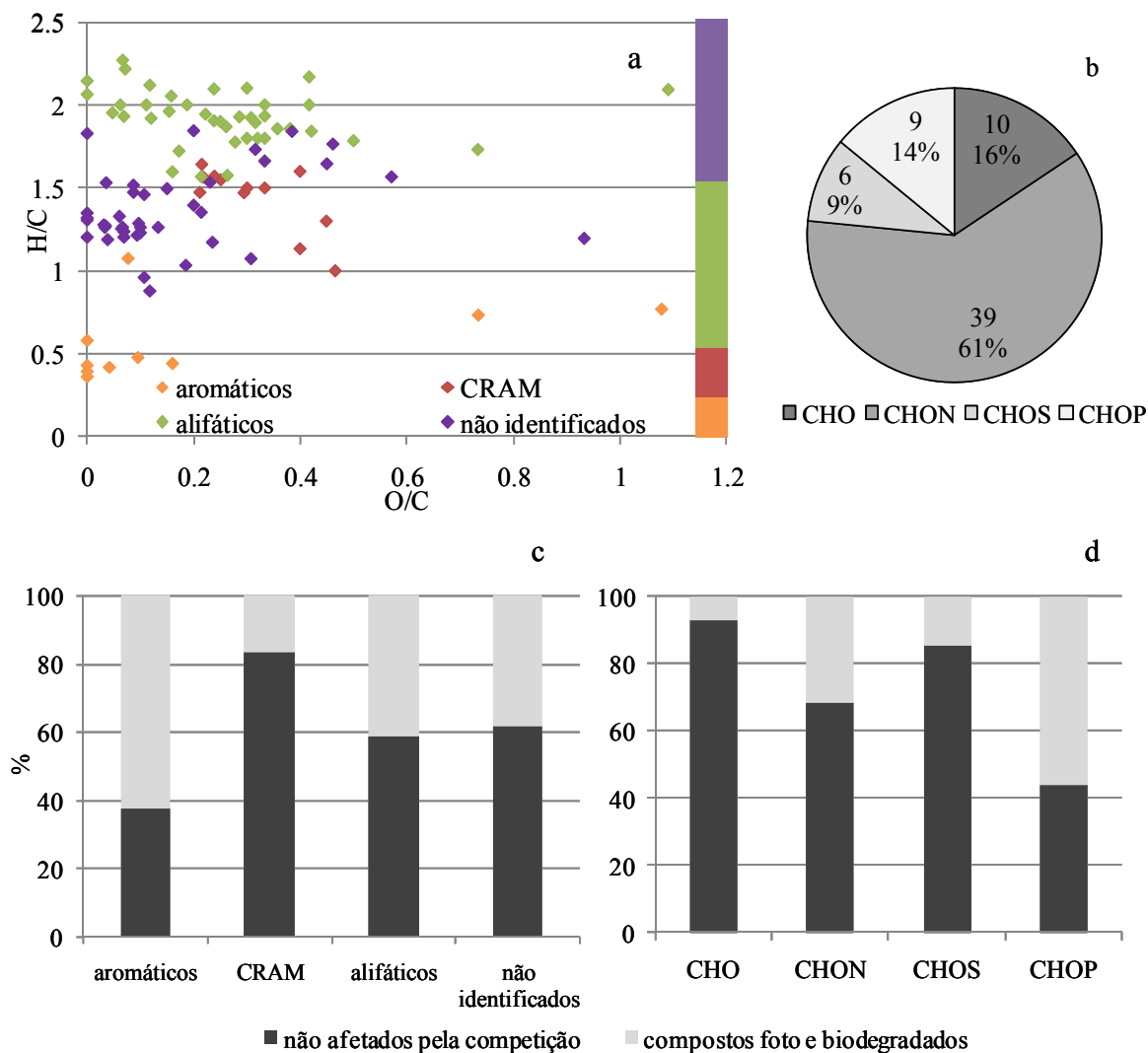


Figura 17. Composição química dos compostos simultaneamente bio e fotodegradados da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa*: (a) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição proporcional de cada classe; (b) composição atômica em número e proporção (%); proporção (%) entre compostos resistentes e bio+foto degradados, classificados quanto à (c) forma estrutural e (d) composição atômica.

Dentre os fotoprodutos da MOD intracelular, 78 % foram subsequentemente biodegradados. O diagrama de Van Krevelen dos fotoprodutos mostra que a maior parte da sua porção biodegradada é composta por CRAM (Figura 18a). Por outro lado, os fotoprodutos resistentes à biodegradação foram em sua maioria compostos por alifáticos (Figura 18a). Seguindo a tendência da biodegradação da MOD inicial, a maioria dos fotoprodutos biodegradados foi composta por CHON (84 %), enquanto que a maior parte dos fotoprodutos resistentes foram CHO (47%, Figura 18b). Todos os aromáticos fotoproduzidos foram em seguida consumidos pelas bactérias, assim como a maior parte dos CRAM e moléculas não identificadas (Figura 18c). CHOP não figura entre os fotoprodutos e CHON foram os fotoprodutos preferencialmente biodegradados (Figura 18d).

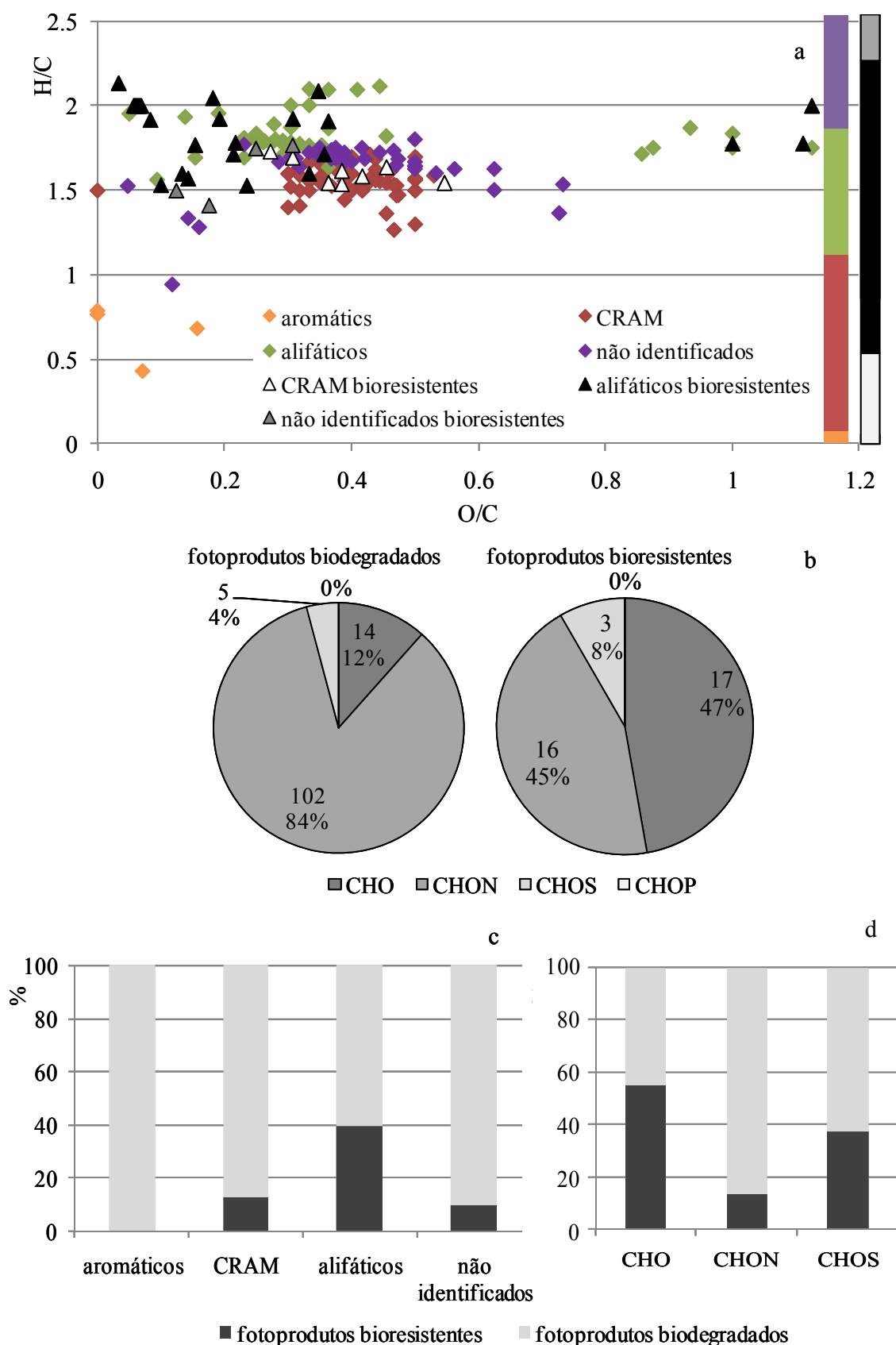


Figura 18. Fotoprodutos biodegradados e bioresistentes: (a) Diagrama de Van Krevelen e classificação estrutural, onde as barras representam a contribuição proporcional (%) de cada classe de compostos; (b) composição atômica dos fotoprodutos biodegradados e bioresistentes; proporção (%) entre fotoprodutos biodegradados e bioresistentes, de acordo com sua (c) classe estrutural e (d) composição atômica.

A atividade biológica causou o aumento no número de compostos identificáveis pela técnica (i.e., ionizáveis) (Tabela I). A excreção de compostos ionizáveis foi maior quando resultante do bioprocessamento da MOD inicial (de 399 para 762, aumento de 91 %, Tabela I) do que da MOD pré irradiada (de 390 para 576, aumento de 48 %, Tabela I). A comparação entre a composição dos bioprodutos da atividade bacteriana em MOD inicial e pré irradiada mostrou que ambos foram dominados por compostos alifáticos (Figura 19a e 19b). Compostos nitrogenados foram dominantes dentre os bioprodutos da atividade microbiana sobre a MOD inicial (54 %) e sobre a MOD pré irradiada (48 %), e CHO também representou uma fração considerável em ambos (41 e 47 %, respectivamente) (Figura 19c e 19d).

A pré irradiação da MOD resultou não somente em menor número de bioprodutos, mas também em moléculas de massa molecular média significativamente menor (335) do que aquela dos bioprodutos da atividade bacteriana em MOD inicial (380) ($p = 0.0004$). As amostras de MOD inicial e MOD pré irradiada, no entanto, não foram significativamente diferentes em termos de massa molecular ($p = 0.3233$). As diferenças quantitativas em número e massa molecular entre os bioprodutos, portanto, estão relacionadas à qualidade da MOD disponível, e não à sua quantidade ou massa molecular média.

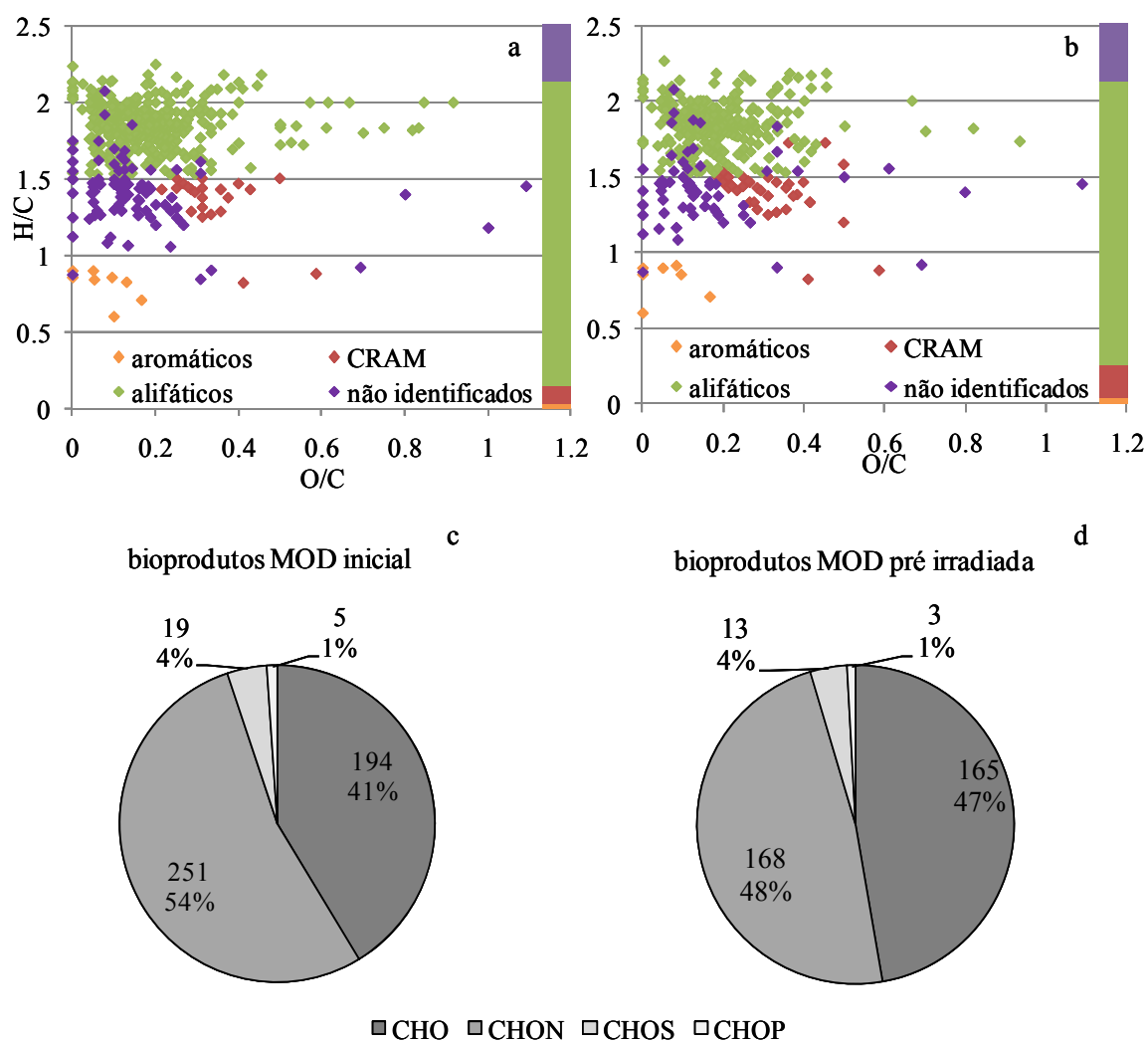


Figura 19. Composição química dos bioprodutos da atividade biológica sobre a MOD intracelular, inicial (painéis a e c) e pré irradiada (painéis b e d), de *Microcystis aeruginosa*: (a e b) diagrama de Van Krevelen e classes estruturais, onde a barra representa a contribuição porporcional de cada classe, e (c e d) composição atômica em número e proporção (%).

Finalmente, foi possível analisar os processos fotoquímico e biológico em relação à massa molecular. A Tabela II mostra que o grupo de moléculas resistentes à biodegradação é característico por massa molecular significativamente menor (307) do que os compostos que são resistentes à fotodegradação (352), enquanto que o grupo de compostos biodegradados (401) tem massa significativamente maior do que o grupo de compostos fotodegradados (338). Estes resultados mostram que os processos de biodegradação e fotodegradação não são competitivos em termos de massa molecular da MOD. Ao mesmo tempo, o grupo de moléculas biodegradadas é significativamente maior em massa (401) do que o grupo de moléculas biorresistentes (307), o que demonstra a biodegradação preferencial de compostos maiores, enquanto compostos menores são preferencialmente preservados. Já as massas moleculares dos compostos fotodegradados (338) e fotorresistentes (352) não são significativamente diferentes, o que significa que as reações fotoquímicas não são direcionadas pela massa molecular.

Tabela II. Comparações entre as massas moleculares (Da) dos grupos de compostos da MOD intracelular de *Microcystis aeruginosa* classificados como resistentes e degradados pela atividade biológica e fotoquímica separadamente, e aplicação do teste não paramétrico de Mann Whitney.

Combinações entre os grupos	Massa Molecular (Da)		Teste de Mann-Whitney
bioresistentes x fotoresistentes	307	352	p < 0.0001, ***
biodegradados x fotodegradados	401	338	p = 0.0007, ***
biodegradados x bioresistentes	401	307	p < 0.0001, ***
fotodegradados x fotoresistentes	338	352	p = 0.5165, n/s

, *** extremamente significante, n/s não significante

4.4 Discussão

4.4.1 Transformações biológicas e fotoquímicas da MOD intracelular

Os resultados obtidos pelas análises da MOD-C, MOD-F e FTICRMS possibilitaram a ampla caracterização da MOD intracelular de *M. aeruginosa*, e forneceram ferramentas para a compreensão de sua degradabilidade.

Grande redução na absorbância da MOD-C foi observada após 1 dia de incubação das bactérias, enquanto que a mesma redução foi observada somente após 7 dias de exposição à radiação UVB. Isso demonstra que a MOD-C é mais lábil à biodegradação do que à fotodegradação. Embora uma das funções da MOD-C em ambientes aquáticos seja filtrar a radiação solar na coluna d'água, e assim proteger a biota dos efeitos deletérios da radiação UV (Walsh et al 2003), esta fração também pode representar uma fonte de nutrientes e energia para a comunidade bacteriana (Nelson et al 2004). No caso da MOD intracelular de *M. aeruginosa*, a fotodegradação da porção cromofórica mostrou-se lenta, e portanto este processo não causa a exposição direta das bactérias à radiação UV antes que a própria comunidade microheterotrófica utilize esta porção da MOD como fonte de energia.

A dinâmica da biodegradação da porção fluorescente da MOD também não foi significativamente alterada pela pré-irradiação. A produção de material fluorescente durante a biodegradação da MOD intracelular demonstra que o material M, encontrado em amostra de MOD de ambientes predominantemente autotrófos (Huguet et al 2009), especialmente em águas oceânicas (Coble 1996), é de fato produto da excreção microbiana (Parlanti et al 2000). Como já discutido no Capítulo 3, a produção do material fluorescente M pode estar relacionada à manosamina (manose aminada), composto encontrado em níveis elevados no citoplasma de cianobactérias, como *Synechococcus* sp (Benner e Kaiser 2003). Por outro lado, nossos resultados sugeriram que a atividade bacteriana produz este material M pela degradação do material húmico C, já que a degradação de fluoróforos está constantemente relacionada à redução em seus comprimentos de onda de emissão e excitação (Alberts et al 2002). Sendo o

material húmico C relativamente resistente à irradiação, a produção do material M ocorreu como resultado da biodegradação tanto da MOD inicial como da MOD pré irradiada; no entanto, a intensidade de fluorescência do material M produzido nas culturas foi maior quando a MOD inicial foi biodegradada. Isso pode indicar que quanto mais material fluorescente inicial, maior será a produção de material novo fluorescente M. Neste sentido, a radiação UV pode funcionar como um controle na produção de material fluorescente (M) novo pela comunidade bacteriana.

A caracterização química em nível molecular da MOD intracelular mostrou dominância de compostos alifáticos, e de moléculas do tipo CHO e CHON. Estas características estruturais e atômicas podem estar representando moléculas comuns na MOD intracelular, como lipídeos e proteínas, e possivelmente fragmentos de ácidos nucleicos.

Embora alifáticos sejam os compostos mais abundantes, eles foram os mais refratários à foto e biodegradação. Alifáticos são característicos por longas cadeias de carbono que podem conter várias duplas ligações com moléculas de hidrogênio; a ausência de anéis aromáticos e não aromáticos torna estes compostos bastante fotoestáveis. Lipídeos polares, especialmente, apresentam vários níveis de hidrofobicidade, o que também dificulta sua biodegradação. Os compostos do tipo aromáticos e CRAM, por outro lado, foram preferencialmente foto e biodegradados (Mopper e Kieber 2000). Como esperado, compostos ricos em nitrogênio (CHON) e fósforo (CHOP) foram preferencialmente biodegradados. Como não foram adicionados nutrientes inorgânicos às culturas, é razoável que a atividade da comunidade bacteriana seja preferencialmente direcionada para o consumo de compostos ricos nestes dois tipos de nutrientes necessários ao crescimento e divisão celular (Fogg 1975).

Os compostos excretados pelas bactérias foram em sua maioria alifáticos, semelhante à MOD inicial, o que indica que o bioprocessamento da MOD intracelular como processo isolado, tende a aumentar ou pelo menos manter o caráter alifático da MOD. A MOD fotoalterada, por outro lado, é proporcionalmente mais rica em compostos CRAM e o material excretado a partir da MOD fotoquimicamente alterada também apresenta maior proporção de CRAM. Isto indica

que o tipo de MOD disponível à comunidade microheterotrófica tem o potencial de direcionar a composição dos produtos de excreção.

4.4.2 Efeitos da radiação UV sobre a biodisponibilidade

A ausência de diferenças significativas e consistentes entre a produtividade bacteriana em MOD inicial e pré-irradiada, nos dois experimentos, mostrou que a exposição de curto ou longo prazo à radiação não afeta de maneira considerável a atividade bacteriana sobre a MOD intracelular. As similaridades no consumo da MOD em termos de COD reforçam esta hipótese. A similaridade dos padrões da biodegradação da MOD-C e na dinâmica dos fluoróforos nos cultivos em MOD inicial e pré irradiada revelaram que as alterações causadas pela irradiação nas frações cromofórica e fluorescente da MOD não afetaram sua subsequente utilização pela comunidade bacteriana.

Embora análises das grandes frações da MOD supra listadas (COD, MOD-C, MOD-F) demonstrem ausência de efeitos líquidos e/ou consistentes da irradiação sobre a biodisponibilidade, as análises detalhadas da composição química da MOD intracelular fornecida por FTICRMS revelaram que a exposição desta MOD à UV causa pressões opostas no que se refere à sua biodisponibilidade. Estes dados proporcionaram a compreensão do *porquê* de efeitos líquidos da irradiação sobre a biodisponibilidade não terem sido observados e foram, consequentemente, essenciais na correta interpretação e compreensão dos resultados obtidos.

Em teoria, a exposição da MOD à radiação pode resultar em aumento da biodisponibilidade pela transformação de compostos biorresistentes em compostos biolábeis ou seja, pela fotoprodução de compostos biodegradáveis (Bertilsson e Tranvik 1998); a exposição pode também resultar em redução da biodisponibilidade pela competição entre os dois processos, ou seja, coincidência entre moléculas foto e biodegradadas (Tranvik e Kokalj 1998), ou pela fotoprodução de compostos biorefratários (Naganuma et al 1996). Os três tipos de reações podem ocorrer simultaneamente, e o efeito final da irradiação sobre a biodisponibilidade será o balanço entre eles. É importante salientar que a combinação entre estes vários processos

tende a variar de acordo com a composição inicial da MOD (Tranvik e Bertilsson 2001), ou seja, de acordo com o tipo de MOD estudado, as diversas reações terão ‘pesos’ diferentes, resultando em efeitos positivos e negativos sobre a produtividade bacteriana.

Primeiramente, é notável que uma porção da MOD intracelular foi identificada como naturalmente resistente à biodegradação (considerando o período de tempo estudado). A maior parte dos compostos biorresistentes é também fotoresistente, e desta forma, a pré-irradiação não atua no sentido de aumentar a biodisponibilidade desta porção da MOD. Isto pode estar relacionado ao fato de a maior parte desta porção refratária da MOD ser composta por alifáticos, como já mencionado, característicos por sua foto-estabilidade (ausência de anéis aromáticos). A porção refratária da MOD intracelular (25 %, após 7 dias de incubação das bactérias) foi consideravelmente maior do que a da MOD extracelular (16 %, após 2 dias de incubação).

Nossas análises demonstraram também que a ocorrência de competição entre os processos de degradação fotoquímica e biológica sobre a porção lábil da MOD envolve uma considerável porção da MOD total (30.8 %). É interessante notar que o conjunto de compostos que ‘sofre’ competição entre foto e biodegradação é principalmente composta por moléculas ricas em nitrogênio e fósforo, dois dos principais nutrientes necessários ao crescimento e produtividade bacterianos (Fogg 1975). Os efeitos negativos desta competição estão, portanto, relacionados ao acesso a estes nutrientes, mais do que à fonte de carbono em si. Por outro lado, dentre os compostos mais lábeis à biodegradação (aromáticos e CRAM), aromáticos são aqueles que mais sofrem os efeitos da competição, mas em compensação estão presentes em menor proporção na MOD; CRAM é a classe de compostos menos afetada pela competição e, portanto, continua sendo uma importante fonte de energia e nutrientes mesmo após a fotodegradação.

A exposição à radiação produziu maior proporção de compostos lábeis do que de compostos refratários. A fotoprodução de compostos biologicamente lábeis foi evidenciada previamente (Kieber et al 1989, Mopper et al 1991), embora estes estudos não abordem a estrutura destes compostos recém produzidos. O uso de FTICRMS permitiu no presente estudo a

identificação destes compostos como pertencentes ao grupo CRAM, e também como moléculas nitrogenadas (CHON).

Assim, concluímos que os efeitos positivos e negativos da irradiação sobre a biodisponibilidade da MOD tendem a se anular. Em resumo, estes efeitos são (1) resistência de significativa porção da MOD a ambos os processos; (2) a ocorrência de competição, que afeta compostos nutricionalmente importantes; (3) o fato de esta competição atingir principalmente aromáticos uma das classes preferencialmente biodegradadas, mas que compõe uma pequena fração da MOD, enquanto que pouco afeta outra classe também preferencialmente biodegradada (CRAM), e presente inicialmente em maior proporção; (4) ocorrência de fotoprodução de compostos lábeis e nutricionalmente importantes (CHON) e preferencialmente biodegradáveis (CRAM); e (5) fotoprodução pouco significativa de compostos biorefratários.

Mesmo considerando a limitação do intervalo de massa molecular abrangido por FTICRMS, nossos resultados indicaram claramente que a biodegradação é sensível à massa molecular dentro do intervalo estudado, sendo limitada por moléculas menores, enquanto que os processos fotoquímicos atuam de maneira indiscriminada em relação à massa deste tipo de MOD. As reações mediadas pela radiação, no entanto, estão mais relacionadas à presença de porções da molécula que absorvem radiação (Tranvik e Kokalj 1998). No que se refere à massa molecular da MOD intracelular, portanto, foto e biodegradação não são processos competitivos.

Vale salientar ainda que a caracterização química dos processos foi realizada em um único ponto durante o cultivo das bactérias – 7 dias. Desta forma, compostos aqui considerados biorresistentes podem, e provavelmente são, degradados quando a MOD é cultivada por mais tempo e, ao mesmo tempo, compostos identificados como biodegradados poderiam ter sido identificados como biorresistentes no início do cultivo. Entretanto, o balanço entre estas reações parece não ter sido significativamente diferente em nenhum outro momento do cultivo das bactérias, já que a produtividade bacteriana e o consumo de COD como um todo foram bastante similares nas culturas de MOD inicial e pré-irradiada ao longo de todo o experimento.

Conclusões

† A MOD extracelular de *M. aeruginosa* tem influência significativa nas propriedades ópticas e na composição e características químicas da MOD do reservatório de Barra Bonita.

† A MOD extracelular de *M. aeruginosa* apresenta caráter lábil à atividade microheterotrófica, representando uma fonte de energia e nutrientes prontamente bioassimilável.

† O efeito da radiação UV sobre a MOD extracelular é a redução em sua biodisponibilidade. Este efeito é devido às características ópticas e químicas (estruturais e de composição atômica) e de massa molecular desta MOD, que a definem como simultaneamente foto e biodegradável. Neste sentido, portanto, a radiação UV é um fator ambiental que desacelera o mecanismo do elo microbiano.

† A ausência de efeitos detectáveis, negativos ou positivos, sobre a biodisponibilidade da MOD intracelular mascara a ocorrência de mecanismos atuando em direções opostas, identificados como: competição entre foto e biodegradação, fotoprodução de compostos prontamente biodisponíveis e ausência de sobreposição dos dois processos no que se refere ao intervalo de massa molecular degradável.

Referências Bibliográficas

Alberts JJ, Takacs M, Egeberg PK. 2002. Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC). *Organic Geochemistry*, 33, 817–828.

Alberts JJ, Takacs M, Schalles J. 2004. Ultraviolet–visible and fluorescence spectral evidence of natural organic matter (NOM) changes along an estuarine salinity gradient. *Estuaries*, 27, 296–310.

Anesio AM, Granéli W. 2004. Photochemical mineralization of dissolved organic carbon in lakes of differing pH and humic content. *Archiv fur Hydrobiologie*, 160, 105-116.

Azam F, Cho BC. 1987. Bacterial utilization of organic matter in the sea. *In: Ecology of Microbial Communities* (Eds Fletcher M, Gray TRG, Jones JG), pp. 261-281. Cambridge University Press, Cambridge.

Bashford CL, Harris D.A. 1987. Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach. Oxford, IRL Press.

Benner R., Biddanda B. 1998. Photochemical transformation of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. *Limnology and Oceanography*, 43, 1373-1378.

Benner R, Kaiser K. 2003. Abundance of amino sugars and peptidoglycan in marine particulate and dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 48, 118–128.

Bertilsson S, Carlsson P, Granéli W. 2004. Influence of solar radiation on the availability of dissolved organic matter to bacteria in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research*, 51, 2557-2568.

Bertilsson S, Tranvik LJ. 1998. Photochemically produced carboxylic acid as substrates for freshwater bacterioplankton. *Limnology and Oceanography*, 43, 885-895.

Biers EJ, Zepp RG, Moran MA. 2007. The role of nitrogen in chromophoric and fluorescent dissolved organic matter formation. *Marine Chemistry*, 103, 46-60.

Blough NV, Del Vecchio R. 2002. Chromophoric DOM in the coastal environment. *In: Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (Eds Hansell DA, Carlson CA), pp. 509–545. Academic Press, Amsterdam.

Blough NV, Zepp RG. 1995. Reactive oxygen species in natural waters. *In: Active Oxygen Species in Chemistry* (Eds Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JF), pp. 280–333. Blackie Academic and Professional.

Boss E, Pegau WS, Zaneveld JRV, Barnard AH. 2001. Spatial and temporal variability of absorption by dissolved material at a continental shelf. *Journal of Geophysical Research – Oceans*. 106, 9499–9507.

Bracchini L, Cozar A, Dattilo AM, Loiselle SA, Tognazzi A, Azza N, Rossi C. 2006. The role of wetlands in the chromophoric dissolved organic matter release and its relation to aquatic ecosystems optical properties. A case of study: Katonga and Bunjako Bays (Victoria Lake, Uganda). *Chemosphere*, 63, 1170–1178.

Bricaud A, Morel A, Prieur L. 1981. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains. *Limnology and Oceanography*, 26, 43–53.

Bruccoleri A, Pant BC, Sharma DK, Langford C H. 1993. Evaluation of primary photoproduct quantum yields in fulvic acid. *Environmental Science and Technology*, 27, 889–894.

Bushaw KL, Zepp RG, Tarr MA, Schulz-Jander D, Bourbonniere RA, Hodson RE, Miller WL, Bronk DA, Moran MA. 1996. Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nature*, 381, 404–407.

Carder KL, Steward RG, Harvey GR, Ortner PB. 1989. Marine humic and fulvic-acids – their effects on remote-sensing of ocean chlorophyll. *Limnology and Oceanography*, 34, 68–81.

Carmichael WW. 1992. A status report of planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. United States Environmental Protection Agency/600/R-92/072, pp.32–33.

Choi K, Ueki M, Imai A, Kim B, Kawabata Z. 2004. Photoalteration of dissolved organic matter (DOM) released from *Microcystis aeruginosa* in different growth phases: DOM-fraction distribution and biodegradability. *Archiv fur Hydrobiologie*, 159, 271–286.

Coble PG. 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51, 325–346.

Colombo V. 2006. Polissacarídeos extracelulares e atividade enzimática das glicosidases do Reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP, 119pp.

De Haan H, De Boer T. 1987. Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic Laken Tjeukemeer. *Water Research*, 21, 731-734.

Dellamano-Oliveira MJ, Vieira AAH, Rocha O, Colombo V, Santanna C. 2008. Phytoplankton taxonomic composition and temporal changes in a tropical reservoir. *Fundamental and Applied Limnology*, 171, 27-38.

Fogg GE. 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. Wisconsin, USA, 175pp.

Gao HZ, Zepp RG. 1998. Factors influencing photoreactions of dissolved organic matter in a coastal river of the southeastern United States. *Environmental Science and Technology*, 32, 2940-2946.

Gaskell SJ. 1997. Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 677-688.

Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Xu FS. 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environmental Health Perspectives*, 108, 435-439.

Giroldo D. 2003. Especificidade em associações alga/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados por três espécies fitoplanctônicas isoladas de um reservatório tropical eutrófico do Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, SP. 152 pp.

Gobler CJ, Hutchins DA, Fisher NS, Coper EM. 1997. Release and bioavailability of C, N, e Se, and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. *Limnology and Oceanography*, 42, 1492-1504.

Gonsior M, Peake BM, Cooper WT, Podgorski D, D'Andrilli J, Cooper WJ. 2009. Photochemically induced changes in dissolved organic matter identified by ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 43, 698-703

Gorham PR, McLachlan J, Hammer UT, Kim WK. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie*, 15, 769-780.

Gouvea SP. 2004. O papel dos polissacarídeos algais na dinâmica de metais do reservatório de Barra Bonita. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, SP, 97pp.

Green SA, Blough NV. 1994. Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 39, 1903-1916.

Hama T. 1991. Production and turnover rates of fatty acids in marine particulate matter through phytoplankton photosynthesis. *Marine Chemistry*, 33, 213-217.

Hansell DA, Carlson CA, Bates NR, Poisson A. 1997. Horizontal and vertical removal of organic carbon in the equatorial Pacific Ocean: a mass balance assessment. *Deep Sea Research*, 44, 2115–2130.

Harrison JW, Smith REH. 2009. Effects of ultraviolet radiation on the productivity and composition of freshwater phytoplankton communities. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8, 1218-1232.

Harvey GR, Boran DA, Chesal LA, Tokar JM. 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry*, 12, 119-132.

Hertkorn N, Benner R, Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Witt M, Kaiser K, Ketrup A, Hedges J I. 2006. Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 2990-3010.

Hidaka H, Garcia-Lopez E, Palmisano L, Serpone N. 2008. Photoassisted mineralization of aromatic and aliphatic N-heterocycles in aqueous titanium dioxide suspensions and the fate of the nitrogen heteroatoms. *Applied Catalysis B: Environmental*, 78, 139-150.

Hockaday WC, Grannas AM, Kim S, Hatcher PG. 2006. Direct molecular evidence for the degradation and mobility of black carbon in soils from ultrahigh-resolution mass spectral analysis of dissolved organic matter from a fire-impacted forest soil. *Organic Geochemistry*, 37, 501-510.

Huguet A, Vacher L, Relexans S, Saubusse S, Froidefond JM, Parlanti E. 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry*, 40, 706-719.

Janse I, Kardinaal WEA, Meima M, Fastner J, Visser PM, Zwart G. 2004. Toxic and non toxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of RNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 3979-3987.

Kieber RJ, Zhou X, Mopper K. 1990. Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: fate of riverine carbon in the sea. *Limnology and Oceanography*, 35, 1503-1515.

Kieber RJ, Hydro LH, Seaton PJ. 1997. Photooxidation of Triglycerides and Fatty Acids in Seawater: Implication Toward the Formation of Marine Humic Substances. *Limnology and Oceanography*, 42, 1454-1462

Kujawinski EB, Del Vecchio R, Blough NV, Klein GC, Marshall AG. 2004 Probing molecular-level transformations of dissolved organic matter: insights from electrospray ionization *Fourier*-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Marine Chemistry*, 92, 23-37.

Lampert W, Sommer U. 1997. Limnoecology: the ecology of lakes and streams. Oxford Univ. Press.

Lee E.J. 2005. Studies of dissolved black carbon and organic matter utilizing electrospray ionization mass spectrometry. M.S. thesis. The Ohio State University.

Mack J., Bolton JR. 1999. Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 128, 1–13.

Marshall HG. 2009. Phytoplankton of the York River. *Journal of Coastal Research*, 57, 59-65.

McKnight DM, Boyer EW, Westerhoff PK, Doran PT, Kulbe T, Andersen DT. 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography*, 46, 38–48.

Miller WL, Zepp RG. 1995. Photochemical production of dissolved inorganic carbon from terrestrial organic matter: Significance to the oceanic organic carbon cycle. *Geophysics Research Letters*, 22, 417-420.

Minor EC, Dalzell BJ, Stubbins A, Mopper K. 2007. Evaluating the photoalteration of estuarine dissolved organic matter using direct temperature-resolved mass spectrometry and UV-visible spectroscopy. *Aquatic Sciences*, 69, 440-445.

Momzikoff A, Dallot S, Pizay MD. 1992. Blue and yellow fluorescence of filtered seawater in a frontal zone (Ligurian Sea, Northwest Mediterranean-Sea). *Deep-Sea Research. Part A, Oceanographic Research Papers*, 39, 1481–1498.

Mopper K, Zhou X, Kieber RJ, Kieber DJ, Sikorski RJ, Jones RD. 1991. Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. *Nature*, 353, 60-62.

Mopper K, Kieber DJ. 2000. Marine photochemistry and its impact on carbon cycling. *In: The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. (Eds. De Mora SJ, Demers S, Vernet M.), pp. 101–129. Cambridge University Press, Cambridge.

Mopper K, Schultz CA. 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry*, 41,229–38.

Mopper K, Stubbins A, Ritchie JD, Bialk HM, Hatcher PG. 2007. Advanced instrumental approaches for characterization of marine dissolved organic matter: Extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Reviews*, 107, 419-442.

Morris DP, Hargreaves BR. 1997. The role of photochemical degradation of dissolved organic carbon in regulating the UV transparency of three lakes on the Pocono Plateau. *Limnology and Oceanography*, 42, 239-349.

Munster M, Chrost RJ. 1990. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter. *In: Aquatic Microbial Ecology Biochemical and Molecular Approaches* (Eds Overbeck J, Chrost RJ), pp 8-46. New York: Springer-Verlag.

Naganuma T, Konishi S, Inoue T, Nakane T, Sukizaki S. 1996. Photodegradation or photoalteration? Microbial assay of the effect of UV-B on dissolved organic matter. *Marine Ecology Progress Series*, 135, 309-310.

Nelson NB, Carlson CA, Steinberg DK. 2004. Production of chromophoric dissolved organic matter by Sargasso Sea microbes. *Marine Chemistry*, 89, 273–287.

Nissenbaum A, Kaplan IR. 1972. Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. *Limnology and Oceanography*, 17, 570-582.

Obernosterer I, Ruardij R, Herndl GJ. 2001. Spatial and diurnal dynamics of dissolved organic matter (DOM) fluorescence and H₂O₂ and the photochemical oxygen demand of surface water DOM across the subtropical Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography*, 46, 632– 643.

Obernosterer I, Benner R. 2004. Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 49, 117-124.

Opsahl S, Benner R. 1998. Photochemical reactivity of dissolved lignin in river and ocean waters. *Limnology and Oceanography*, 43, 1297-1304.

Ohno T. 2002. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 36, 742-6.

Osburn CL, Morris DP, Thorn KA, Moeller RE. 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biochemistry*, 54, 251-278.

O'Sullivan DW, Neale PJ, Coffin RB, Boyd TJ, Osburn CL. 2005. Photochemical production of hydrogen peroxide and methylhydroperoxide in coastal water. *Marine Chemistry*, 97, 14-33.

Pakulski JD, Benner R. 1994. Abundance and distribution of carbohydrates in the ocean. *Limnology and Oceanography*, 39, 930-940.

Parlanti E, Worz K, Geoffroy L, Lamotte M. 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, 31, 1765-1781.

Perdue EM. 1984. Analytical constraints on the structural features of humic substances. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 48, 1435-1442.

Reitner B, Herzig A, Herndl GJ. 2002. Photoreactivity and bacterioplankton availability of aliphatic versus aromatic amino acids and a protein. *Aquatic Microbial Ecology*, 26, 305-311.

Reynolds CS, Walsby AE. 1975. Water blooms. *Biological Reviews*, 50, 437-481.

Saadi I, Borisover M, Armor R, Laor Y. 2006. Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. *Chemosphere*, 63, 530-539.

Sharp JH, Peltzer ET, Alperin MJ, Cauwet G, Farrington JW, Fry B, Karl DM, Martin JH, Spitzky A, Turgid S, Carlson CA. 1993. DOC Procedures subgroup report. *Marine Chemistry*, 41, 37-49.

Sleighter RL, Hatcher PG. 2007. The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter. *Journal of Mass Spectrometry*, 42, 559-574.

Sleighter RL, Hatcher PG. 2008. Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM) along a river to ocean transect of the lower Chesapeake Bay by ultrahigh resolution electrospray ionization *Fourier* transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Marine Chemistry*, 110, 140–152.

Smith DC, Azam F. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Marine Microbial Food Webs*, 6, 107-114.

Spencer RGM, Baker A, Ahad JME, Cowie JL, Ganeshram R, Upstill-Goddard RC, Uher G. 2007. Discriminatory classification of natural and anthropogenic waters in two UK estuaries. *Science of the Total Environment*, 373, 305-323

Stedmon CA, Markager S, Bro R. 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 82, 239-254.

Stubbins A, Hubbard V, Uher G, Law CS, Upstill-Goddard RC, Aiken GR, Mopper K. 2008. Relating carbon monoxide photoproduction to dissolved organic matter functionality. *Environmental Science and Technology*, 42, 3271-3276.

Stubbins A, Spencer RGM, Chen H, Hatcher PG, Mopper K, Hernes PJ, Mwamba VL, Mangangu AM, Wabakanghanzi JN, Six J. 2010. Illuminated darkness: molecular signatures of Congo River dissolved organic matter and its photochemical alteration as revealed by ultrahigh precision mass spectrometry. *Limnology and Oceanography*, 55, 1467-1477.

Sulzberger B, Durisch-Kaiser E. 2009. Chemical characterization of dissolved organic matter (DOM): A prerequisite for understanding UV-induced changes of DOM absorption properties and bioavailability. *Aquatic Science*, 71, 104-126.

Summers RS, Cornel PK, Roberts PV. 1987. Molecular size distribution and spectroscopic characterization of humic substances. *Science of Total Environment*, 62, 27-37

Tranvik LJ, Bertilsson S. 2001. Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. *Ecology Letters*, 4, 458-463.

Tranvik LJ, Kokalj S. 1998. Decreased biodegradability of algal DOC due to interactive effects of UV radiation and humic matter. *Aquatic Microbial Ecology*, 14, 301-307.

Tremblay LB, Dittmar T, Marshall AG, Cooper WJ, Cooper WT. 2007. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and

mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution *Fourier* Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. *Marine Chemistry*, 105, 15-29.

Vahatalo AV, Wetzel RG. 2004. Photochemical and microbial decomposition of chromophoric dissolved organic matter during long (months-years) exposures. *Marine Chemistry*, 89, 313-326.

Vähätalo AV, Zepp RG. 2005. Photochemical mineralisation of dissolved organic nitrogen to ammonium in the Baltic Sea. *Environmental Science and Technology*, 39, 6985-6992.

Van Krevelen D. 1950. Graphical – statistical method for the study of structure and reaction process of coal. *Fuel*, 29, 269-284.

Vieira AAH, Ortolano PIC, Giroldo D, Dellamano-Oliveira MJ, Bittar TB, Lombardi AT, Sartori AL, Paulsen BS. 2008. Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*, 53, 1887-1899.

Walsh JJ, Weisberg RH, Dieterle DA, He R, Darrow BP, Jolliff JK, Lester KM, Vargo GA, Kirkpatrick GJ, Fanning KA, Sutton TT, Jochens AE, Biggs DC, Nababan B, Hu Chuanmin, Muller-Karger FE. 2003. Phytoplankton response to intrusions of slope water on the West Florida Shelf: Models and observations. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 108, 21–31.

Weishaar JL, Aiken GR, Bergamaschi BA, Fram MS, Fugii R, Mopper K. 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*, 37, 4702–4708.

Wetzel RG. 2001. *Limnology: lake and river ecosystem* (3rd ed.). Academic Press.

Wetzel RG, Likens GE. 1991. *Limnological Analyses*. 2nd. Ed. Springer-Verlag. 391 pp.

White EM, Kieber DJ, Sherrard J, Miller WL, Mopper K. 2010. Carbon dioxide and carbon monoxide photoproduction quantum yields in the Delaware Estuary. *Marine Chemistry*, 118, 11-21.

Wu F, Tanoue E. 2001. Molecular mass distribution and fluorescence characteristics of dissolved organic ligands for copper (II) in Lake Biwa, Japan. *Organic Geochemistry*, 32, 11-20.

Zepp RG, Braun AM, Hoigne J, Leenheer JA. 1987. Photoproduction of hydrated electrons from natural organic solutes in aquatic environments. *Environmental Science and Technology*, 21, 485-490.