

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Icaro Coloian Zapparoli

Propriedades ópticas da matéria orgânica dissolvida produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce

SÃO CARLOS-SP
2021

Icaro Coloian Zapparoli

Propriedades ópticas da matéria orgânica dissolvida produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Hugo Sarmento

São Carlos
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Ícaro Coloian Zapparoli, realizada em 29/10/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmento (UFSCar)

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi (UFSCar)

Profa. Dra. Aurea Maria Ciotti (USP)

O presente trabalho foi realizado com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa Tecnológica - CNPq (processo 309514 / 2017-7), e apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Agradecimentos

Aos meus pais Laerte e Neila, meus avós Laerte, Irene e Sueli, e minhas tias Adriana e Patrícia, que sempre acreditaram no meu potencial, e me incentivaram em estudar.

À minha companheira e melhor amiga Fernanda Cruz Silva, que sempre me renovou energia e paciência para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de faculdade Tomás, Pedro, Laysla, Guilherme, Mateus, Vibra, Sheldon e OB, que sustentam a minha ideologia de “quem tem um amigo tem tudo”, e que laços mais antigos apenas se fortalecem.

Aos meus amigos de São Carlos: Gabriel, Kenji, Oton, Dota, Batata, Elen, Maria, Gabi, que me trouxeram a perspectiva que há muito mais a se explorar além do ambiente de laboratório.

Aos meus colegas de laboratório do LMPB e afiliados: Erick, Pedro, Greyce, Paula, Karime e o técnico Luizinho, obrigado pelas risadas, reflexões e “insights” dentro do ambiente de trabalho.

Ao companheiro de pesquisa Israel, que me auxiliou no desenvolvimento da pesquisa, permitindo recolher os frutos desse estudo.

À dra. Michaela Melo, especialista da área, obrigado pelas orientações e por me auxiliar na precisão das técnicas.

À toda equipe do Laboratório de Ficologia que me auxiliou: profa. Inessa, Rodrigo e técnico Luís, pelo fornecimento do material de estudo e pelas orientações.

Ao Prof. Hugo Sarmiento, que mesmo ainda confundido com o Israel (brincadeiras à parte), só tenho a agradecer desde o dia que você literalmente me deu acesso a porta do laboratório para eu estudar para o exame de mestrado. Agradeço também por todo o conhecimento acadêmico que me engrandeceu, e por toda atenção e calma mesmo em situações em que o estudo parecia estar eternamente inerte.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), à Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa Tecnológica (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por aprovarem o projeto e disponibilizar espaço físico e recursos, tornando possível a conclusão do estudo.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

— Marie Curie," Our Precarious Habitat" (1973), por Melvin A. Benarde.

Resumo

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é uma mistura heterogênea de moléculas com diferentes pesos moleculares e reatividade, que variam espaço-temporalmente entre os ecossistemas aquáticos, e é um elemento chave dos ciclos biogeoquímicos. O fitoplâncton é o principal produtor de DOM lábil, regulando a quantidade e composição de pools de DOM biodisponíveis que suportam o crescimento bacteriano e o fluxo de carbono através das teias alimentares, se destacando como uma fração importante, mas pouco explorada dentro do pool da DOM. A caracterização das propriedades ópticas da DOM fluorescente (FDOM) é um método rápido e de baixo custo que fornece informações sobre a origem e reatividade da DOM. Aqui, caracterizamos a DOM produzida por fitoplâncton de água doce usando espectroscopia de fluorescência e análise de fatores paralelos (PARAFAC) em 123 amostras de 45 espécies cultivadas em condições axênicas. Nossa hipótese é que espécies relacionadas produzem compostos semelhantes, e isso poderia ser detectado através das assinaturas de FDOM. Identificamos três componentes de fluoróforos que foram validados de forma cruzada usando o banco de dados OpenFluor. O componente predominante foi caracterizado como autóctone de origem proteica, e os outros dois componentes foram identificados como terrestre não processado e processado por atividade microbiana, respectivamente. Os índices de frescor e humificação variaram de acordo com o estágio de crescimento da cultura, indicando que a degradação pode ocorrer na ausência de bactérias heterotróficas ou radiação UV, provavelmente devido à oxidação. Além de fornecer um banco de dados sólido da FDOM produzida pelo fitoplâncton de água doce, mostramos que a composição da FDOM é extremamente variável entre as espécies, entre réplicas de culturas da mesma espécie e ao longo do estágio de crescimento da cultura. Concluimos que a FDOM produzida pelo fitoplâncton de água doce detectada por métodos ópticos não parece relacionada à estrutura filogenética de organismos fitoplanctônicos.

Palavras-chave: Matéria Orgânica Dissolvida Fluorescente, Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), Microalga, Cianobactéria.

Abstract

The dissolved organic matter (DOM) is a heterogeneous mixture of molecules with different weight and reactivity that vary spatio-temporally across aquatic ecosystems, and is a key element of biogeochemical cycles. Phytoplankton is a major producer of labile DOM, regulating the quantity and composition of bioavailable DOM pools that support bacterial growth and carbon flow through food webs, standing up as an important, but poorly explored fraction of the DOM pool. The characterization of the optical properties of the fluorescent DOM (FDOM) is a rapid and inexpensive method that provides information about the DOM origin and reactivity. Here, we characterized the DOM produced by freshwater phytoplankton using fluorescence spectroscopy and parallel factor analysis (PARAFAC) in 123 samples from 45 different species grown in axenic cultures. We hypothesized that related species would produce similar compounds, and this could be detected by FDOM signatures. We identify three fluorophore components that were cross-validated using the OpenFluor database. The predominant component was characterized as autochthonous of protein origin, and the other two components were identified as non-processed terrestrial and processed by microbial activity, respectively. The freshness and humification indexes varied according to the culture's growth stage, indicating that degradation may occur under the absence of heterotrophic bacteria or UV radiation, but probably due to chemical oxidation. Besides providing a solid database of FDOM produced by freshwater phytoplankton, we show that the FDOM composition is extremely variable among species, within replicated cultures of the same species, and across culture growth stage. We conclude that the FDOM produced by freshwater phytoplankton detected by optical methods does not seem related to phytoplankton phylogenetic structure.

Keywords: Fluorescent Dissolved Organic Matter, Parallel Factor Analysis (PARAFAC), Microalgae, Cyanobacteria.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Visão histórica da DOM.

Figura 2- Visão contemporânea da DOM.

Figura 3- Visão histórica e contemporânea da função de sistemas aquáticos terrestres no equilíbrio global de C.

Figura 4- Conceptualização dos diferentes tipos de carbono orgânico e matéria orgânica em ecossistemas aquáticos.

Figura 5- Dinâmica entre a luz UV, CDOM e produtividade primária em ecossistemas aquáticos.

Figura 6- Modelo de representação de processo de fluorescência.

Figura 7- Escala estimada da contribuição relativa de cada parcela da MOD em relação ao pool total.

Figura 8- Amostra de espectro de excitação-emissão, com marcadores de picos intensidades correlacionadas a componentes orgânicos dissolvidos.

Figura 9- Representação de um modelamento PARAFAC.

Figura 10- Dados sobre compostos orgânicos autofluorescentes presentes no ambiente, coletados na biblioteca online OpenFluor.

Capítulo 2

Figura 1- Matrizes de excitação/emissão da água miliQ e dos meios de cultivo WC e P+G.

Figura 2- Matrizes de excitação/emissão dos reagentes do meio de cultivo WC: silicato de sódio (Na_2SiO_3), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de cálcio (CaCl_2) e nitrato de sódio (NaNO_3).

Figura 3- Matrizes de excitação/emissão dos reagentes do meio de cultivo WC: sulfato de magnésio (MgSO_4), fosfato dipotássico (K_2HPO_4), nitrato de sódio (NaNO_3), vitaminas e micronutrientes.

Figura 4- Matrizes de excitação/emissão do meio de cultivo WC, e P+G. *Dispersão de Raman retirada.

Capítulo 3

Figura 1 – Índices ópticos agrupados por família (A) e gêneros (B).

Figura 2 – Espectros de excitação-emissão de modelo de 4 componentes validados pelo PARAFAC.

Figura 3 – Contribuição individual dos componentes validados pelo PARAFAC em todos os cultivos.

Figura 4 – Contribuição individual dos componentes validados pelo PARAFAC por cultivo.

Figura 5 – Contribuição individual dos componentes validados pelo PARAFAC, agrupado por famílias (A) e gêneros (B).

Figura 6 – Composição dos exudados dos cultivos validados pelo PARAFAC, agrupado por famílias (A) e gêneros (B).

Figura 7 – Valores de frescor e humificação de cultivos com diferentes fases de crescimento (A) e diferentes fases de crescimento das mesmas espécies (B).

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1- Picos de intensidades referenciados e localização das regiões dos componentes das matrizes de excitação-emissão (EEMs) obtidas de substâncias húmicas aquáticas e matéria orgânica dissolvida (DOM).

Tabela 2- Descrição das propriedades ópticas de absorção e fluorescência.

Capítulo 2

Tabela 1- Características dos componentes derivados do modelo PARAFAC, em comparação com estudos anteriores.

Capítulo 3

Tabela 1– Descrição, bibliografia, revisão e dados de propriedades ópticas de absorbância de propriedades ópticas.

Tabela 2–Características dos quatro componentes derivados pelo modelo PARAFAC, comparando com estudos prévios.

Material Suplementar

Tabela 1- Descrições taxonômicas dos fitoplâncton observados, além dos reagentes inoculados durante o período de incubação (Capítulo 2).

Tabela 2- Descrições taxonômicas dos fitoplâncton observados, além dos reagentes inoculados durante o período de incubação (Capítulo 3).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

A:T r – Razão entre os Picos A:T

C:A r – Razão entre os Picos C:A

CDOM – Matéria orgânica dissolvida cromofórica

DOM – Matéria orgânica dissolvida

EEM – Matrix de excitação e emissão

Em – Emissão

Ex – Excitação

FDOM – Matéria orgânica dissolvida fluorescente

FI – Índice de fluorescência

Fr – Índice de frescor

HIX- Índice de humificação

HMW – Alto peso molecular

LDOM - Matéria orgânica dissolvida lábil

LMW – Baixo peso molecular

PARAFAC – Análise de Fatores Paralelos

Sr – Razão de declive espectral

UV - Ultra-violeta

Sumário

Apresentação.....	14
Capítulo 1 - Matéria orgânica de ecossistemas aquáticos.....	15
1. Tipos e frações de carbono e matéria orgânica.....	17
2. Matéria orgânica dissolvida fluorescente.....	20
3. DOM de origem fitoplanctônica.....	27
Capítulo 2 - Influência do meio de cultivo na interpretação da matéria orgânica dissolvida fluorescente.....	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	33
2.1. Local de experimento e design de estudo.....	33
2.2. Amostragem e Matéria Orgânica Dissolvida.....	34
2.3. Espectroscopia de fluorescência.....	34
2.4. Análise e processamento de dados.....	35
2.4.1. Montagem das EEM e picos máximos fluorescente de Ex/Em.....	35
2.4.2. Análise de fatores paralelos (PARAFAC).....	35
3. Resultados.....	35
3.1. EEM e picos máximos fluorescente de Ex/Em.....	35
4. Discussão.....	40
5. Conclusão.....	41
Capítulo 3 – Caracterização da matéria orgânica dissolvida produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce.....	42
Resumo.....	43
Abstract.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos.....	46
2.1. Local de experimento e design de estudo.....	46
2.2. Amostragem e matéria orgânica dissolvida.....	47
2.3. Espectroscopia de fluorescência.....	47
2.4. Análise e processamento de dados.....	48
2.4.1. Índices ópticos e seleção de pico.....	48
2.4.2. Análise de fatores paralelos (PARAFAC).....	48
2.4.3. Análises estatísticas.....	49
3. Resultados.....	49
3.1. Índices ópticos e seleção de pico.....	49

3.2. Caracterização da FDOM.....	52
3.3. Variação na composição da matéria orgânica dissolvida fluorescente (FDOM) sobre as estruturas filogenéticas	56
4. Discussão	63
5. Conclusão	65
Agradecimentos.....	66
Referências	66
Material Suplementar.....	77

Apresentação

O primeiro capítulo dessa dissertação possui como objetivo contextualizar historicamente o desenvolvimento da ideia de matéria orgânica dissolvida (DOM), assim como de revisar os conceitos ecológicos relacionados. Após a leitura desse capítulo, induzimos o leitor a questionar os seguintes conjuntos de perguntas “I) Meio de cultivos WC e P+G produzem fluorescência isoladamente? Ambos são viáveis para estudos de FDOM produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton?” e “II) Espécies de fitoplâncton relacionadas produzem compostos semelhantes? Esses compostos podem ser detectados por meio de assinaturas de fluorescência?”. Ambos conjuntos de perguntas serão respondidos através de métodos de pesquisa científica nos capítulos 2 e 3, respectivamente.

Capítulo 1 - Matéria orgânica de ecossistemas aquáticos

O conceito de matéria orgânica dissolvida (DOM) foi idealizado pela primeira vez na teoria sobre dinâmica trófica (LINDEMAN, 1942), como “lodo” (“ooze”) e “nutriente dissolvido” do ambiente “não vivo”, formado após a morte de um organismo, que é rapidamente incorporado para a comunidade biótica, especificamente bactérias, como fonte de disponibilidade energética, que produzem a matéria inorgânica, que por sua vez é utilizada por organismos fotossintéticos, reiniciando o ciclo da matéria (Fig. 1).

Atualmente, a DOM em sistemas aquáticos pode ser classificada por sua origem, podendo ser alóctone, geralmente composto por carbono orgânico, nitrogênio, fósforo e enxofre que são derivados do ecossistema terrestre circundante (AITKENHEAD-PETERSON; MCDOWELL; NEFF, 2003), ou de origem autóctone, geralmente sintetizada por (i) fitoplâncton que inclui cianobactérias fototróficas oxigênicas (ii) bactérias heterotróficas, (iii) macrófitas (plantas superiores aquáticas) ou liberadas na coluna de água por exsudação, excreção e lise celular (devido a ataques virais, pastoreio e alimentação superficial) (Fig. 2) (CASTILLO et al., 2010; DRUON et al., 2010; GUILLEMETTE; MCCALLISTER; DEL GIORGIO, 2013; JIAO et al., 2010; KAWASAKI; BENNER, 2006; SEYMOUR et al., 2017).

Além disso, essa fração é reconhecida como elemento chave nos ciclos biogeoquímicos globais (MYKLESTAD, 2000), sendo uma das principais fontes de DOM, altamente complexa e lábil, cuja principal fração inclui carboidratos, seguidos pelos compostos nitrogenados, como proteínas, polipeptídeos e aminoácidos (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011).

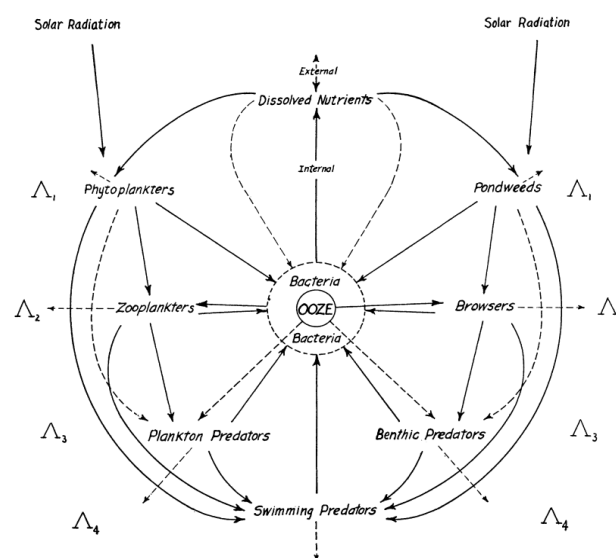


Figura 1 - Visão histórica da DOM ou "Ooze", proposta por LINDEMANN (1942) em seu modelo sobre dinâmica trófica.

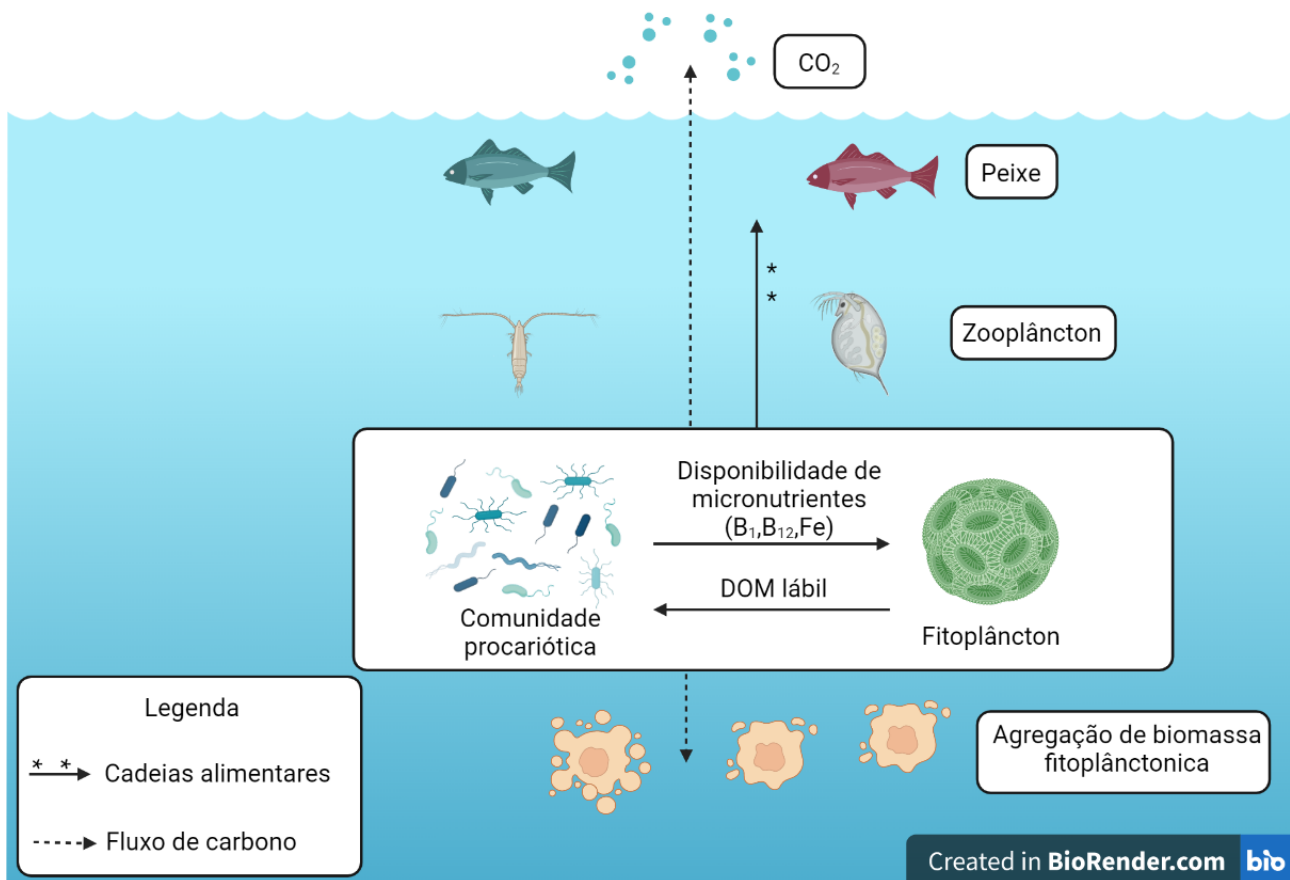


Figura 2 - Visão contemporânea da DOM.

Diferentes sistemas possuem interações específicas com a DOM de acordo com a origem: em sistemas marinhos observa-se proporções aproximadas entre DOM autóctone e alóctone, onde existe um grande sumidouro de carbono devido à ação de microrganismos heterotróficos que realizam o “microbial carbon pump” (DUCKLOW et al., 1986; JIAO et al., 2010; LECHTENFELD et al., 2015), além do armazenamento de grande pool de carbono reduzido, excedendo a quantidade de matéria orgânica presente em todos os organismos aquáticos e se igualando à quantidade de CO₂ atmosférico (BENNER et al., 1992; HANSELL; CARLSON, 1998). Já em ambientes continentais há uma proporção muito maior de DOM alóctone, devido aos processos de transporte da região terrestre circundante para dentro dos ecossistemas aquáticos (AITKENHEAD-PETERSON; MCDOWELL; NEFF, 2003). Inicialmente, acreditava-se que o papel dos sistemas aquáticos continentais era de exclusivamente transportar derivados de carbono orgânicos e inorgânicos da terra ao mar. Esse modelo de transporte em “tubo” (Fig. 3A), foi extensivamente explorado em 1970 e 1980 (DEGENS; KEMPE; RICHEY, 1991; SCHLESINGER; MELACK, 1981). Atualmente se difundiu o modelo de “funil” (Fig. 3B),

que propõe que ecossistemas aquáticos continentais representam um compartimento altamente ativo do ciclo global do C, junto aos oceanos e a atmosfera (BOLIN, 1981; PRENTICE et al., 2001; SIEGENTHALER; SARMIENTO, 1993), armazenando e processado C derivado de ecossistemas terrestres em sedimentos, além de emitir grandes quantidades de CO₂ para a atmosfera através do metabolismo microbiano, além de transportá-lo para o oceano (COLE et al., 2007), contribuindo com 3% de transporte de DOM terrestre todos os continentes (DOWNING et al., 2006).

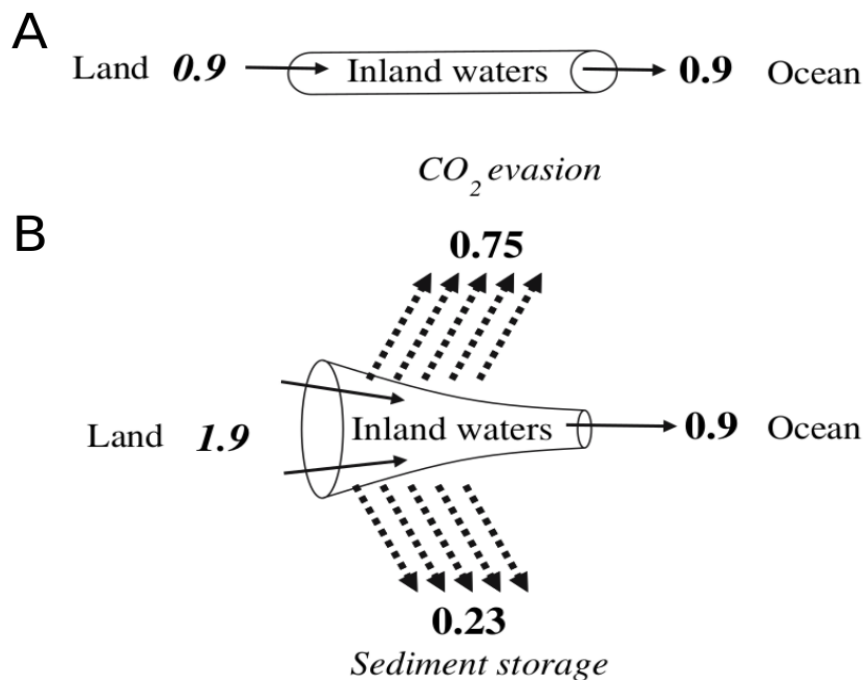


Figura 3 - Visão simplificada e esquemática da função de sistemas aquáticos terrestres no equilíbrio global de C. A - Visão histórica que considera as águas interiores como um tubo passivo que transporta carbono orgânico e inorgânico da terra para mar. B - Visão contemporânea que reconhece as águas interiores como componentes ativos de o ciclo C global, armazenando carbono derivado da terra em sedimentos, e perdem CO₂ como emissões para a atmosfera, além de transportá-lo para o oceano. Valores são representados em Pg C y⁻¹. Fonte: COLE et al. (2007).

1. Tipos e frações de carbono e matéria orgânica

Em ambientes aquáticos o carbono orgânico total (TOC) é a medição mais usada para quantificar a presença de matéria orgânica (MO). TOC é sinônimo de matéria orgânica natural (NOM) porque contaminantes orgânicos em sistemas naturais geralmente representam uma fração insignificante do TOC. Além disso, TOC pode ser comprimido entre picômetros até milímetros (mm) (JERRY A. LEENHEER; CROUÉ, 2003).

TOC pode ser dividido em frações de matéria orgânica particulada (POM) e matéria orgânica dissolvida (DOM) (HE et al., 2016). POM operacionalmente pode ser classificada, assim como sua fração bruta particulada (POC), como qualquer partícula que

pode ser retida em filtros de ~ 0.2 a $0.7 \mu\text{m}$ (HE et al., 2016; VERDUGO et al., 2004), e como uma mistura complexa de vida e matéria orgânica não viva, que incluem constituintes orgânicos e inorgânicos como fitoplâncton e células bacterianas, detritos orgânicos, pelotas fecais e partículas inorgânicas, além de agregados exopolímeros transparentes (TEP), proteínas, lipídeos e carboidratos complexos dispersos no ambiente ou agregados à bactérias, fitoplâncton e heterotrófos nanoflagelados (HNF) (HE et al., 2016; VOLKMAN; TANOUE, 2002). A DOM é produto de poeira e gases da atmosfera dissolvida, chuva, extrato de raiz, folha e serapilheira, e metabólitos primários e secundários de microrganismos (AITKENHEAD-PETERSON; MCDOWELL; NEFF, 2003). Operacionalmente, classifica-se, assim como o Carbono Orgânico Dissolvido (DOC), como a fração dissolvida da NOM que ultrapassa de 0.2 a $0.7\text{-}\mu\text{m}$, e caracterizada como uma mistura de compostos aromáticos e alifáticos, de diferentes pesos moleculares e reatividades, desde moléculas mais lábeis como aminoácidos, ácidos graxos, até compostos mais complexos como substâncias húmicas, proteínas e polissacarídeos (HE et al., 2016; JERRY A. LEENHEER; CROUÉ, 2003) (Fig. 4). É ubíqua em todos sistemas ecológicos, variando desde sistemas de água doce e salgada em regiões polares (MCKNIGHT; AIKEN; SMITH, 1991; NAIMAN; LINK, 1997) até as regiões tropicais (COBLE, 1996), assim como sistemas agrícolas (GRAEBER et al., 2015).

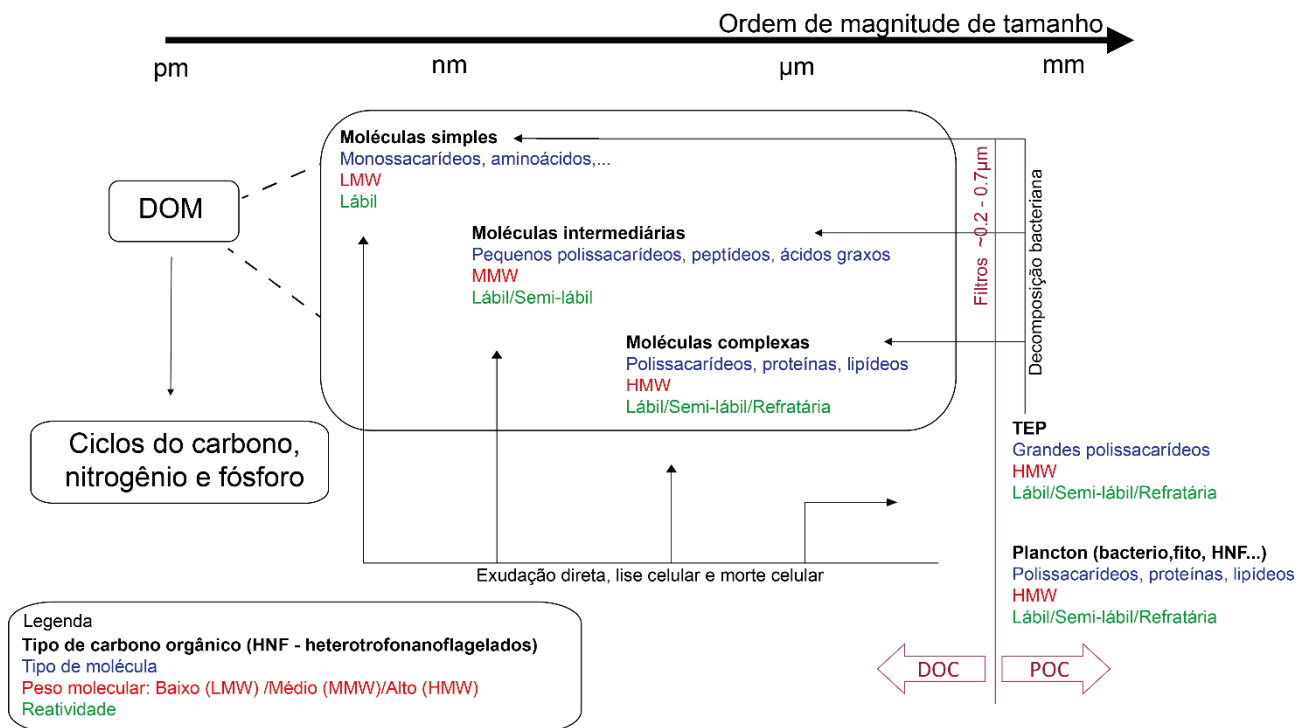


Figura 4 - Conceptualização dos diferentes tipos de carbono orgânico e matéria orgânica em ecossistemas aquáticos.

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é responsável pela manutenção dos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio e fósforo (COBLE et al., 2014). No ciclo do carbono nos oceanos, a matéria orgânica produzida por fitoplâncton através do uso do CO₂ na atmosfera é exportada das águas superficiais para o fundo do mar através dos processos de sedimentação da POM e pelo processo de alteração da circulação da coluna d'água do oceano, a ressurgência (CARLSON; DUCKLOW; MICHAELS, 1994; HANSELL, 2002). Grande parte dessa produção primária na superfície fica disponível para bactérias heterotróficas e archaea (AZAM et al., 1983; AZAM; AMMERMAN, 1984; DUCKLOW; CARLSON, 1992), que medeiam um fluxo significativo de DOM para POM pelo processo de “microbial carbon pump” (HANSELL et al., 2009; JIAO et al., 2010), através da respiração, retornando o CO₂ para a atmosfera (GIORGIO; PRAIRIE; BIRD, 1997). No ciclo do nitrogênio, a DOM atua como fator limitante, junto com o ferro e oxigênio, para o processo de fixação de N₂, realizada por fitoplâncton fixadores (LANDOLFI et al., 2013). No ciclo do fósforo, que possui papel importante no crescimento de algas, a DOM é resultado da disponibilidade do fósforo inorgânico dissolvido e fósforo orgânico dissolvido, que são originados pela sedimentação do fósforo orgânico particulado e pela morte e excreção fecal de zooplâncton e carnívoros, respectivamente, e então utilizados pelos fitoplânctons (WORSFOLD et al., 2008).

Uma fração da DOM caracteriza-se pela presença de compostos capazes de absorver a luz ultravioleta e frações visíveis no espectro da luz, denominados cromóforos. Dessa forma, essa fração é denominada cromofórica ou colorida da matéria orgânica dissolvida (CDOM) (COBLE, 2007).

A CDOM em altas concentrações filtra a penetração de luzes UV na superfície da água, preservando o DNA dos organismos, mas também diminui a profundidade da zona eufótica, e compete contra a clorofila-a (presente no fitoplâncton) pela absorção da fração azul (300 nanômetros), regulando a produção primária (Fig. 5) (ARRIGO; BROWN, 1996; BRICAUD; MOREL; PRIEUR, 1981; CARDER et al., 1991; KIRK, 1994). Além disso, a CDOM regula a permuta de cátion-ânion no ambiente, tamponando o pH (COBLE et al., 2014), além de formar complexos benéficos ao fitoplâncton, durante a presença de alta concentração de metais tóxicos (MIDORIKAWA; TANOUE, 1998).

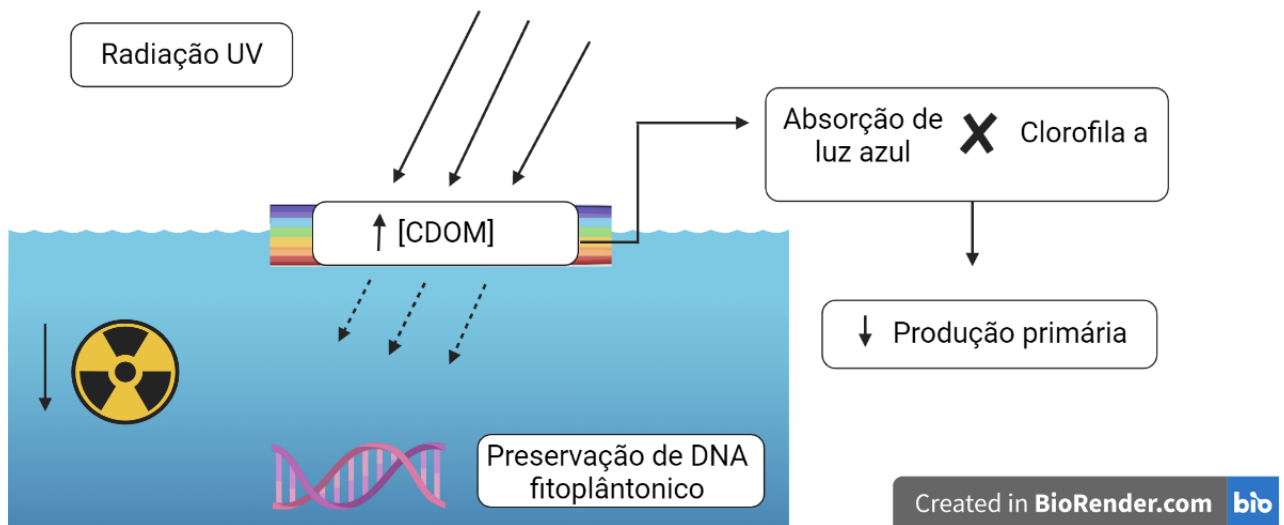


Figura 5 - Dinâmica entre a luz UV, CDOM e produtividade primária em ecossistemas aquáticos.

2. Matéria orgânica dissolvida fluorescente

A fração da DOM que emite fluorescência (emissão de energia não-incandescente uma molécula e seu retorno ao estado estável, após absorção e excitação (Fig. 6)), fornece informações sobre três tipos de carbono: aqueles associados a materiais de origem terrestre, ou de origem microbiana (ambos podem gerar matérias húmicas), ou aminoácidos (livres ou combinados) fluorescentes, que geram a fluorescência azul e ultravioleta (UV), respectivamente (e.g. felilalina, tirosina, triptofano, fenóis, indóis, fenilpropano, lignina, alcalóides) (COBLE, 1996). O efeito da fluorescência é gerado pela associação dos fluoróforos ao sistema conjugado central, sendo que a posição, estrutura, potencial de substituição e conjugação desses fluoróforos permitem aumento na excitação e emissão de comprimento de onda dos mesmos, consequentemente provocando um aumento na intensidade da fluorescência da molécula (COBLE et al., 2014).

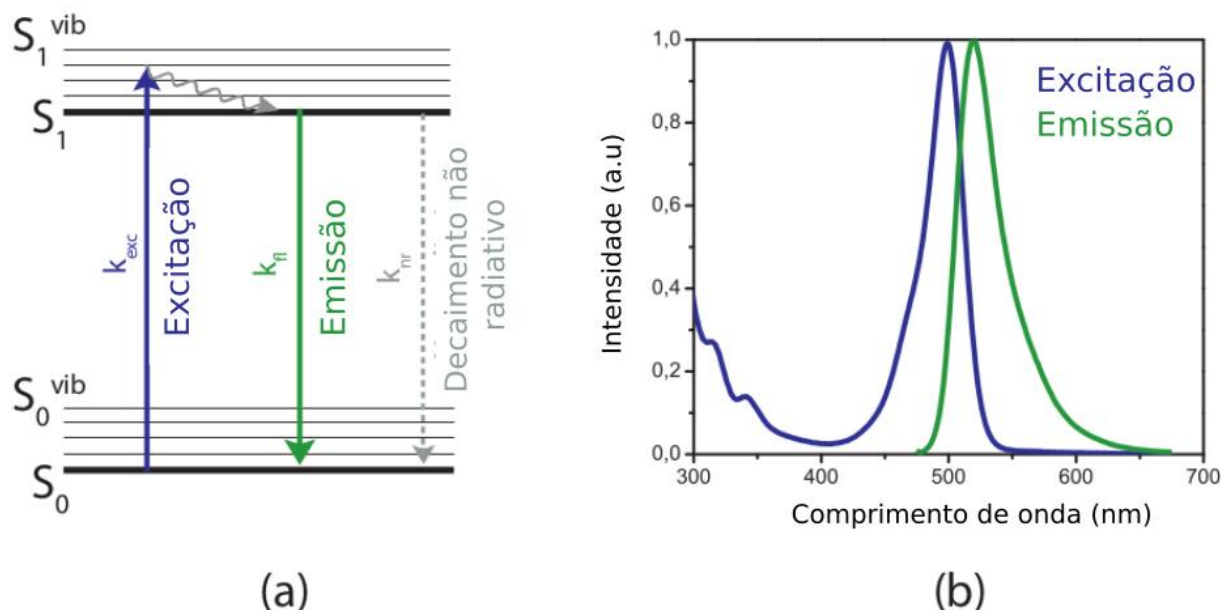


Figura 6 - Modelo de representação de processo de fluorescência. (a) Emissão da fluorescência após o decaimento não radiativo após a molécula atingir o estado excitado (S_1), retornando ao estado estável (S_0). (b) Intensidade máxima dos comprimentos de onda fluorescência durante os processos de excitação e emissão. FONTE: <https://svi.nl/Fluorescence>.

A presença de fluoróforos permitiu o desenvolvimento de análises das propriedades ópticas relacionada à sua estrutura e peso molecular (HELMS et al., 2008). A abordagem geralmente utilizada é a sincronização de matrizes de excitação e emissão: a fusão de leituras do espectro de excitação em função do espectro de emissão em um intervalo de variados comprimentos de onda e vice-versa, ou EEMs (COBLE, 1996; COBLE et al., 1990; STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003) que pode fornecer dados quantitativos e qualitativos de porções quimicamente distintas dos fluoróforos em um determinado composto, e correlacioná-los a DOM de origem (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011). O procedimento possui vantagens sobre os métodos tradicionais (e.g. análise de caracterização isotópica) com um menor custo relativo, além de exigir um menor volume de amostras e uma menor manipulação de procedimentos, evitando a contaminação biológica ou a variabilidade química dos compostos em curto prazo, e consequentemente a alteração dos resultados (BAKER; SPENCER, 2004; COBLE et al., 2014).

A FDOM, apesar de compor 1% do total da DOM (Fig. 7) (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011), predomina em sua composição os ácidos húmicos ou "Gelbstoff" (KALLE, 1949; KIRK, 1976), geralmente um conjunto de moléculas de alto peso molecular, composta por ácidos fúlvicos, divididos em ácidos hidrofílicos e hidrofóbicos (CORY et al., 2007), resultantes da degradação microbiana de restos de plantas e animais que incluem um sub-porção substancial de ácidos graxos e substâncias alifáticas (SCHNITZER E

NEYROUD, 1975), geralmente em um tom de coloração que varia de amarelo para preto, que contribui para 50% do DOC (AITKENHEAD-PETERSON; MCDOWELL; NEFF, 2003).

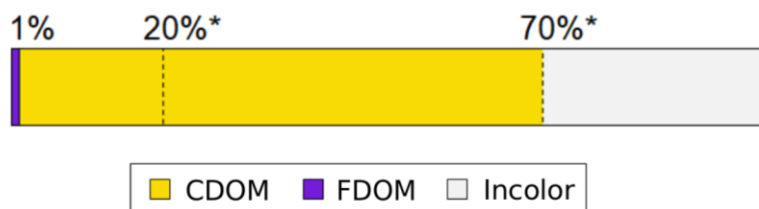


Figura 7 - Escala estimada da contribuição relativa de cada parcela da MOD em relação ao pool total. *CDOM: 20% em oceano aberto e 70% em áreas costeiras (COBLE, 2007; CORY et al., 2011).

A caracterização isolada das moléculas de FDOM ainda é um desafio, pois suas moléculas possuem comportamento espectroscópico semelhante: a mesma intensidade de emissão e excitação em determinado comprimento de onda (COBLE et al., 2014).

Em reação aos comportamentos espectroscópico semelhantes, houve uma padronização entre os grupos de fluoróforos correlacionados com a função orgânica ou pico máximo de intensidade fluorescente, utilizados dessa forma para interpretação manual, denominada seleção de pico (COBLE, 2007; STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003). Tem-se do tipo derivados da tirosina (região de pico B (Ex/Em – 275/305), do tipo derivado de triptofano (região de pico T Ex/Em – 275/340), do tipo derivado de substâncias húmicas (picos A e C, com ex/em 260/400-460 e 320-360/42 respectivamente), do tipo derivados de ácidos fúlvicos (picos D e E 390/509 e 455/521, respectivamente) e do tipo derivado de plânctons (pico N, 280/370) (Tab. 1, Fig. 8).

Tabela 1. Picos de intensidades referenciados e localização das regiões dos componentes das matrizes de excitação-emissão (EEMs) obtidas de substâncias húmicas aquáticas e matéria orgânica dissolvida (DOM) (COBLE et al., 2014).

Pico de intensidade	Excitação máxima (nm)	Emissão máxima (nm)	Descrição da fluorescência
B	275	305	Tipo derivado de tirosina, tipo derivado de proteína
T	275	340	Tipo derivado de triptofano, tipo derivado de proteína
A	260	400-460	Tipo derivado de substâncias húmicas
M	290-310	370-410	Tipo derivado de substâncias húmicas marinhas
C	320-360	420-460	Tipo derivado de substâncias húmicas
D	390	509	Tipo derivado de ácido-fúlvicos
E	455	521	Tipo derivado de ácido-fúlvicos
N	280	370	Tipo derivado de plâncton

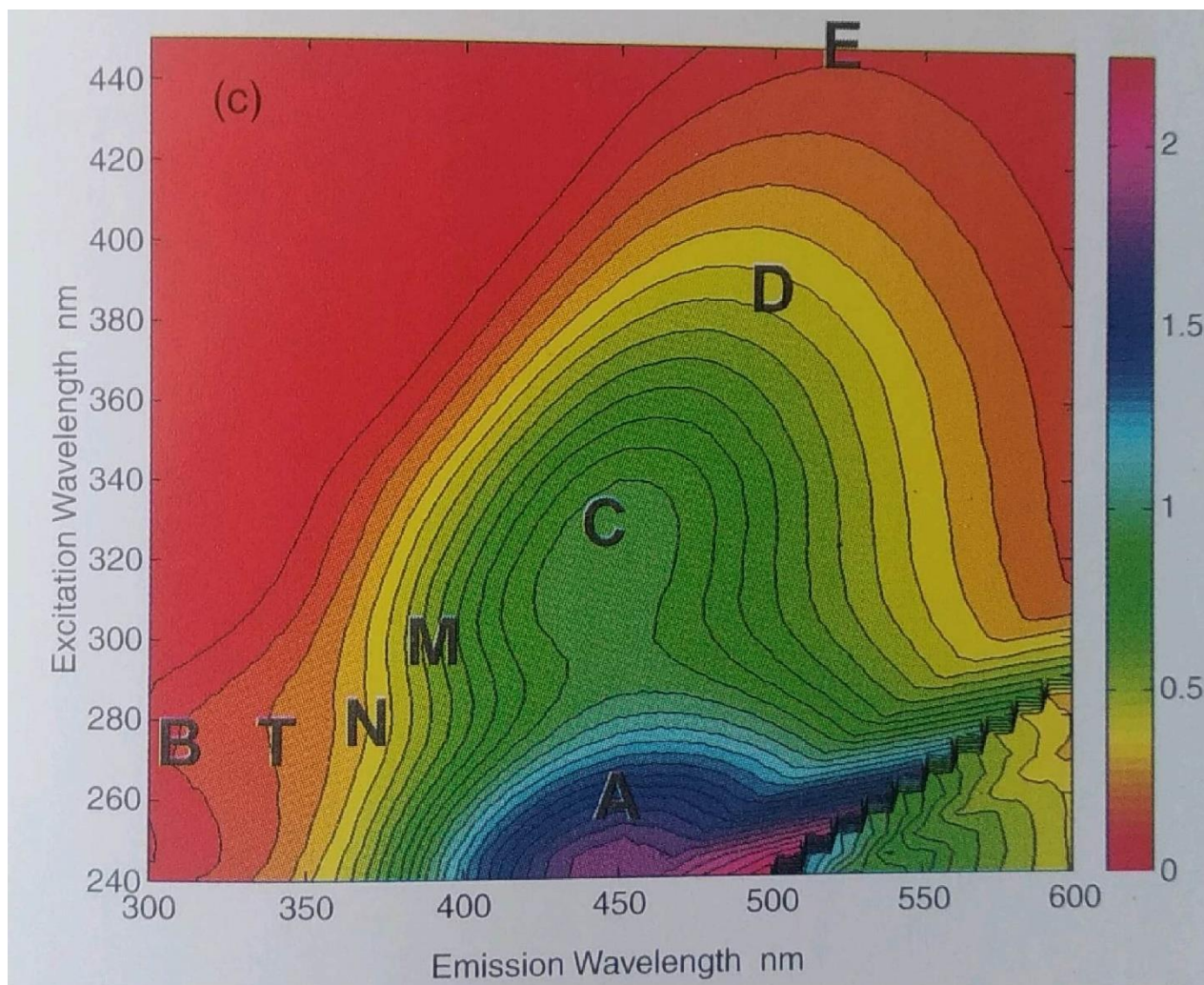


Figura 8 - Amostra de espectro de excitação-emissão, com marcadores de picos intensidades correlacionadas a componentes orgânicos dissolvidos (ver Tab. 1). FONTE: COBLE et al., 2014, pg. 179.

A alta quantidade de dados multidimensionais presente nas matrizes de excitação e emissão (EEMs), resulta muitas vezes em conclusões erroneamente interpretadas. Como alternativa, foi proposto o uso de modelagem estatística de fatores paralelos (PARAFAC) (STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003).

A análise do PARAFAC de um conjunto de dados EEM (Fig. 9) resulta em uma redução de dados tridimensionais complexos em vários espectros bidimensionais, cuja base estrutural é dada pelas matrizes de pesos A (n° das amostras), B (emissão) e C (excitação), que contêm os elementos a_{if} , b_{jf} e ckf , respectivamente, relativos às três dimensões dos dados, relacionados aos componentes matematicamente e quimicamente independentes (um único fluoróforo ou grupo de fluoróforos fortemente co-variáveis, multiplicados por seus espectros de excitação e emissão), descrevendo o EEM total (STEDMON; BRO, 2008), e possibilitando a identificação de padrões no conjunto de dados que, caso contrário, não seria obtido por inspeção visual através da seleção de

pico máximo de fluorescência. PARAFAC pode ser considerado uma generalização da PCA para dados multidimensionais, porém com menos graus de liberdade (usa-se o termo “hard modelling”), pois está sujeito a leis físico-químicas rígidas (ZHOU; GUO; OSBURN, 2015).

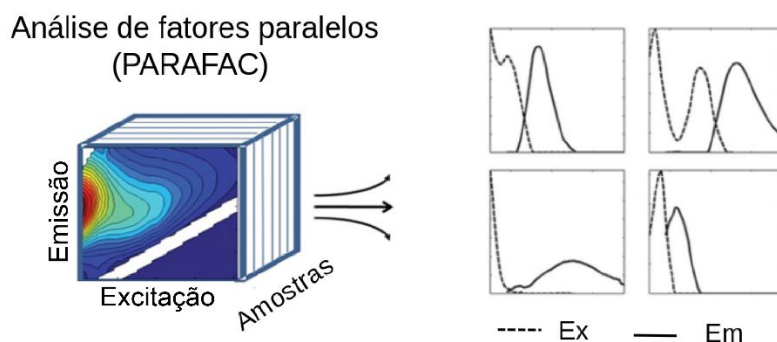


Figura 9 - Representação de um modelamento de análise de fatores paralelos (PARAFAC). Ex – excitação, Em – emissão.

O PARAFAC permite, através de “assinaturas” das EEMs, registrar a dinâmica espaço-temporal na qualidade desses compostos, provocadas pelos efeitos da biodegradação ou fotodegradação. A biodegradação pode ocorrer tanto na fase fótica quanto zona afótica, provocando a perda rápida de material lábil, alifático e de baixo peso molecular (LMW), incluindo, carboidratos, grupos de aminoácidos livres, proteínas e ácidos orgânicos (MOPPER; SCHULTZ, 1993; MORAN; ZEPP, 1997; WETZEL; HATCHER; BIANCHI, 1995), e pode também produzir substâncias aromáticas, de alto peso molecular (HMW), como ácidos fúlvicos e húmicos, através da alteração de compostos existentes e/ou produção de novos compostos por heterótrofos (REPETA et al., 2002; STEPANAUSKAS et al., 2005). A fotodegradação pode alterar a DOM de moléculas maiores (e.g. grupos de substâncias húmicas) para fotoprodutos menores e lábeis, que são, em seguida, removidos do pool DOM por volatilização de gases de carbono ou por rápido consumo microbiano (MOPPER; SCHULTZ, 1993; MORAN; ZEPP, 1997) ou pode transformar lábil compostos para material refratário de alto peso molecular (BENNER; BIDDANDA, 1998; OBERNOSTERER; BENNER, 2004). A eficiência do PARAFAC em resposta à essas mudanças na bacia hidrográfica estão representadas no banco de dados OpenFluor (www.https://openfluor.lablicate.com), com mais de 5631 entradas de inúmeros sistemas aquáticos (Fig. 10), representados desde rios, lagos, oceanos, manguezais, água de descarte etc.

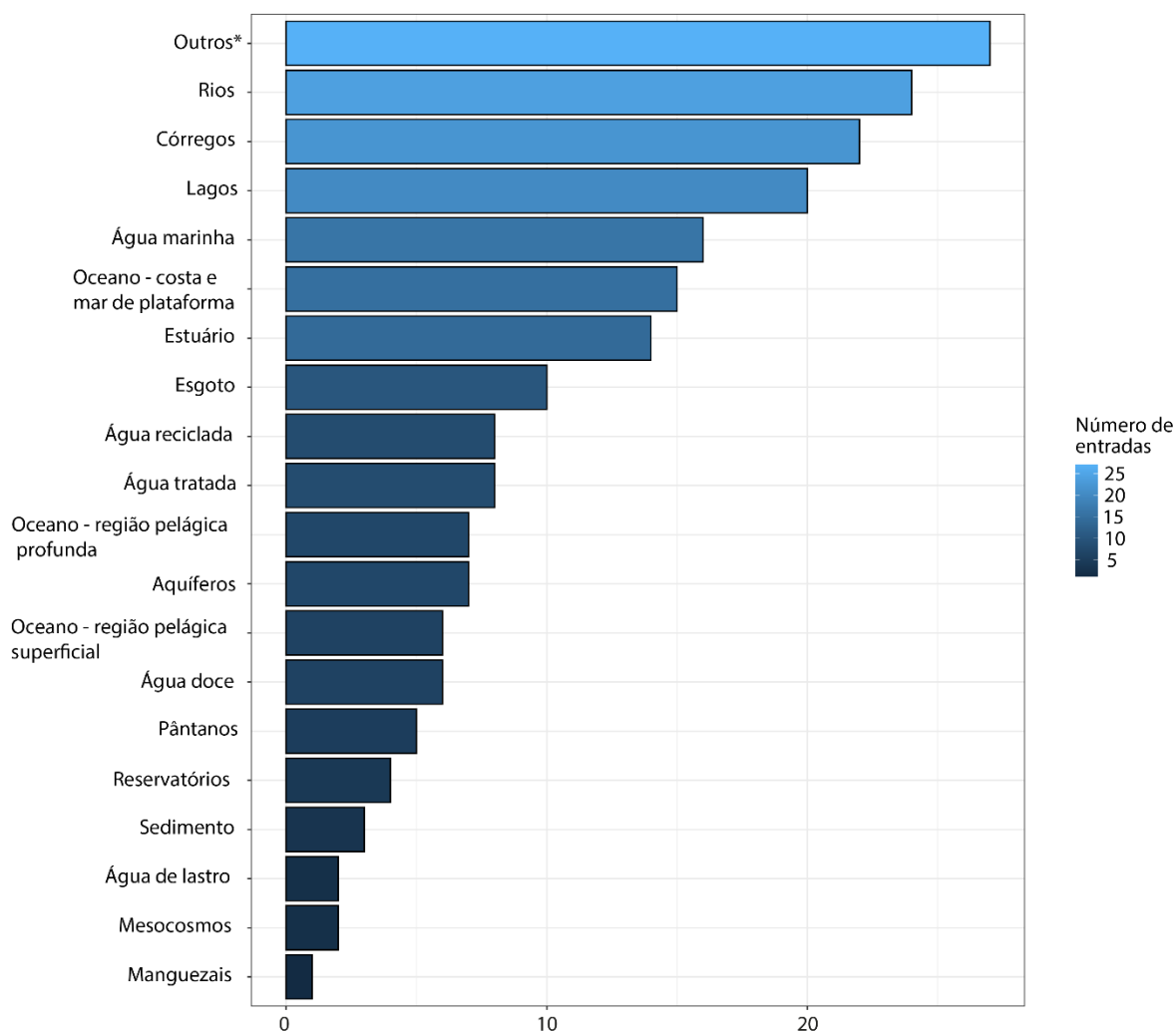


Figura 10 - Dados sobre compostos orgânicos fluorescentes presentes no ambiente, coletados na biblioteca online OpenFluor ([www.https://openfluor.lablicate.com](https://openfluor.lablicate.com)). Outros * - dados de estudos onde a fonte da amostra não foi fornecida (matéria orgânica dissolvida em óleos, sedimentos, solos e algas).

Uma abordagem do estudo das propriedades físico-químicas da FDOM é a análise dos seus índices espectrais ópticos (Tab. 2). O Índice de humificação (HIX) caracteriza o nível de conteúdo húmico presente na DOM (ZSOLNAY et al., 1999) e também possibilita diferenciar fontes de DOM (ácidos fúlvicos e biomassa microbiana) (CHEN et al., 2011; FLECK et al., 2014; OHNO, 2002). O Índice de fluorescência (FI) caracteriza a presença de compostos aromáticos e fluorescentes na DOM (CORY; MCKNIGHT, 2005), permitindo a discriminação entre DOM de origem microbiana ou terrestre. O Índice de frescor (Fr) indica a produção de DOM produzida recentemente (PARLANTI et al., 2000; WILSON; XENOPOULOS, 2009). A razão de declive espectral (Sr) se correlaciona negativamente com o peso molecular e geralmente aumenta na irradiação, indicando maior aromaticidade (HELMS et al., 2008). As razões entre os picos A: T e C: A (por exemplo, A: T r e C: A r) descrevem a quantidade relativa de DOM do tipo derivado de húmico e DOM

de origem fresca, quantidade relativa de DOM do tipo húmico terrestre origem e DOM semelhante a ácidos fúlvicos, respectivamente (BAKER et al., 2008; CORY et al., 2010; HANSEN et al., 2016).

Tabela 2 - Descrição das propriedades ópticas de absorção e fluorescência.

Propriedades ópticas	Cálculo	Descrição	Referência
Índice de frescor (Fr)	A proporção da intensidade de emissão 380 nm dividida pela intensidade máxima de emissão entre 420-435 nm, em excitação 310 nm	Indica a produção de DOM recentemente produzido	PARLANTI et al. (2000); WILSON; XENOPOULOS (2009)
Índice de fluorescência (FI)	A razão dos comprimentos de onda em 470 nm e 520 nm, obtido na excitação 370 nm	Permite a discriminação entre DOM de origem microbiana ou terrestre	MCKNIGHT et al. (2001); CORY et al. (2010)
Índice de humificação (HIX)	A área sob o espectro de em 435-480 nm dividido pela área de pico 300-345 nm + 435-480 nm de em, e ex 254 nm	Um indicador do conteúdo de substância húmica. Valores superiores indicam um grau crescente de humificação	OHNO (2002)
Razão entre os picos A:T (A:T r)	A proporção entre a intensidade do pico A (ex 260 / em 450) e pico T (ex 275 / em 304)	Uma indicação da quantidade de tipo húmico (recalcitrante) e fluorescência de tipo fresco (lábil) em uma amostra	HANSEN et al. (2016)
Razão entre os picos C:A (C:A r)	A razão entre as intensidades do pico C (ex 340 / em 440) e pico A (ex 260 / em 450)	Uma indicação da quantidade de tipo húmico e fluorescente tipo fúlvica	HANSEN et al. (2016)
Razão do declive espectral (Sr)	Declive espectral S275-295 dividida por declive espectral S350-400	Inverso ao peso molecular, indica o aspecto aromático	HELMS et al. (2008)

3. DOM de origem fitoplanctônica

A DOM originada por fitoplâncton, principais produtores primários em ambientes aquáticos, a matéria orgânica algogênica (AOM) em ambientes aquáticos, regula a quantidade e composição do pool de DOM lábil biodisponível, e o fluxo de carbono através de cadeias alimentares (SEYMOUR; AMIN; RAINA; STOCKER, 2017). A biodisponibilidade da fração lábil da DOM favorece, dependendo da concentração, determinados grupos de procariotos como Roseobacter e Flavobacteria (SARMENTO; MORANA; GASOL, 2016), moldando a comunidade procariota, que sustenta zooplâncton, que então sustentam peixes, dessa maneira sustentando as cadeias alimentares, e o fluxo de carbono ascendente, promovido pela respiração desses organismos presentes. O

fluxo de carbono descendente é regulado pelo acúmulo de biomassa de fitoplâncton senescentes não nutridos pela ficosfera, ou aqueles que sofrem lise celular.

A alta concentração de AOM no ambiente também pode impactar na eficiência de filtração em sistemas de tratamento de água, devido à alta coagulação e incrustação de compostos nitrogenados da membrana, além de diminuir a eficácia de produtos desinfetantes (DBPs) clorados (FANG; YANG; MA; SHANG *et al.*, 2010). AOM geralmente é caracterizada pela predominância de polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos (HENDERSON *et al.*, 2008) e toxinas cianobacterianas (HARADA, 2004), conferindo um caráter altamente hidrofílico (PIVOKONSKY; KLOUCEK; PIVOKONSKA, 2006), diferindo da contribuição predominante da matéria orgânica natural (NOM), que consiste de substâncias húmicas (HENDERSON *et al.*, 2008; MYKLESTAD, 1995). Além disso, a composição da AOM depende fortemente da espécie, da sua fase de crescimento, da idade da cultura e das condições da cultura (HENDERSON *et al.*, 2008; PIVOKONSKY; KLOUCEK; PIVOKONSKA, 2006).

AOM pode ser fracionada em matéria orgânica extracelular por produtos metabolizados (EOM)), e matéria orgânica intracelular (IOM), originada de autólise de algas mortas, e compondo 80% do total de AOM (HENDERSON *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012). EOM é amplamente hidrofílica, consistido aproximadamente 33% de proteína e 28% de carboidrato (HENDERSON *et al.*, 2008), enquanto IOM é composta por 82% proteína e 14,5% de carboidratos (HONG *et al.*, 2008), sugerindo uma diferença na composição molecular. A proporção de IOM aumenta com o aumento da idade das algas e fornece uma contribuição significativa para a mistura heterogênea de compostos que se formam dissolvidos matéria orgânica (DOM) em sistemas de algas.

Apesar dos avanços na compreensão sobre a DOM produzida por fitoplâncton, a variedade da EOM com grande diversidade taxonômica e originada em ambientes de água doce foi pobremente estudada (HENDERSON *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; PIVOKONSKY *et al.*, 2014).

Capítulo 2 - Influência do meio de cultivo na interpretação da matéria orgânica dissolvida fluorescente

Resumo

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é uma mistura heterogênea de compostos com diferentes pesos moleculares e reatividade, responsável pela manutenção dos organismos e ciclos biogeoquímicos em ecossistemas aquáticos. Diversas técnicas são utilizadas no estudo da matéria orgânica, mas a caracterização das propriedades ópticas da DOM é vantajosa, pelo baixo custo e rapidez de análise, além de dispor de um robusto banco de dados (OpenFluor) como suporte. No entanto, estudos experimentais que permitem a interpretação de dados ambientais, como por exemplo dados de cultivos axênicos de fitoplâncton, são ainda pouco explorados. Para cultivar esses microrganismos em condições axênicas é utilizado meio de cultivo "Wright's Cryptophyte" (WC), adicionado com peptona e glicose (P+G), entretanto não se sabe se os compostos que compõem essas duas soluções emitem fluorescência que possam comprometer a análise de FDOM em cultivos. O objetivo do estudo foi verificar a presença de FDOM em soluções de WC e P+G, isoladamente, em condições axênicas, e caracterizar as propriedades ópticas da FDOM dos meios de cultivos, para assim viabilizar os estudos de FDOM produzida por fitoplâncton em cultivos axênicos nessas soluções. A hipótese do estudo é que o meio de cultivo WC e a solução de P+G não produzem fluorescência isoladamente, e que ambos são viáveis para estudos de FDOM produzidas por cultivos de fitoplâncton axênicos.

Palavras-chave: Fluorescência, Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), Microalga, Cianobactéria, Peptona e glicose (P+G), Wright Cryptophyte (WC).

Abstract

Dissolved organic matter (DOM) is a heterogeneous mixture of compounds with different molecular weights and reactivity, responsible for the maintenance of organisms and biogeochemical cycles in aquatic ecosystems. Several techniques are used in the study of organic matter, but the characterization of DOM optical properties is advantageous, due to its low cost and speed of analysis, in addition to having a robust database (OpenFluor) as support. However, experimental studies that allow the interpretation of environmental data, such as data from axenic phytoplankton cultures, are still unexplored. To cultivate these microorganisms under axenic conditions, "Wright's Cryptophyte" (WC) culture medium is used, added with peptone and glucose (P + G), however it is not known whether the compounds that make up these culture medium emit fluorescence that could compromise the analysis of FDOM in cultures. The aim of the study was to verify the presence of FDOM in WC and P+G solutions, separately, under axenic conditions, and to characterize the optical properties of FDOM in culture media, in order to enable studies of FDOM produced by phytoplankton in axenic cultures in these solutions. The study hypothesis is that the WC culture medium and the P+G solution do not produce fluorescence isolated, and that both are viable for studies of FDOM produced by axenic phytoplankton cultures.

Keywords: Fluorescence, Parallel Factor Analysis (PARAFAC), Microalgae, Cyanobacteria, Peptone and glucose (P+G), Wright Cryptophyte (WC).

1. Introdução

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é uma mistura heterogênea de compostos aromáticos e alifáticos, com diferentes pesos moleculares e reatividade, a qual sua fração lábil, produzida majoritariamente por fitoplâncton, promove a manutenção das cadeias tróficas e dos ciclos biogeoquímicos associados ao sistema aquático (DUURSMA, 1961; HE et al., 2016; JIAO et al., 2010; LANDOLFI et al., 2013; SEYMOUR et al., 2017). É ubíqua em todos sistemas ecológicos, variando desde sistemas de água doce e salgada em regiões polares (MCKNIGHT; AIKEN; SMITH, 1991; NAIMAN; LINK, 1997).

Inúmeros métodos para análise da DOM já foram desenvolvidos: extração alcalina e ácida (hidrólise) (SWIFT, 1985); Resina XAD-8 em pH 2 (LEENHEER, 1981), permeação de gel, cromatografia, ultrafiltração e centrifugação (AIKEN, 1984; BUFFLE; DELADOEY; HAERDI, 1978); cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para identificar e quantificar ácidos orgânicos de baixo peso molecular individuais (FOX, 2006; FOX; COMERFORD, 1990), e o uso de propriedades ópticas, especificamente absorvância e fluorescência, para caracterização da fração fluorescente da DOM (FDOM) (BAKER et al., 2008; COBLE, 1996; COBLE et al., 1990, 2014).

A caracterização da FDOM, através da técnica de espectrofluorescência, especificamente das análises de “coleta de picos fluorescentes” máximos de excitação e emissão (COBLE et al., 1990), e da análise de fatores paralelos (PARAFAC) das matrizes de excitação e emissão (MURPHY et al., 2013; STEDMON; BRO, 2008), permite discriminar a origem dessa mistura complexa que varia espaço-temporalmente por influência dos processos de biodegradação e fotodegradação (HANSEN et al., 2016). Essa técnica já possui uma grande tendência em estudos de água doce (AMARAL et al., 2016; DE MELO et al., 2020), é menos expensiva e exaustiva que os processos físico-químicos (COBLE et al., 2014), e possui como suporte um robusto banco de dados OpenFluor, com 5631 entradas de diferentes ecossistemas (água marinha, rios, lagos, manguezais e outros, veja <https://openfluor.lablicate.com/of/measurement/statistics>). Entretanto dados com amostras experimentais são escassos e foram pouco explorados (CASTILLO et al., 2010, 2010; HENDERSON et al., 2008; LI et al., 2012; PIVOKONSKY et al., 2014).

O conhecimento da FDOM produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce é raso e pouco abundante, e pode permitir a interpretação desses dados em

ambientes naturais (CORY et al., 2010; CORY; MCKNIGHT, 2005). Além disso, a DOM varia de acordo com a fase de crescimento do fitoplâncton, alterando-se a predominância da produção de proteínas para carboidratos e lipídeos durante a transição da fase exponencial para estacionária e senescente (MYKLESTAD, 2000). Como a FDOM representa 1% da DOM (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011), sua composição também está relacionada a idade do cultivo.

O cultivo axênico de fitoplâncton exige reagentes que assegurem o crescimento populacional, e evitem a contaminação provocada por bactérias. Uma das alternativas é o meio de cultivo WC, que compõe uma mistura de todos os nutrientes para crescimento (GUILLARD; LORENZEN, 1972), e adição de peptona e glicose (P+G), que garante o estado axênico (ANDERSEN, 2005; BAGATINI et al., 2014). Entretanto, a probabilidade de fluorescência provocada por essa mistura ainda não é conhecida.

O objetivo do estudo foi verificar a presença de FDOM nos reagentes WC e P+G, isoladamente, em condições axênicas, e então caracterizar as propriedades ópticas da FDOM. Foi hipotetizado que os reagentes WC e P+G não produzem fluorescência isoladamente, e que ambos são viáveis para estudos de FDOM produzidos por cultivos de fitoplâncton axênicos.

2. Material e Métodos

2.1. Local de experimento e design de estudo

Cultivos axênicos de 67 espécies de fitoplâncton axênicas foram selecionados aleatoriamente e fornecidos da Coleção de Cultivos de Microalgas de Água Doce (CCMA-UFSCAR) pela curadora do banco profa. Inessa Lacativa Bagatinni, e pelo Ms. Rodrigo Ventura de Mello. A quantidade de réplicas por grupo filogenético não foi equivalente (Material Suplementar, Tabela 1). Esse passo foi realizado entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020 (Material Suplementar, tab. 1).

Foi adicionado meio de cultivo "Wright's Cryptophyte" (WC) pH 7 (GUILLARD; LORENZEN, 1972) em 125 amostras, e em 37 foi adicionado apenas 250 mg L⁻¹ de solução de peptona e glicose (P+G). Uma solução mista de WC e P+G foi adicionada nas 22 amostras restantes, enquanto em oito cultivos o reagente não foi identificado. Todas as amostras foram inoculadas em tubos de teste com tampa de rosca e incubadas a 23 ± 2 °C e 50-150 μmol de fótons m⁻² s⁻¹ com presença/ausência alternada de 12h de luz. Além disso, foram selecionados frascos individuais e isolados de meio de cultivo "Wright's Cryptophyte" (WC) pH 7, reagente peptona e glicose (P+G), e cada um dos reagentes de WC: silicato de sódio (Na₂SiO₃); bicarbonato de sódio (NaHCO₃); cloreto de cálcio (CaCl₂);

nitrato de sódio (NaNO_3); sulfato de magnésio (MgSO_4); fosfato dipotássico (K_2HPO_4); vitaminas, e micronutrientes (GUILLARD; LORENZEN, 1972). 15 μL de cada reagente isolado foi inoculado em tubos de teste com tampa de rosca com 15 mL de água miliQ, previamente descontaminados com lavagem exaustiva de miliQ. A informação taxonômica mais baixa possível das culturas foi disponibilizada pelo Laboratório de Ficologia – UFSCAR/São Carlos. A identificação à nível de espécie não foi possível em algumas culturas.

2.2. Amostragem e Matéria Orgânica Dissolvida

A DOM produzida e exsudada pelas diferentes cepas de fitoplâncton foi coletada centrifugando as culturas e mantendo o sobrenadante, transferido para frascos âmbar de 50 ml e filtrado através de uma seringa BD® de 10 ml, com porta-filtro de fibra de vidro GF / F (~ 0,7 μm) Macherey-Negel®. Os frascos foram armazenados em geladeira a 4° C por até 3 dias. Frascos, filtros e seringas foram submetidos a processos de descontaminação de matéria orgânica, sendo os dois primeiros previamente abafados a 450°C por 4h, e o último previamente imerso em HCl a 10%, e posteriormente lavado exaustivamente com água MiliQ.

2.3. Espectroscopia de fluorescência

Cinco ml de amostra foi inserida diretamente em uma cuveta de quartzo de 6 ml, com 1 cm de largura, previamente descontaminada (previamente imerso em HCl 10% e depois imerso em água miliQ por pelo menos 1h). A DOM presente nos meios de cultivos e seus reagentes foi coletada. Água miliQ fresca, P+G, WC e todos os seus reagentes individualizados foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Para a leitura das matrizes de excitação e emissão (EEM), foram definidas faixas de comprimentos de onda (λ) de excitação (Ex) de 240-450 nanômetros (nm) em intervalos de 5 nm, e ondas de emissão (Em) entre 360 e 560 nm, em intervalos de 2 nm e tempo de varredura de 0,25 s / λ (NIETO-CID; ÁLVAREZ-SALGADO; PÉREZ, 2006). A (i) qualidade da lâmpada do equipamento e (ii) a ausência de resíduos orgânicos foram verificados com: (i) o pico de luz Raman entre 365-465 nm (λ Ex / Em = 365/465 nm, em intervalos de 1 nm, e tempo de varredura de 0,5 s / λ), e (ii) unidade de absorvância (a.u) <1,4, em λ Ex / Em = 270-430 nm, entre intervalos de 1 nm, com tempo de varredura de 0,1 s / λ), respectivamente. A correção de filtro interno (IFE) foi realizada subtraindo os picos de fluorescência da dispersão Raman (LARSSON; WEDBORG; TURNER, 2007). Todos esses procedimentos foram realizados em um espectrofluorômetro FS5 Edinburgh em uma sala escura, a uma temperatura constante de 20°C.

2.4. Análise e processamento de dados

2.4.1. Montagem das EEM e picos máximos fluorescente de Ex/Em

As EEM da miliQ, do meio de cultivo WC, da solução P+G, e cada um dos reagentes de WC individualizados, foram plotados através do software SigmaPlot® (SYSTAT SOFTWARE INC., 2013). Os valores máximos de excitação e emissão das EEMs foram verificados.

2.4.2. Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

Análise de Fator Paralela (PARAFAC) foi utilizada para reduzir a EEM, em componentes fluorescentes independentes, através do pacote DOMFluor no programa MATLAB (Mathworks) (Stedmon e Bro, 2008). Para esta modelagem, os componentes Ex / Em foram delimitados entre λ Ex / Em 250-500 / 300-600 nm, e o espalhamento Raman foi excluído das EEMs.

O banco de dados Openfluor ([www.https://openfluor.lablicate.com](https://openfluor.lablicate.com)) foi utilizado para importar os componentes modelados e relacionar com componentes previamente modelados e registrados nesse banco.

2.4.3. Análises estatísticas

Testes t não pareados e pareados foram usados para verificar a variação significativa entre diferentes grupos de cultivos, adicionados com solução P+G e meio de cultivo WC, respectivamente, e entre réplicas de diferentes reagentes e mesmo reagente. A normalidade dos dados foi verificada com teste de Shapiro-Wilk e os outliers removidos usando o método do desvio estudentizado extremo (ESD) (alfa padrão = 0.05). Todas as análises foram realizadas com o programa R (R CORE TEAM, 2020).

3. Resultados

3.1. EEM e picos máximos fluorescente de Ex/Em

Os reagentes P+G, WC e silicato de sódio (Na_2SiO_3) produziram fluorescência máxima nos valores de $5\text{e}+15$, $1.6\text{e}+13$ e $1.04\text{e}+13$, respectivamente (Fig. 1). Os valores máximos de fluorescência de (i) WC, (ii) P+G e (iii) Na_2SiO_3 foram de (i) $1.09\text{e}+13$, (ii) $9.9\text{e}+13$ e (iii) $1.04\text{e}+13$ observado nos Ex/Em de (i) 265/304, (ii) 260/322 e (iii) 302/314.

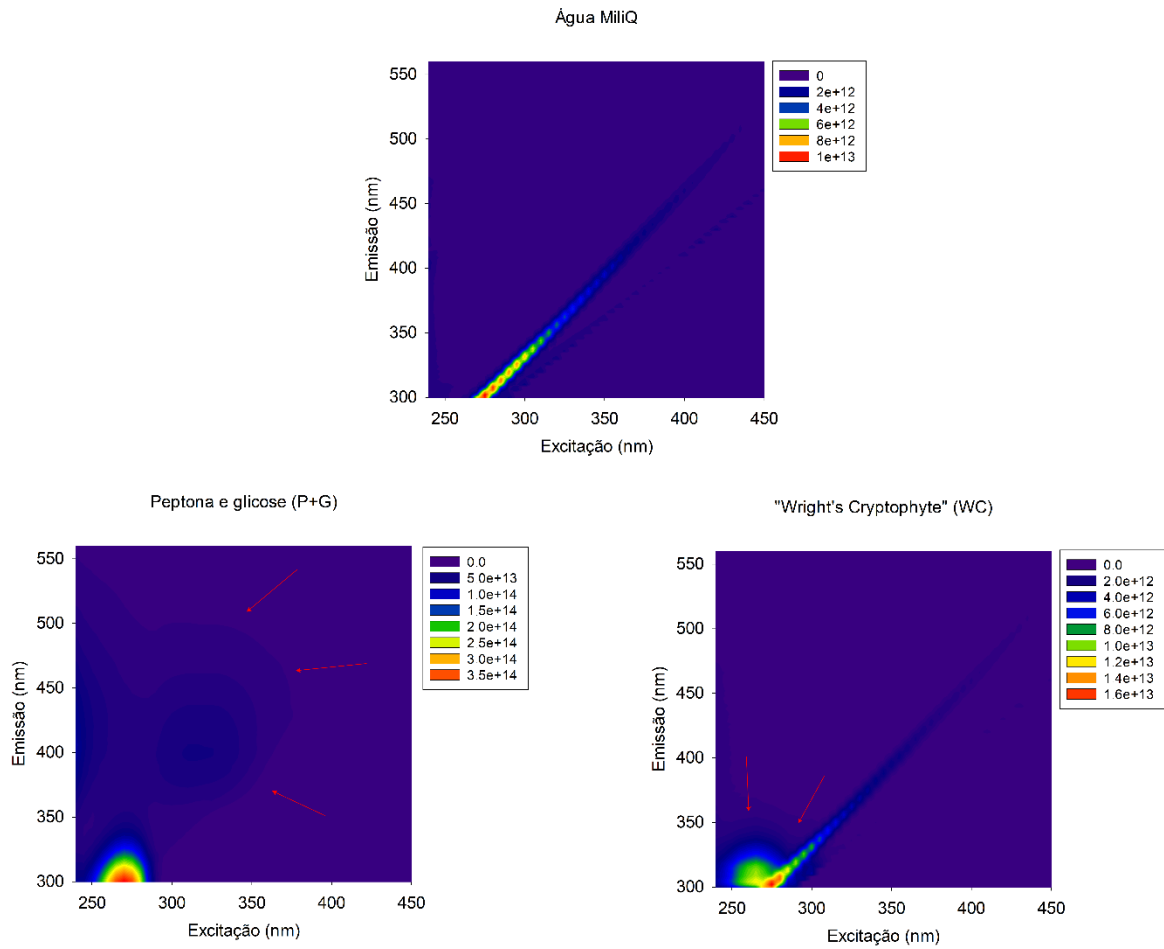


Figura 1 - Matrizes de excitação/emissão da água miliQ e dos meios de cultivo WC e P+G.

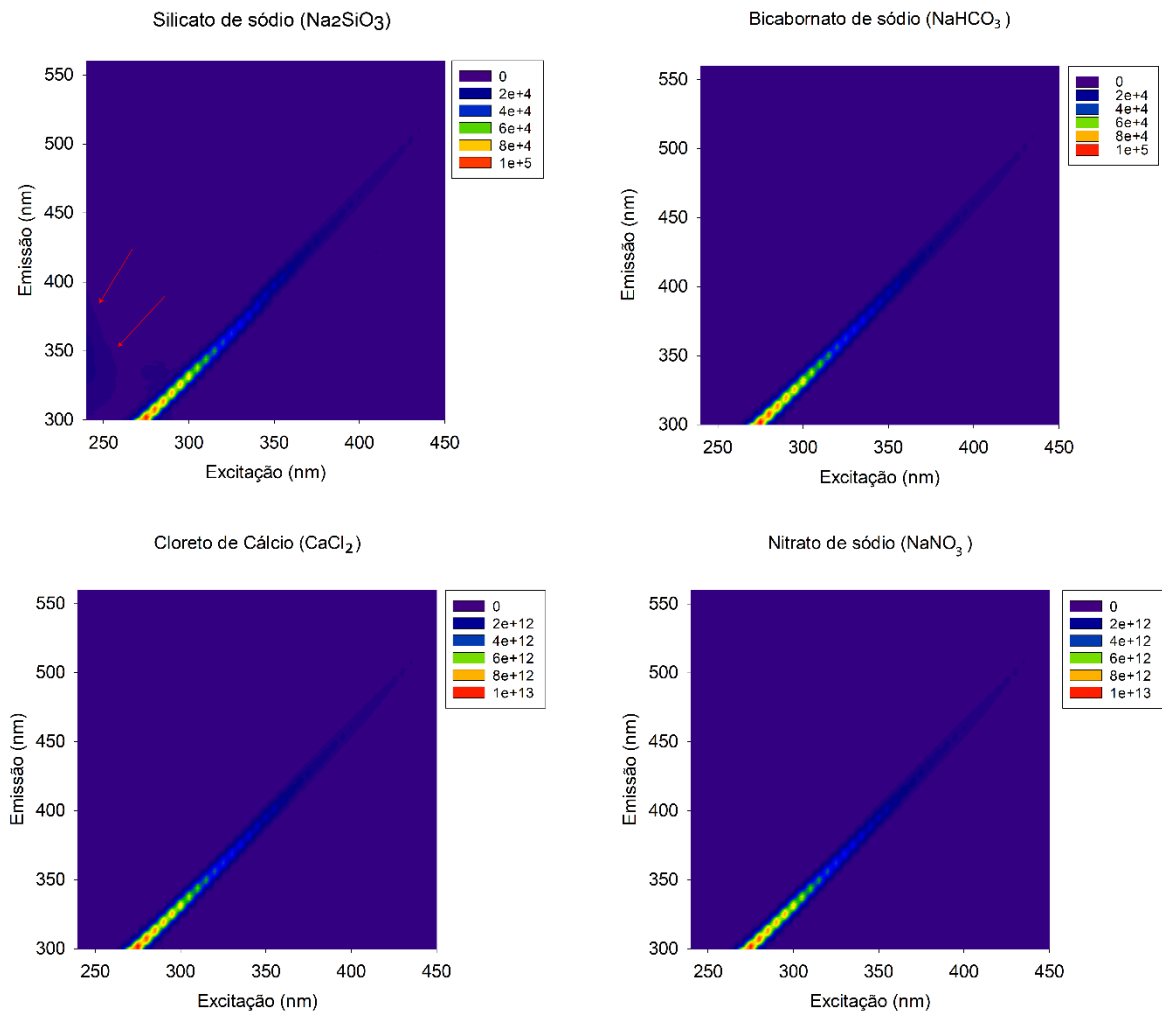


Figura 2 - Matrizes de excitação/emissão dos reagentes do meio de cultivo WC: silicato de sódio (Na_2SiO_3), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de cálcio (CaCl_2) e nitrato de sódio (NaNO_3).

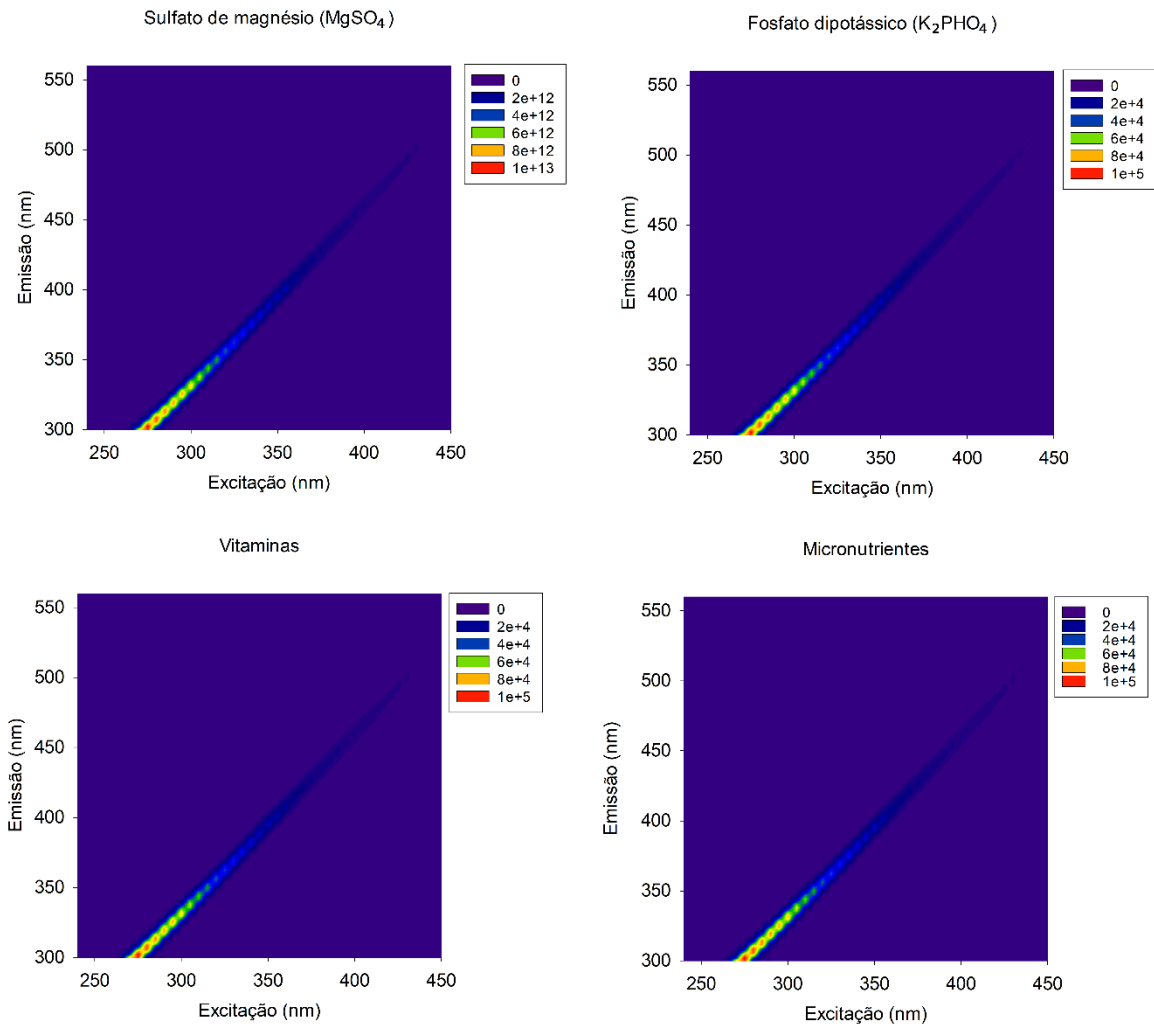


Figura 3 - Matrizes de excitação/emissão dos reagentes do meio de cultivo WC: sulfato de magnésio ($MgSO_4$), fosfato dipotássico (K_2HPO_4), nitrato de sódio ($NaNO_3$), vitaminas e micronutrientes.

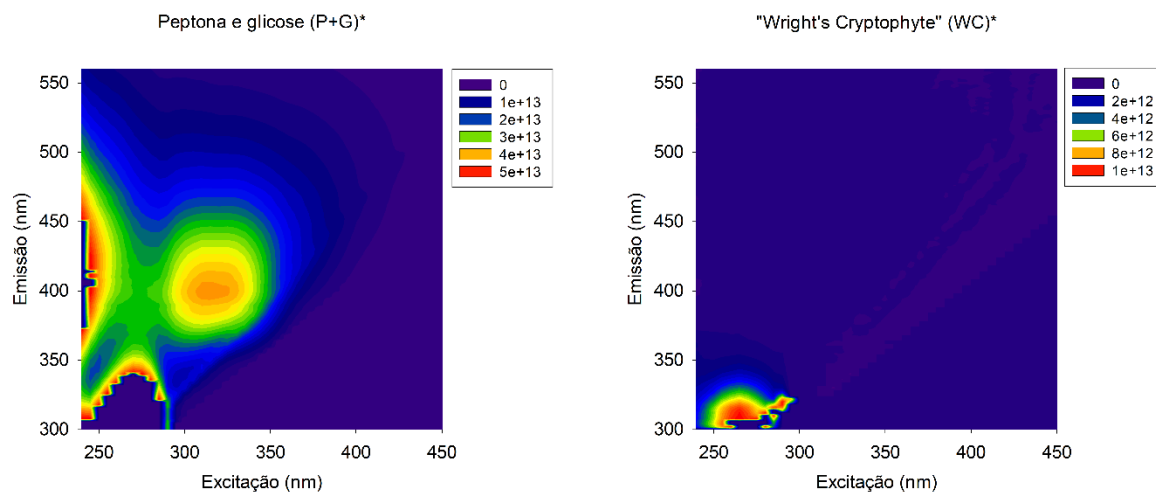


Figura 4 - Matrizes de excitação/emissão dos meios de cultivo WC e P+G, com a dispersão de Raman retirada.

3.2. Caracterização da FDOM

O PARAFAC selecionou um modelo de quatro componentes. A contribuição relativa de cada réplica foi recalculada com a soma dos componentes dividida pelo valor total da contribuição individual. No entanto, o Componente 4 (C4) foi descartado porque tinha um pico Ex / Em máximo próximo aos valores do controle do meio de cultura WC (Ex / Em WC = 265/304 nm, Ex / Em C3 = 275/302 nm) (Fig. 2, Tab. 2), então a contribuição relativa de cada réplica foi recalculada com a soma dos três componentes restantes dividida pelo valor total da contribuição individual.

Os componentes 1 (C1) e 3 (C3) foram modelados com picos Ex / Em máximos de 245(350) /468 e 300/404 nm, respectivamente, e ambos categorizados como compostos de origem alóctone e tipo derivado de substâncias húmicas de origem terrestre, mas C1 com alto peso molecular e sem processamento microbiano, e C3 como composto de baixo peso molecular (compostos fúlvicos), processados por atividade microbiana.

O componente 2 (C2) foi identificado como um pico com Ex / Em máximo 280/348 nm, e categorizado como um composto do tipo derivado de proteínas e do aminoácido triptofano, com atividade microbiana presente e de origem autóctone (Fig. 2, Tab. 2). Além disso, C2 foi o composto mais abundante nos exsudados, presente em mais de 50% das amostras, seguido por C3 e C1.

Tabela 1 - Características dos componentes derivados do modelo PARAFAC, em comparação com estudos anteriores. * Todos os componentes corresponderam a > 98% sem teste de similaridade de cluster (TCC), sem banco de dados OpenFluor (<https://openfluor.lablicate.com>).

Componente	Excitação máxima (nm)	Emissão máxima (nm)	Coble (1996)*	Descrição	Componentes Similares*
1	245(350)	468	A+C	Componente categorizado como composto do tipo derivado de substâncias húmicas (alto peso molecular) terrestres, não processadas por atividade microbiana. Origem alóctone.	HARJUNG et al., 2019; MURPHY et al., 2011; SHUTOVA et al., 2014
2	280	348	T	Componente categorizado como composto do tipo derivado de proteínas e ao aminoácido triptofano, com presença de atividade microbiana recente. Origem autóctone.	CAWLEY et al., 2012a; DERRIEN; SHIN; HUR, 2019b; LAMBERT et al., 2017
3	300	404	A+M	Componente categorizado como composto do tipo derivado de substâncias húmicas de origem terrestre, de baixo peso molecular (compostos fúlvicos), processados por atividade microbiana.	CHEN et al., 2018; KULKARNI et al., 2018; WÜNSCH et al., 2018
4	275	302	B	Componente categorizado como composto do tipo derivado de proteínas, e ao aminoácido aromático tirosina. Sua fluorescência é indicadora da presença de frações lábeis e semi-lábeis em ambientes aquáticos (aminoácidos hidrolisáveis). Origem autóctone.	CHEN et al., 2018; YAMASHITA et al., 2011; YAMASHITA; BOYER; JAFFÉ, 2013

3.3. Contribuição da FDOM entre diferentes grupos taxonômicos

Foi observada diferença significativa no teste t não pareado na contribuição de C2 e C3 entre as cepas adicionadas com diferentes soluções (P+G e WC) (C2 $p = 2.175e^{-11}$, C3 $p < 2.2e^{-16}$, $n_{PG} = 35$ e $n_{WC} = 119$. As amostras 72,78,121,122,124 e 125 foram consideradas resíduos e foram removidas). Não foi observada diferença significativa no teste t não pareado na contribuição de C1 ($p = 0.8101$, $n_{PG} = 35$ e $n_{WC} = 125$).

Foi observada diferença significativa no teste t não pareado na contribuição de C1, C2 e C3 entre grupos distintos de réplicas adicionadas com diferentes soluções (P+G e WC), isoladamente ($p = 9.12e^{-07}$, $n = 23$). O teste t pareado não apresentou diferença significativa ($p = 0.712$, $n = 23$).

Não houve diferença significativa nos testes pareados e não pareados entre as mesmas réplicas no reagente P+G e no meio de cultivo WC (P+G teste t não pareado $p = 0.3699$, P+G teste t pareado $p = 0.1604$, $n = 8$; WC teste t não pareado $p = 0.3587$, teste pareado $p = 0.3406$, $n = 33$, respectivamente. *Ankistrodesmus flexuosus* foi considerado resíduo e foi removido).

4. Discussão

A similaridade dos comprimentos de onda de excitação e emissão com maior intensidade fluorescente entre WC e C4 ($\lambda_{Ex/Em}$ 275/302 e 265/304, respectivamente), indicam que essa fluorescência pode ser produzida pelo único dos reagentes que apresentou a presença de emissão, silicato de sódio (Na_2SiO_3). A menor intensidade fluorescente observada no WC em relação ao silicato de sódio pode ser explicada pelo

efeito de dissolução (HE et al., 2016). Para produzir o meio de WC, é adicionado 1L para cada reagente adicionado (GUILLARD; LORENZEN, 1972), resultando em 8L, volume bem maior do que o volume de solvente testado. Além disso, observa-se que os picos produzidos no meio de cultivo WC podem ser identificados e retirados, viabilizando o uso dessa mistura para futuros experimentos para interpretação da FDOM produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce.

A maior intensidade de fluorescência do meio de cultivo de P+G em relação aos outros compostos analisados pode ser explicada pela peptona. Já foi observada emissão de fluorescência por meio de cultivos isolados de peptona (GEORGIA; POE, 1932). Além disso a absorbância e pico de Raman da glicose já foi descrita como baixa (LEWIS; JOHNSON, 1978; YOSHINAGA; ISO; ISOBE, 2017), e que sejam necessários biomarcadores para a sua detecção em técnicas relacionadas a propriedades ópticas (STEINER; DUERKOP; WOLFBEIS, 2011), sugerindo que a peptona produza a maior intensidade fluorescente.

A diferença significativa dos componentes C2 e C3 entre os grupos distintos de réplicas adicionadas com diferentes reagentes (P+G e WC) pode ser causada pela diferença de idade dos cultivos. Espera-se que a produção de proteínas predomine na fase de crescimento exponencial, enquanto na fase estacionária o conteúdo proteico deve diminuir enquanto os carboidratos e lipídeos aumentam (MYKLESTAD, 2000). A composição química das algas é frequentemente diferente para diferentes classes e espécies e varia acentuadamente em função das condições de crescimento e é particularmente sensível à limitação de nutrientes (MYKLESTAD, 1974).

5. Conclusão

Conclui-se que o meio de cultivo WC, a solução de P+G, e o reagente de WC silicato de sódio produzem fluorescência, o que pode influenciar as matrizes fluorescência em estudos de cultivo axênico de fitoplâncton de água doce, portanto, é necessário cautela durante a interpretação de resultados. No entanto os picos produzidos no meio de cultivo WC são de baixa intensidade e bem localizados, os quais não inviabiliza a análise.

Capítulo 3 – Caracterização da matéria orgânica dissolvida produzida por cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce

Resumo

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é uma mistura heterogênea de moléculas com diferentes pesos moleculares e reatividade que variam espaço-temporalmente entre os ecossistemas aquáticos, e é um elemento chave dos ciclos biogeoquímicos. O fitoplâncton é o principal produtor de DOM lábil, regulando a quantidade e composição de pools de DOM biodisponíveis que suportam o crescimento bacteriano e o fluxo de carbono através das teias alimentares, se destacando como uma fração importante, mas pouco explorada dentro do pool de DOM. O estudo das propriedades ópticas do DOM fluorescente (FDOM) é um método rápido e barato que fornece informações sobre a origem e reatividade do DOM. Aqui, caracterizamos o DOM produzido pelo fitoplâncton usando espectrometria de fluorescência e análise de fatores paralelos (PARAFAC) em 123 amostras de 45 espécies diferentes de fitoplâncton de água doce cultivadas em culturas axênicas. Nossa hipótese é que espécies relacionadas produziram compostos semelhantes, e isso poderia ser detectado por assinaturas FDOM. Conseguimos identificar três componentes de fluoróforos que foram validados de forma cruzada usando o banco de dados OpenFluor. O componente predominante foi caracterizado como autóctone de origem proteica, e os outros dois componentes foram identificados como terrestre não processado (origem alóctone) e processado por atividade microbiana, respectivamente. Os índices de frescor e humificação variaram de acordo com o estágio de crescimento da cultura, indicando que a degradação pode ocorrer na ausência de bactérias heterotróficas ou radiação UV, mas provavelmente devido à oxidação. Além de fornecer um banco de dados sólido da FDOM produzida pelo fitoplâncton de água doce, mostramos que a composição da FDOM é extremamente variável entre as espécies, em culturas replicadas da mesma espécie e ao longo do estágio de crescimento da cultura. Portanto, a FDOM produzida pelo fitoplâncton de água doce detectada por métodos ópticos não parece relacionada à estrutura filogenética do fitoplâncton.

Palavras-chave: Matéria orgânica dissolvida fluorescente (FDOM), análise de fator paralelo (PARAFAC), fitoplâncton de água doce

Abstract

The dissolved organic matter (DOM) is a heterogeneous mixture of molecules with different weights and reactivity that vary spatio-temporally across aquatic ecosystems, and is a key element of biogeochemical cycles. Phytoplankton is the major producer of labile DOM, regulating the quantity and composition of bioavailable DOM pools that support bacterial growth and the carbon flow through food webs, standing up as an important, but poorly explored fraction within DOM pool. The study of the optical properties of the fluorescent DOM (FDOM) is a rapid and unexpensive method that provides information about the DOM origin and reactivity. Here, we characterized the DOM produced by phytoplankton using fluorescence spectrometry and parallel factor analysis (PARAFAC) in 123 samples from 45 different species of freshwater phytoplankton grown in axenic cultures. We hypothesized that related species would produce similar compounds, and this could be detected by FDOM signatures. We were able to identify three fluorophore components that were cross-validated using the OpenFluor database. The predominant component was characterized as autochthonous of protein origin, and the other two components were identified as non-processed terrestrial (allochthonous origin) and processed by microbial activity, respectively. The freshness and humification indexes varied according to the culture's growth stage, indicating that degradation can occur under the absence of heterotrophic bacteria or UV radiation, but probably due to chemical oxidation. Besides providing a solid database of FDOM produced by freshwater phytoplankton, we show that the FDOM composition is extremely variable among species, within replicated cultures of the same species, and across culture growth stage. Therefore, the FDOM produced by freshwater phytoplankton detected by optical methods does not seem related to phytoplankton phylogenetic structure.

Keywords: Fluorescent Dissolved Organic Matter, Parallel Factor Analysis (PARAFAC), freshwater phytoplankton

1.Introdução

A matéria orgânica dissolvida (DOM) é uma mistura de proteínas, carboidratos, ácidos húmicos e fúlvicos com diferentes pesos moleculares e reatividade, e um elemento chave nos processos biogeoquímicos (HE et al., 2016; JERRY A. LEENHEER; CROUÉ, 2003). A disponibilidade dessa mistura como principal substrato e fonte de energia para bactérias heterotróficas molda a composição da comunidade bacteriana, sendo responsável pelo grande sumidouro do reservatório aquático de DOM (AZAM et al., 1983; GUILLEMETTE; MCCALLISTER; DEL GIORGIO, 2013; SARMENTO; MORANA; GASOL, 2016; TRANVIK, 1993). As bactérias não apenas degradam, mas também produzem DOM durante o crescimento e morte celular (KAWASAKI; BENNER, 2006), influenciando a disponibilidade, composição e ciclo bioquímico de C na biosfera (BATTIN et al., 2008; OSTERHOLZ et al., 2016). Além disso, a troca mutualística entre matéria orgânica dissolvida lábil, produzida pelo fitoplâncton e de rápido consumo de origem bacteriana na fitosfera, desempenha um papel importante na manutenção das cadeias alimentares aquáticas (GUILLEMETTE; MCCALLISTER; DEL GIORGIO, 2013; SARMENTO; GASOL, 2012; SEYMOUR et al., 2017).

Métodos tradicionais de estudo de DOM, como análise de caracterização isotópica e ressonância magnética nuclear (NMR) são caros e demorados (COBLE et al., 2014). O estudo de propriedades ópticas, como absorvância e fluorescência, por meio da "coleta de picos" (COBLE et al., 1990), somado à análise de fatores paralelos (PARAFAC) de matrizes de excitação-emissão fluorescentes (EEM) (BRO, 1997; MURPHY et al., 2013), tornou-se uma ferramenta poderosa para rastrear e caracterizar o DOM no espaço e no tempo de acordo com sua origem, qualificando as frações coloridas da matéria orgânica dissolvida (CDOM). É uma técnica sensível, não destrutiva e de baixo custo que requer um menor volume de amostras e procedimentos (BAKER; SPENCER, 2004; COBLE, 1996; COBLE et al., 2014). Há um aumento expressivo no uso de propriedades ópticas em sistemas ecológicos de água doce, o que ilustra a eficiência desta ferramenta (AMARAL et al., 2016; DE MELO et al., 2020).

A CDOM é intrínseca nos ciclos biogeoquímicos. Por exemplo, em altas concentrações, CDOM filtra a taxa de luz ultravioleta sobre a região superficial da água, evitando altas radiações e preservando o material genético do fitoplâncton, mas compete pela absorção de luz azul na mesma região do espectro da clorofila a, reduzindo a produção primária em ecossistemas onde a luz é limitante (ARRIGO; BROWN, 1996; BRICAUD; MOREL; PRIEUR, 1981; CARDER et al., 1991; KIRK, 1994). Além disso, a CDOM desempenha um

papel no equilíbrio analítico cátion-ânion do meio ambiente, resultando em tamponamento do pH, além de formar complexos que podem ser benéficos ao fitoplâncton quando os metais presentes no meio atingem concentrações tóxicas na especiação do metal, eliminando-os via atividade de microalgas (MIDORIKAWA; TANOUE, 1998). A fração fluorescente da CDOM (FDOM) fornece informações sobre dois grandes grupos de substâncias: aquelas derivadas de substâncias húmicas, ou aquelas com uma alta concentração de compostos N, geralmente aminoácidos livres ou proteínas, sendo este último geralmente uma assinatura da presença de matéria orgânica lábil (COBLE, 1996).

Fitoplâncton, o maior produtor primário na maioria dos ambientes aquáticos (ROUSSEAU; GREGG, 2013), disponibiliza DOM por meio da autólise de células mortas, exsudação de compostos metabolizados, e sofrendo ataques virais e pastoreio (LI et al., 2012; MYKLESTAD, 2000), além do impacto de substâncias liberadas pela proliferação de algas sobre as comunidades aquáticas (SEYMOUR et al., 2017). Divergências entre estudos de campo e experimentais sobre a contribuição de substâncias exsudadas pelo fitoplâncton para o CDOM foram relatadas (CARDER et al., 1989; NELSON; SIEGEL; MICHAELS, 1998; ROCHELLE-NEWALL; FISHER, 2002; SERITTI et al., 1994; TWARDOWSKI; DONAGHAY, 2001). Mais recentemente, foi demonstrado que culturas axênicas do fitoplâncton marinho produzem substâncias fluorescentes do tipo húmico (pico M) e do tipo proteína (pico T) (CASTILLO et al., 2010). No entanto, a contribuição e a complexidade dos compostos exsudados por espécies de fitoplâncton de água doce são mal caracterizadas e não representadas no OpenFluor (a biblioteca espectral online de autofluorescência por compostos orgânicos no ambiente).

O objetivo deste estudo foi caracterizar as propriedades ópticas da FDOM produzida por diferentes espécies de fitoplâncton de água doce, cultivadas em condições axênicas e fornecer as primeiras assinaturas de referência de DOM autóctone lábil em ecossistemas de água doce. Esperançosamente, esperamos que o estudo contribua para a interpretação dos resultados obtidos em amostras ambientais. Nossa hipótese é que espécies de fitoplâncton relacionadas produziriam compostos semelhantes e que poderiam ser detectadas por meio de assinaturas de fluorescência.

2. Material e Métodos

2.1. Local de experimento e design de estudo

Culturas axênicas de 45 espécies de fitoplâncton de água doce foram selecionadas aleatoriamente (ver Material Suplementar, Tab. 2) e fornecidos da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar (CCMA-UFSCar) pela curadora do banco profa.

Inessa Lacativa Bagatinni, e pelo Ms. Rodrigo Ventura de Mello. 96 cepas foram coletadas e cultivadas a cada quatro meses e 27 em menos de trinta dias. A quantidade de réplicas por grupo filogenético não foi equivalente (ver Material Suplementar, Tab. 2). Essa etapa foi realizada entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020.

As culturas foram inoculadas em tubos de ensaio com tampa de rosca e meio de cultura "Wright's Cryptophyte" (WC) pH 7 (GUILLARD; LORENZEN, 1972) e incubadas a 23 ± 2 °C e 50-150 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com fotoper\u00edodo 12: 12h luz / escuro. Al\u00e9m disso, a condi\u00e7\u00e3o ax\u00eanica das culturas foi verificada com observa\u00e7\u00e3o de crescimento microbiano ap\u00f3s adi\u00e7\u00e3o de 250 mg L⁻¹ de peptona e glicose (P + G).

A identifica\u00e7\u00e3o em n\u00edvel de esp\u00e9cie n\u00e3o foi poss\u00edvel em algumas culturas (ver Material Suplementar). Essas culturas foram identificadas na classifica\u00e7\u00e3o filogen\u00e9tica mais baixa poss\u00edvel.

2.2. Amostragem e mat\u00e9ria org\u00e2nica dissolvida

A DOM produzida e exsudada pelas diferentes cepas fitoplanct\u00f4nicas foi coletada centrifugando as culturas e mantendo o sobrenadante, transferido para frascos \u00e2mbar de 50 ml e filtrado em seringa BD® de 10 ml, com porta-filtro de fibra de vidro GF / F (~0.7 μm) Macherey-Negel®. Os frascos foram armazenados em geladeira a 4° C por at\u00e9 3 dias. Frascos, filtros e seringas foram submetidos a processos de descontamina\u00e7\u00e3o de mat\u00e9ria org\u00e2nica, sendo os dois primeiros previamente muflados a 450°C por 4h, e o \u00faltimo previamente imerso em HCl a 10%, e posteriormente lavado exaustivamente com \u00e1gua MiliQ.

2.3. Espectroscopia de fluoresc\u00eancia

Cinco ml de cultivo filtrado foi colocado em uma cubeta de quartzo de 6 ml, com comprimento de 1 cm, previamente descontaminada (previamente imersa em HCl a 10% e depois imersa em \u00e1gua miliQ por pelo menos 1h). \u00c1gua miliQ fresca e meio de cultivo WC filtrado tamb\u00e9m foram submetidos aos mesmos procedimentos.

Para a leitura das matrizes de excita\u00e7\u00e3o e emiss\u00e3o (EEM), foram definidos intervalos de comprimentos de onda (λ) de excita\u00e7\u00e3o (Ex) de 240-450 nan\u00f4metros (nm) em intervalos de 5 nm, e emiss\u00e3o (Em) entre 360 e 560 nm, em intervalos de 2 nm e tempo de varredura de 0,25 s / λ (NIETO-CID; \u00c1LVAREZ-SALGADO; P\u00c9REZ, 2006). A (i) qualidade da l\u00e2mpada do equipamento e (ii) a aus\u00eancia de res\u00edduos org\u00e2nicos foram verificados com: (i) o pico de luz Raman entre 396-396 nm (λ Ex / Em = 365/465 nm, em intervalos de 1 nm, e tempo de varredura de 0,5 s / λ), e (ii) unidade de absorv\u00eancia (au)

$<1,4$, em λ Ex / Em = 270-430 nm, entre intervalos de 1 nm, com tempo de varredura de 0,1 s / λ), respectivamente.

A correção do filtro interno (IFE) foi realizada subtraindo a intensidade de fluorescência da dispersão Raman (LARSSON; WEDBORG; TURNER, 2007). Todos esses procedimentos foram realizados em um espectrofluorômetro FS5 Edinburgh em uma sala escura, a uma temperatura constante de 20°C.

2.4. Análise e processamento de dados

2.4.1. Índices ópticos e seleção de pico

A quantidade de conteúdo húmico do DOM ou Índice de humificação (HIX) foi medido relacionando a intensidade de pico de λ Em 434-480 (em unidades Raman; RU), dividido pela intensidade de pico de λ Em 300-344 nm, a λ Ex = 255 nm (ZSOLNAY et al., 1999).

Este índice é usado para diferenciar fontes de DOM (ácidos fúlvicos e biomassa microbiana) (CHEN et al., 2011; FLECK et al., 2014; OHNO, 2002). O Índice de Fluorescência (FI) foi calculado como a razão da intensidade de emissão de fluorescência de 470 nm e 520 nm, obtida em um comprimento de onda Ex de 370 nm (CORY; MCKNIGHT, 2005). Este índice permite a discriminação entre DOM de origem microbiana ou terrestre. O Índice de frescor (Fr) foi calculado como a razão da intensidade de λ Em 380 nm dividido pela intensidade máxima de Em entre λ Em 420-435 nm e λ Ex 310 nm, para indicar a produção de DOM recém-produzido (PARLANTI et al., 2000; WILSON; XENOPOULOS, 2009).

Além disso, foram calculadas as razões entre os picos de seleção (por exemplo, picos A, C e T) e a razão do declive espectral (Sr). As razões entre os picos A: T e C: A (por exemplo, A: T r e C: A r) foram usadas para descrever a quantidade relativa de DOM derivado de húmico e DOM de origem fresca, quantidade relativa de DOM de origem húmica terrestre e DOM semelhante a ácidos fúlvicos, respectivamente (BAKER et al., 2008; CORY et al., 2010; HANSEN et al., 2016), e a razão do declive espectral (Sr) foi calculada como o declive 275–295 dividido pelo declive 350–400 (HELMS et al., 2008), que se correlaciona negativamente com o peso molecular e geralmente aumenta durante a irradiação. Os índices HIX, FI, Fr, A: C r, C: A r e Sr foram calculados a partir dos dados EEM no software MATLAB.

2.4.2. Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

Uma Análise de fatores paralelos (PARAFAC) foi utilizada para reduzir o EEM, em componentes fluorescentes independentes, através do pacote DOMFluor no programa MATLAB (Mathworks) (Stedmon e Bro, 2008). Para esta modelagem, os componentes Ex

/ Em foram delimitados entre λ Ex / Em 250-500 / 300-600 nm, e o espalhamento Raman foi excluído das EMMs.

O banco de dados Openfluor (www.https://openfluor.lablicate.com) foi utilizado para importar os componentes modelados e relacionar com componentes previamente modelados e registrados nesse banco.

2.4.3. Análises estatísticas

Testes t não pareados e pareados foram usados para comparar índices fluorescentes (A: T r; C: A r; Sr; HIX; FI e Fr) e a contribuição relativa dos componentes entre famílias, gêneros, espécies e repetições distintas. A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk e os outliers removidos pelo método do desvio estudentizado extremo (ESD) (alfa padrão = 0.05). Além disso, a variação significativa de ambos os testes t também foi entre as amostras categorizadas como fase exponencial (período de incubação ≤ 7 dias) e fase estacionária / senescente (período de incubação > 7 dias). Todas as análises foram realizadas usando o programa R (R CORE TEAM, 2020).

3. Resultados

3.1. Índices ópticos e seleção de pico

Foram coletadas 123 culturas individuais, incluindo 14 famílias, 30 gêneros e 45 espécies (ver Material Suplementar). Observamos diferenças em todos os índices espectrais usados no estudo em nível de família e gênero.

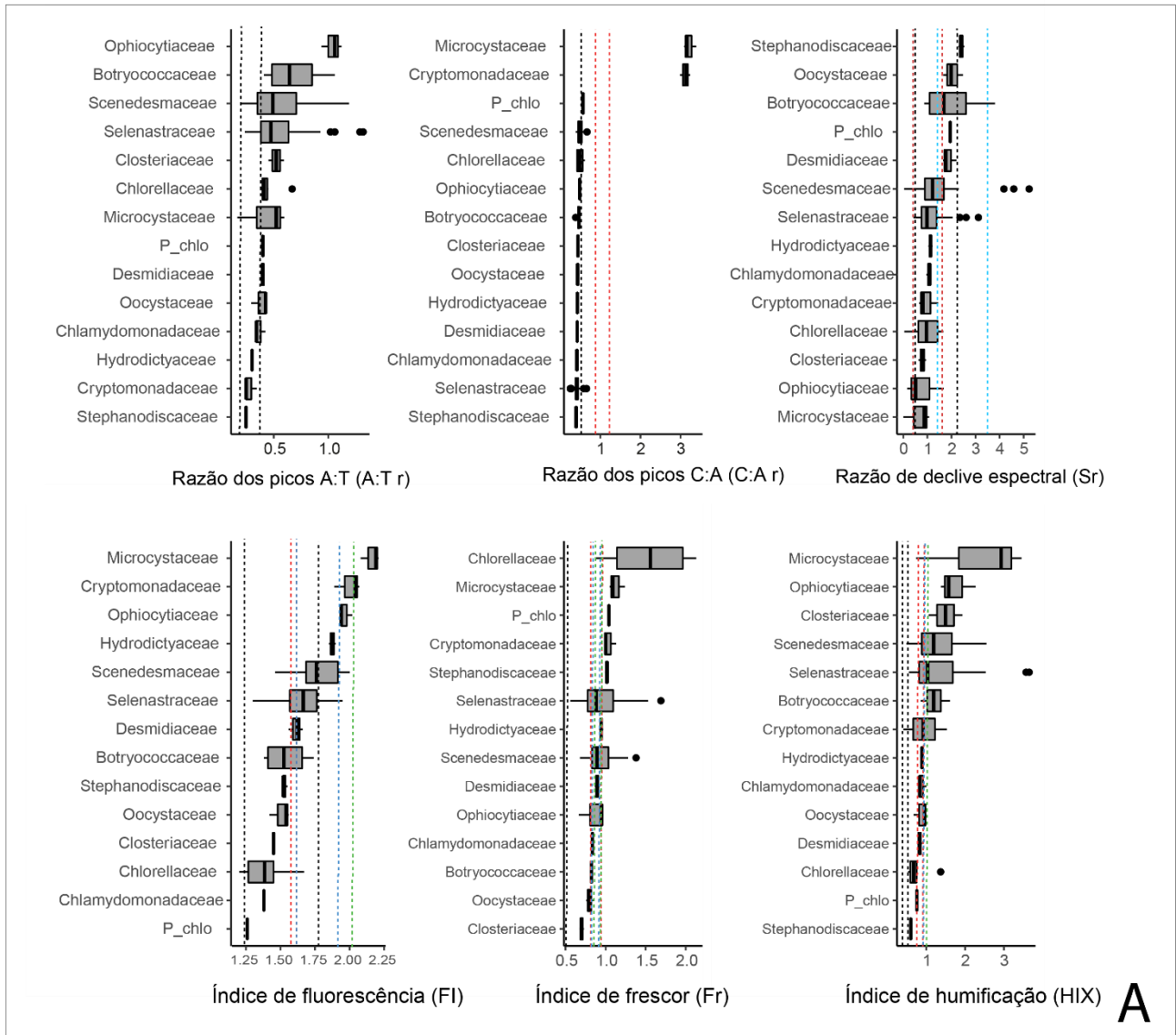
Um alto valor médio de A: T r (0.53) foi observado em nossas amostras em comparação com outros estudos sobre plantas e algas da literatura (tab. 1, fig. 1). A maioria das famílias e gêneros selecionados apresentaram valores superiores aos da literatura, com exceção dos gêneros *Cyclotella*, *Cryptomonas*, *Hariotina* e *Pediastrum*. O valor médio de C: A r foi mais próximo dos valores relatados do solo (0.6) do que amostras de plantas e algas (0.9 – 1.1), com exceção de *Cryptomonas* e *Microcystis* (Tab. 1, Fig. 1). Nossos valores de Sr se aproximaram daqueles observados em lagos e pântanos, na faixa de 0.70-2.40, exceto para *Botryococcus* e *Desmodesmus*, que tiveram valores de Sr mais altos atingindo números típicos de águas marinhas (Tab. 1, Fig. 1).

O valor médio de FI foi semelhante ao relatado na literatura para águas naturais (1.2 – 1.8), mas *Cryptomonas*, *Microcystis* e *Ophiocytium* apresentaram valores superiores que correspondem à matéria orgânica biodegradada (Tab. 1, Fig. 1). A Fr média aproximou-se da observada em estudos com algas e plantas (0.9), mas muitos representantes de *Chlorellaceae*, *Microcystaceae*, *Selenastraceae* e *Scenedesmaceae* apresentaram valores superiores. Em relação ao HIX, a média foi superior aos valores típicos

observados para algas e plantas biodegradadas (0.9-1.1) e solo (1.0), com amostras dos gêneros *Microcystis* e *Monoraphidium* atingindo valores até 3 (Tab. 1, Fig. 1).

Tabela 1 - Descrição, revisão bibliográfica e dados das propriedades ópticas de absorvância e fluorescência utilizadas no estudo. * As linhas tracejadas representam as escalas observadas na Figura 1.

Razão A:T	Descreve a quantidade relativa de DOM do tipo húmico e DOM do tipo fresco, com valores mais altos indicando uma proporção maior de material degradado	0.53 ± 0.26	Plantas e algas (HANSEN et al., 2016)	Águas naturais (HANSEN et al., 2016)	Solo (HANSEN et al., 2016)
			0.3	4.5	6.6 - 11.4
Razão C:A	Uma indicação da quantidade de fluorescência do tipo húmico e do tipo fúlvico	0.57 ± 0.58	Solo (HANSEN et al., 2016)	Extrato de plantas e algas (HANSEN et al., 2016)	
			0.6	0.9 - 1.1	
Razão de declive spectral (Sr)	Sr tem sido associada a mudanças no peso molecular DOM e fotodegradação, com razões de declive mais acentuadas refletindo maiores quantidades de compostos de baixo peso molecular	1.3 ± 0.84	Lagos (ZHANG et al., 2009)	Pântanos (HELMS et al., 2008, 2013)	Oceanos (STUBBINS et al., 2012)
			0.70 - 2.40	0.76 - 1.79	1.6 - 3.4
Índice de fluorescência (FI)	FI tem sido usado para distinguir DOM derivado de tipo de fontes terrestres e tipo de fontes microbianas	1.6 ± 0.2	Águas naturais (CORY et al., 2010; JAFFÉ et al., 2008; WILSON; XENOPOULOS, 2009)	Extrato de solo (HANSEN et al., 2016)	Extrato de plantas e algas (HANSEN et al., 2016)
			1.2 - 1.8	1.6	1.6 - 1.9
					> 2.0 (after microbial processing)
Índice de frescor (Fr)	Fr está associado à contribuição de DOM produzida recentemente	0.9 ± 0.2	Solo (HANSEN et al., 2016)	Plantas/ algas (HANSEN et al., 2016)	Águas drenadas de arrozais (FLECK et al., 2014)
			0.5	0.7 - 0.9/ 0.7 - 0.8	0.8 - 0.9
Índice de Humificação (HIX)	HIX é um indicador de origem e diagênese. Este indicador é baseado na ideia de que conforme a humificação de DOM continua, a proporção de hidrogênio para carbono diminui	1.2 ± 0.6	Extrato de plantas e algas (após biodegradação) (HANSEN et al., 2016)	Águas naturais (HANSEN et al., 2016)	Solo (HANSEN et al., 2016)
			0.2 - 0.4 (0.8 - 0.9)	< 0.9	1.0



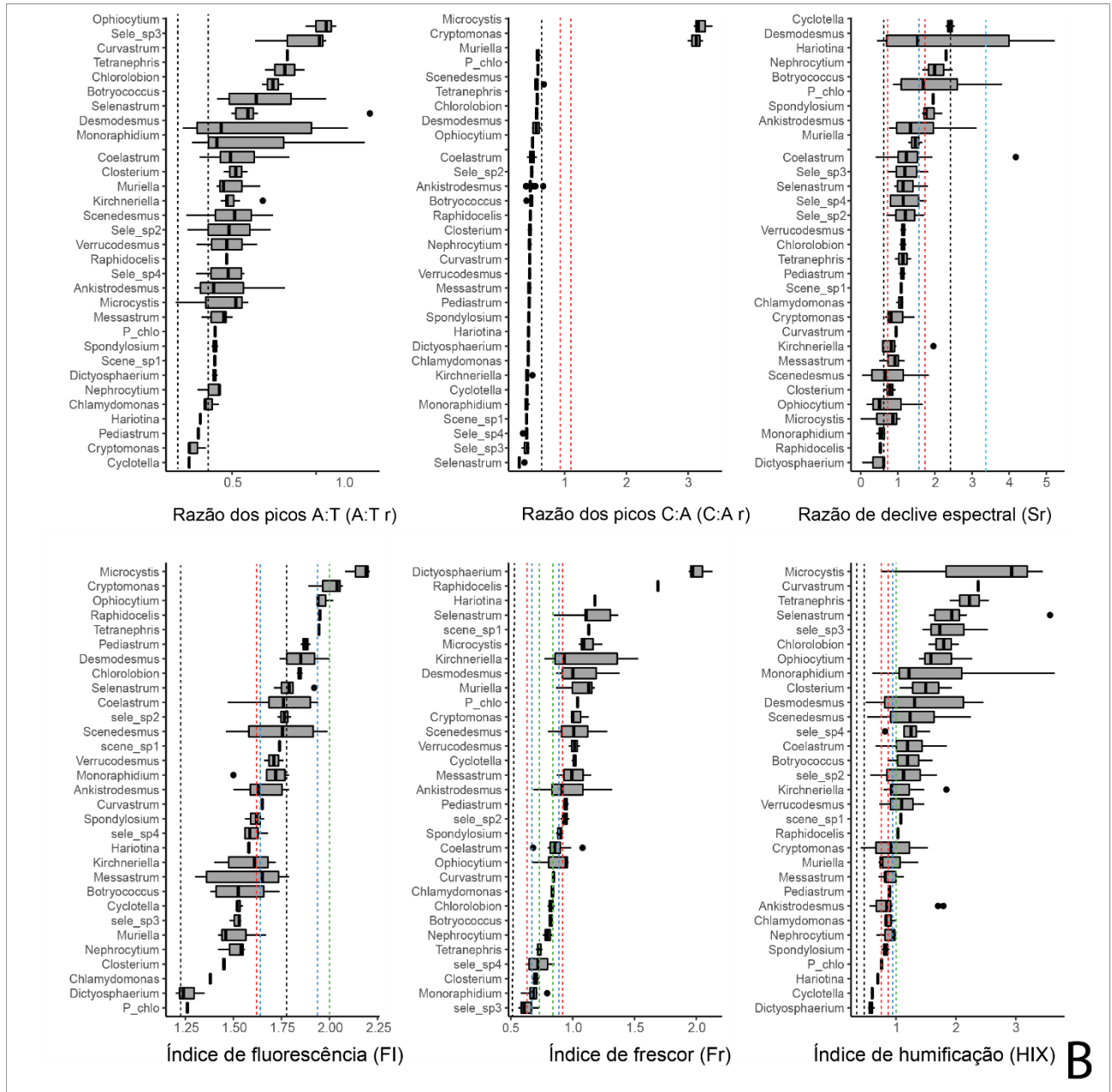


Figura 1 - Boxplots dos índices espectrais observados neste estudo, agrupados por família (A), e agrupados por gênero (B). Linha central do retângulo = mediana; extremidade superior e inferior das linhas pós-retângulo = valores máximo e mínimo observados; e círculos = outliers. As linhas tracejadas representam os índices espectrais relatados na literatura (ver na tabela 1 para mais detalhes).

3.2. Caracterização da FDOM

O PARAFAC selecionou um modelo de quatro componentes. A contribuição relativa de cada réplica foi recalculada com a soma dos componentes dividida pelo valor total da contribuição individual. No entanto, o Componente 3 (C3) foi descartado porque tinha um pico Ex / Em máximo próximo aos valores do controle do meio de cultura WC (Ex / Em WC = 275/302 nm, Ex / Em C3 = 275/304 nm) (Fig. 2, Tab. 2), então a contribuição relativa de cada réplica foi recalculada com a soma dos três componentes restantes dividida pelo valor total da contribuição individual.

Os componentes 1 (C1) e 4 (C4) foram modelados com picos Ex / Em máximos de 350 (466/245) e 295/404 nm, respectivamente, e ambos categorizados como compostos de origem alóctone e derivados de substâncias húmicas de origem terrestre, mas C1 com alto peso molecular e sem processamento microbiano, e C4 com baixo peso molecular e presença de processamento microbiano (Fig. 2, Tab. 2). O componente 2 (C2) foi identificado como um pico com Ex / Em máximo 280/350 nm, e categorizado como um composto derivado de proteínas e do aminoácido triptofano, com atividade microbiana presente e de origem autóctone (Fig. 2, Tab. 2) Além disso, C2 foi o composto mais abundante nos exsudatos, presente em mais de 30% das amostras, seguido por C4 e C1 (fig. 3).

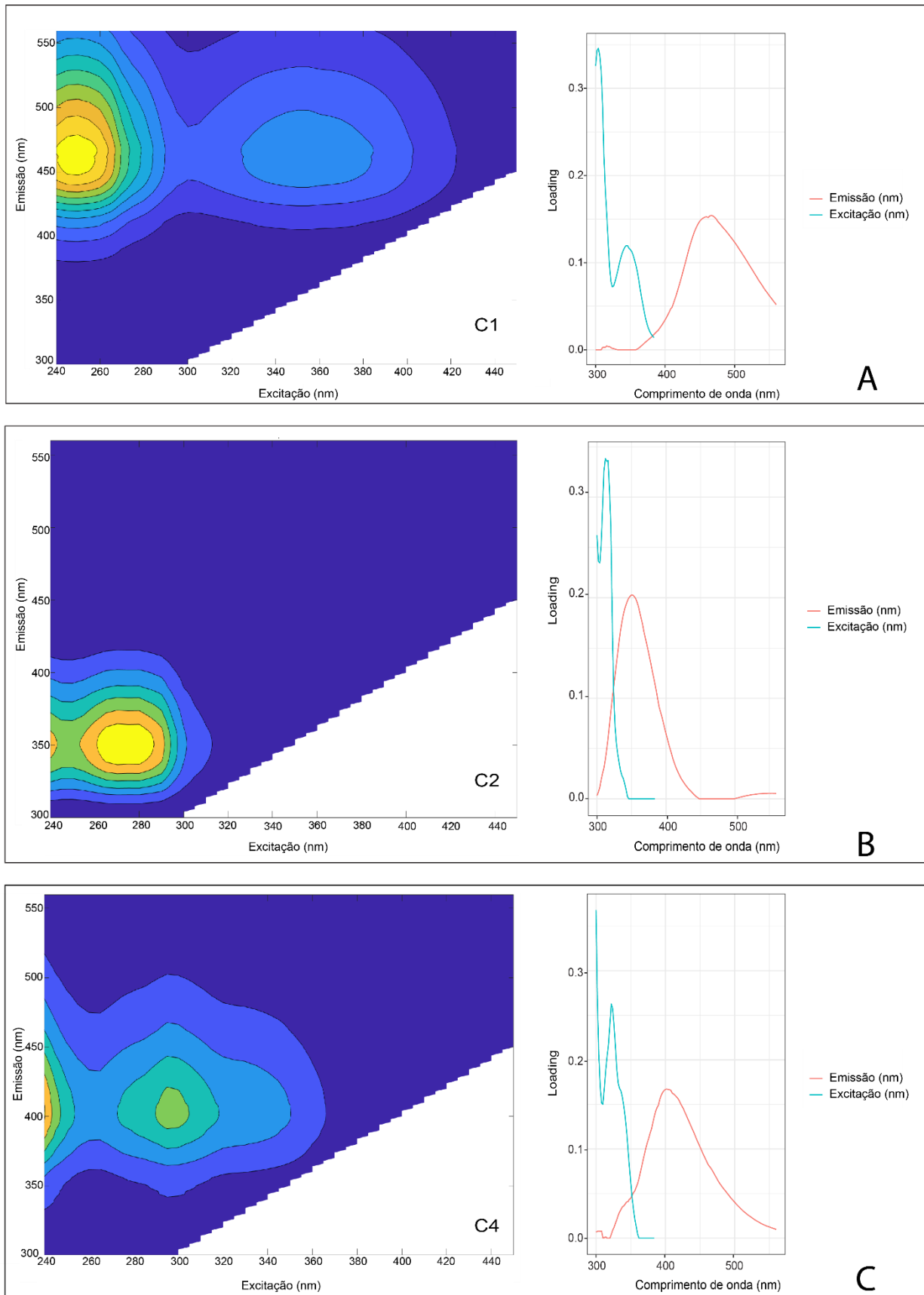


Figura 2 - Espectros de excitação-emissão do modelo de quatro componentes (A: Componente 1 (C1), B: Componente 2 (C2), C: Componente 4 (C4)) obtido no PARAFAC. O componente três (C3) foi descartado por ser semelhante ao controle do meio de cultura, com pico máximo de Ex / Em = 275/304.

Tabela 2 - Características dos quatro componentes derivados do modelo PARAFAC, em comparação com estudos anteriores. * Todos os componentes corresponderam a > 97% no teste de similaridade de cluster (TCC), obtido no banco de dados OpenFluor (<https://openfluor.lablicate.com>).

Componente	Excitação máxima (nm)	Emissão máxima (nm)	COBLE (1996)	Descrição	Componentes similares*
1	245(350)	466	A+C	Componente categorizado como composto derivado de substâncias húmicas (alto peso molecular) terrestres, não processado por atividade microbiana. Origem alóctone.	(CATALÁN et al., 2021; HARJUNG et al., 2019; TOMCO et al., 2019)
2	280	350	T	Componente categorizado como composto derivado de proteínas e do aminoácido triptofano, com presença de atividade microbiana recente. Origem autóctone	(CAWLEY et al., 2012a, 2012b; LAMBERT et al., 2017)
3	275	304	B	Componente derivado de proteínas e o aminoácido aromático tirosina. É um indicador da presença de frações lábeis e semilábeis em ambientes aquáticos (aminoácidos hidrolisáveis). Origem autóctone.	(GAO; GUÉGUEN, 2018; KIDA et al., 2019; YAMASHITA et al., 2011)
4	295	404	A+M	Componente categorizado como composto derivado de substâncias húmicas de origem terrestre, de baixo peso molecular (compostos fúlvicos), processado por atividade microbiana. Origem alóctone.	(BORISOVER et al., 2009; WÜNSCH; MURPHY; STEDMON, 2017)

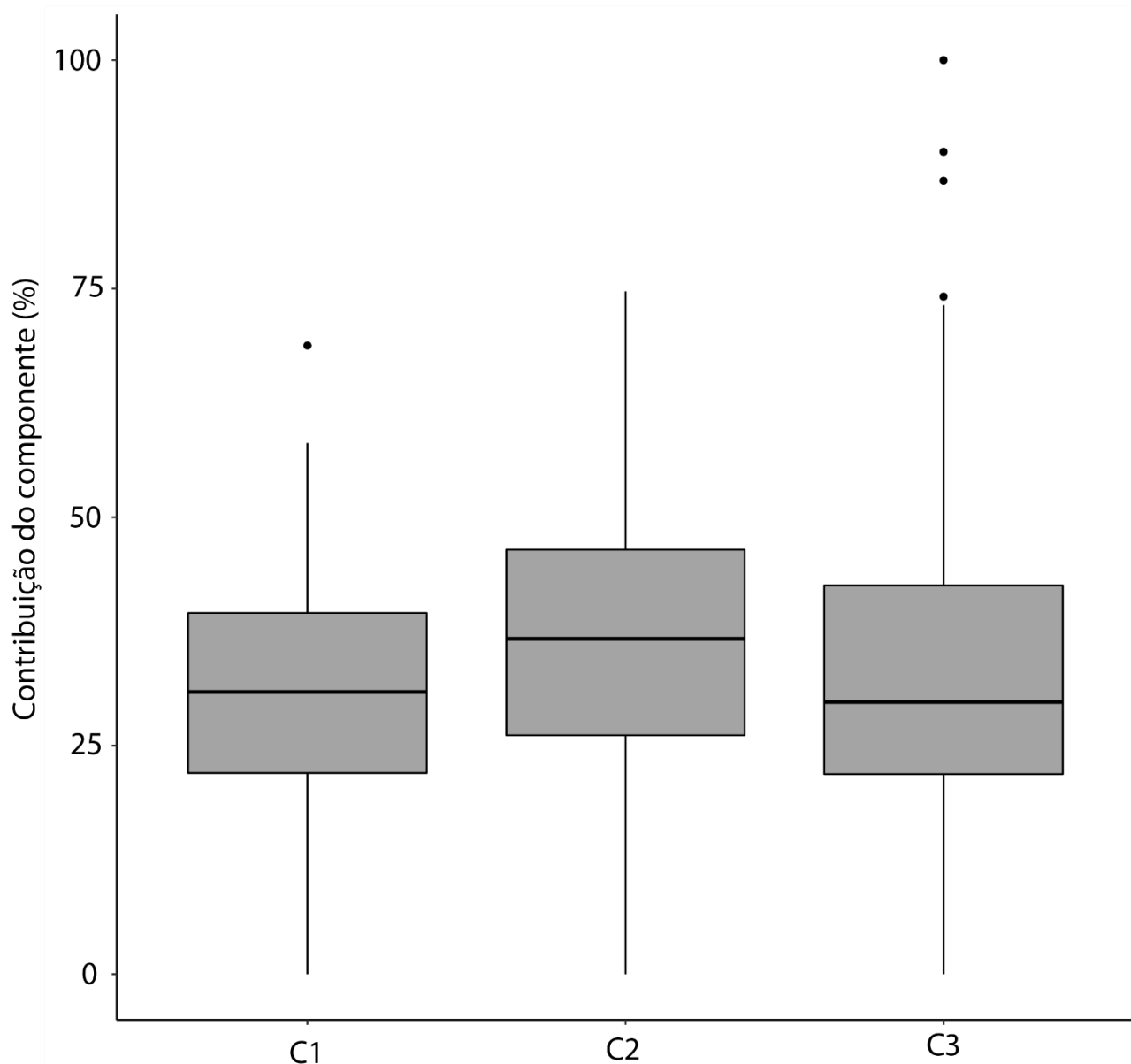


Figura 3 - Valor mediano da contribuição de cada componente em todas as culturas analisadas neste estudo. Linha central do retângulo = mediana; extremidade superior e inferior das linhas pós-retângulo = valores máximo e mínimo observados; e círculos = resíduos.

3.3. Variação na composição da matéria orgânica dissolvida fluorescente (FDOM) sobre as estruturas filogenéticas

A contribuição relativa dos componentes modelados pelo PARAFAC variou consideravelmente entre as repetições (Fig. 4). Três grandes grupos foram observados: (i) com predomínio de C4; (ii) com predominância de C2; (iii) com predominância de C1 (Fig. 4). Além disso, observamos que as culturas em fase de crescimento exponencial frequentemente agrupadas, como *Cryptomonas*, *Dictyosphaerium*, *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Messastrum*, *Selenastrum* (Fig. 4).

A contribuição dos componentes modelados pelo PARAFAC variou entre famílias e gêneros conforme as Figs. 5A e 5B, respectivamente. Ophiocytaceae, Microcystaceae, Scenedesmaceae, Selenastraceae e os gêneros *Coelastrum*, *Curvastrum*, *Microcystis*, *Ophiocytium*, *Selenastrum* apresentaram maior predominância de C1 (figs. 5 e 6). Chlamydomonadaceae, Chlorellaceae, Hydrodictyaceae, Oocystaceae, e os gêneros *Chlamydomonas*, *Monoraphidium*, *Muriella*, *Nephrocytium*, *Pediastrum*, *Raphidocelis* apresentaram maior predominância de C2 (Figs. 5 e 6). Botryococcaceae, Cryptomonadaceae, Desmidiaceae, Stephanodiscaceae e os gêneros *Botryococcus*, *Cryptomonas*, *Cyclotella*, *Spondylosium* apresentaram maior predominância de C4 (Figs. 5 e 6).

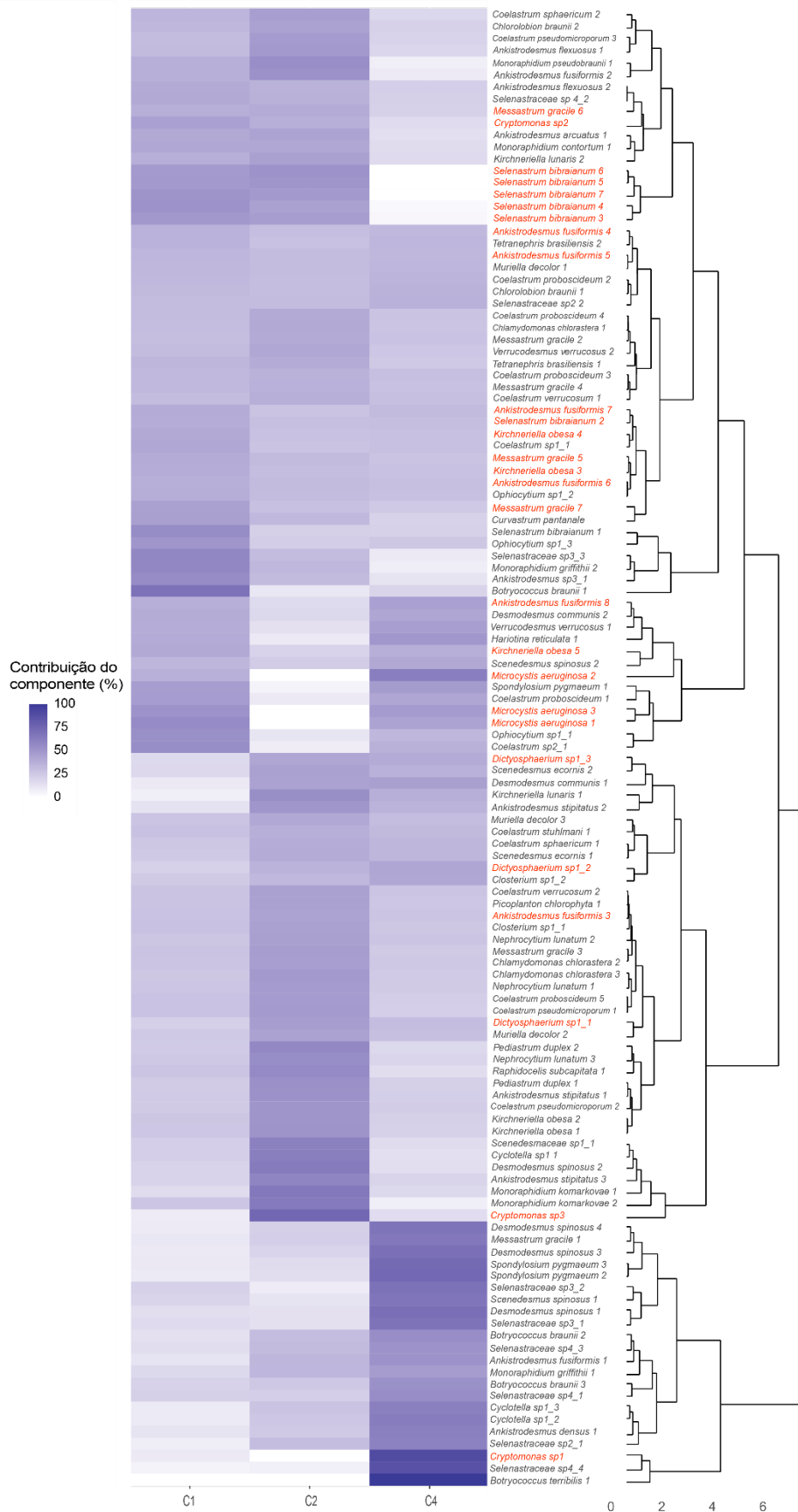
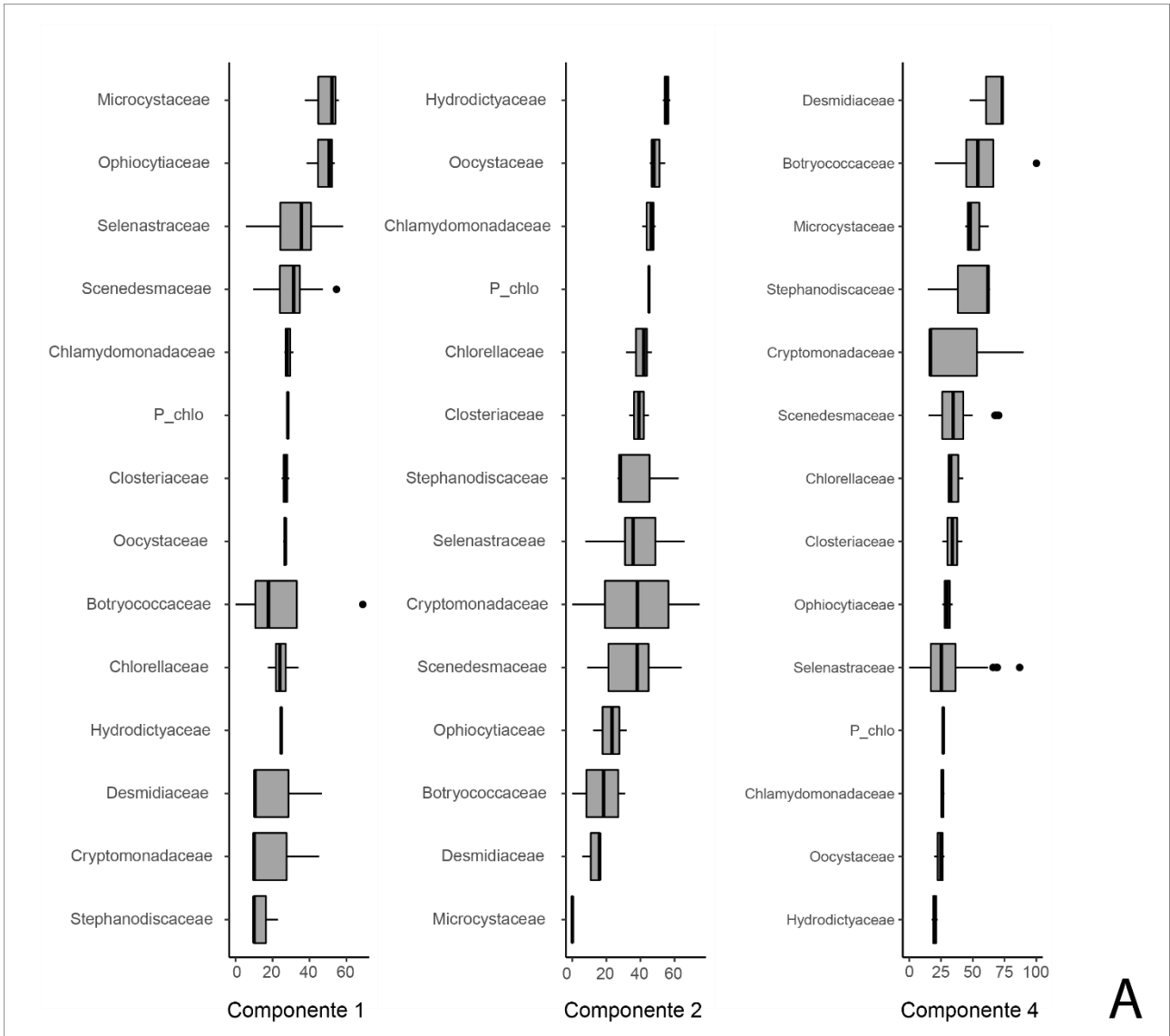


Figura 4 - Contribuição dos componentes individuais validados pelo PARAFAC. As culturas em fase de crescimento exponencial (menor ou igual a uma semana) foram marcadas em vermelho e as amostras estacionárias / senescentes (com mais de uma semana) foram marcadas em preto.



A

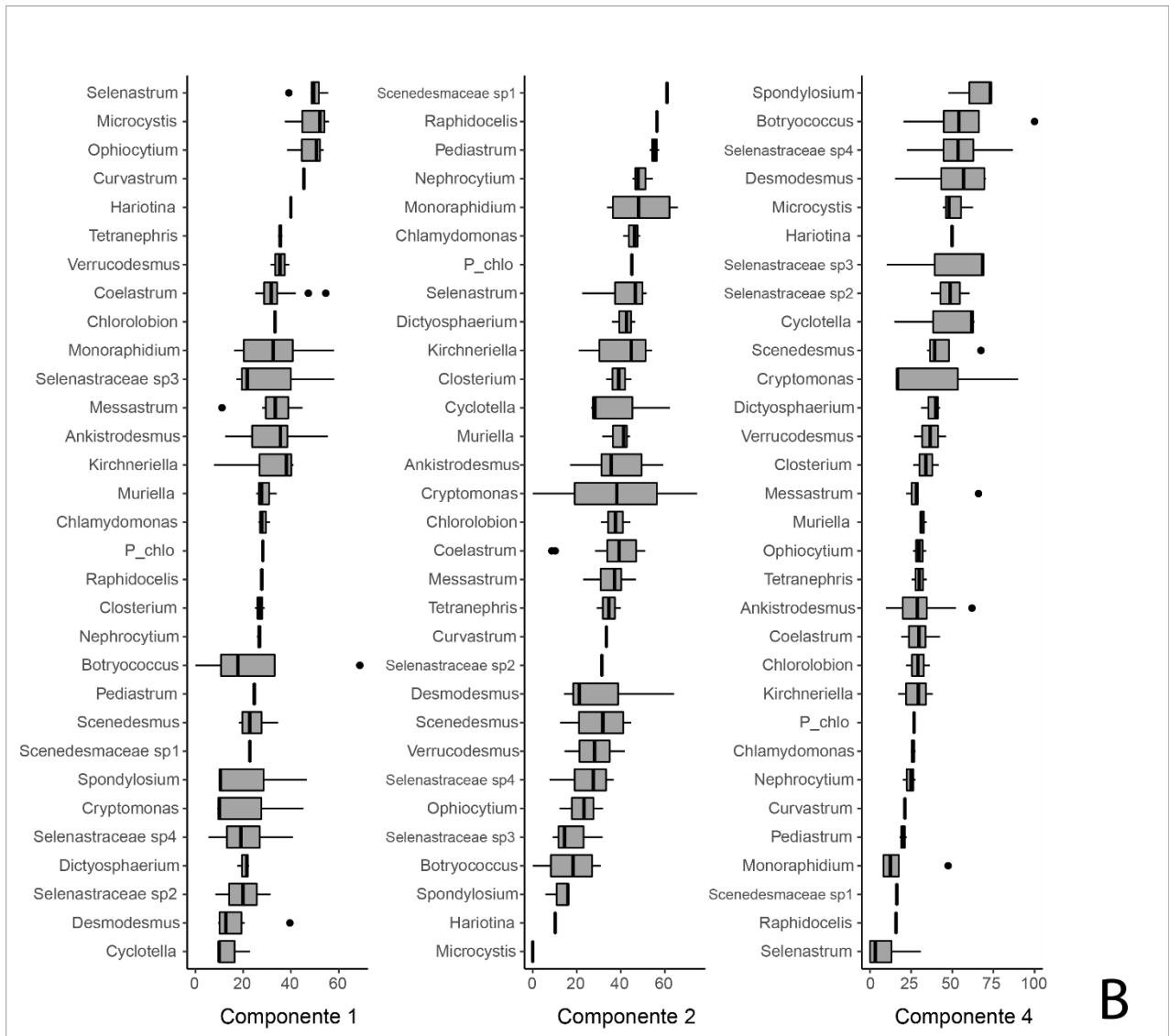


Figura 5 - Contribuição dos componentes individuais (%) validados pelo PARAFAC, agrupados por família (A), e agrupados por gênero (B). Linha central do retângulo = mediana; extremidade superior e inferior das linhas pós-retângulo = valores máximo e mínimo observados; e círculos = outliers. As amostras não identificadas foram categorizadas com a taxonomia sobre a qual o estudo possui informações (gênero ou família).

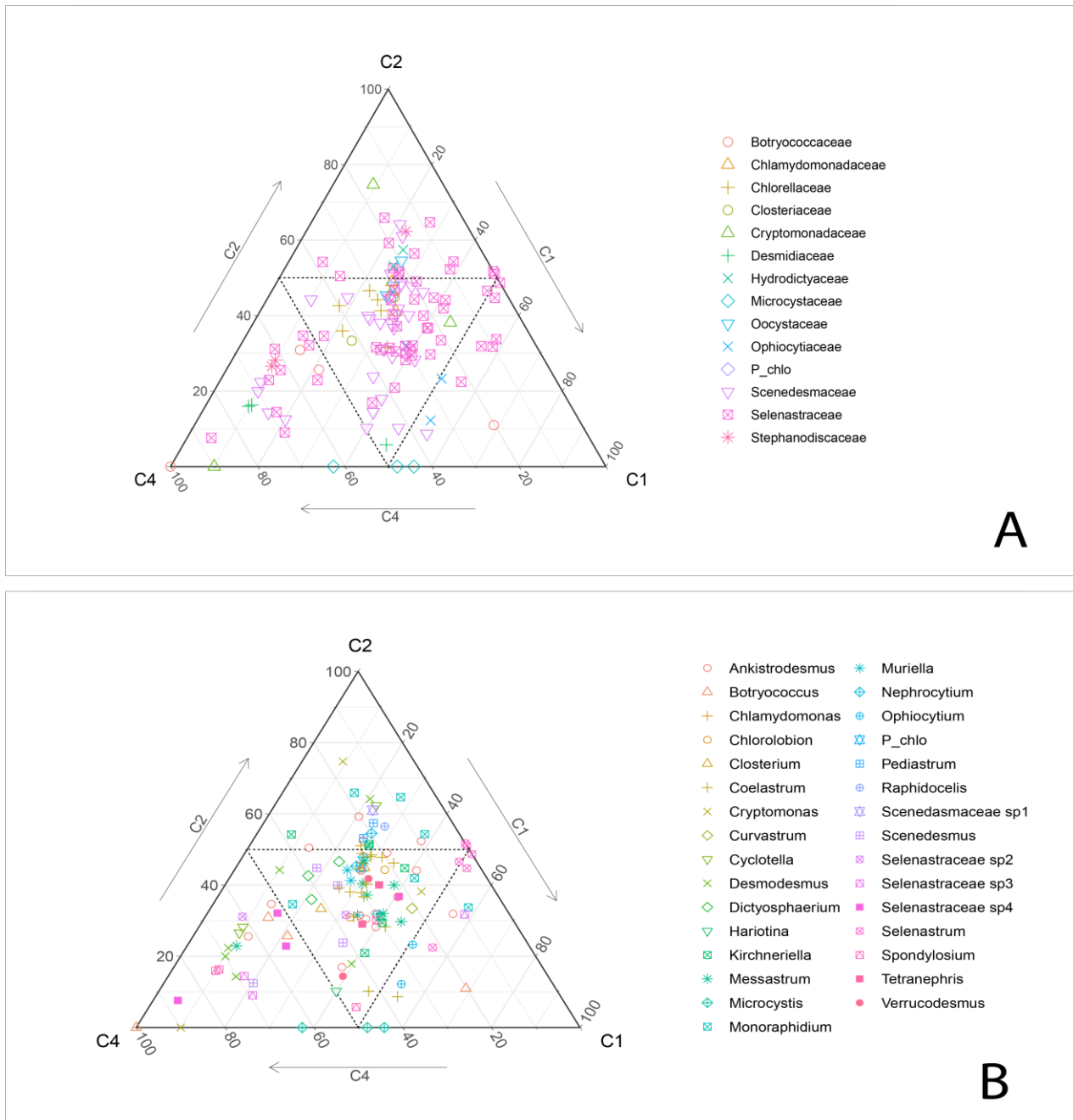
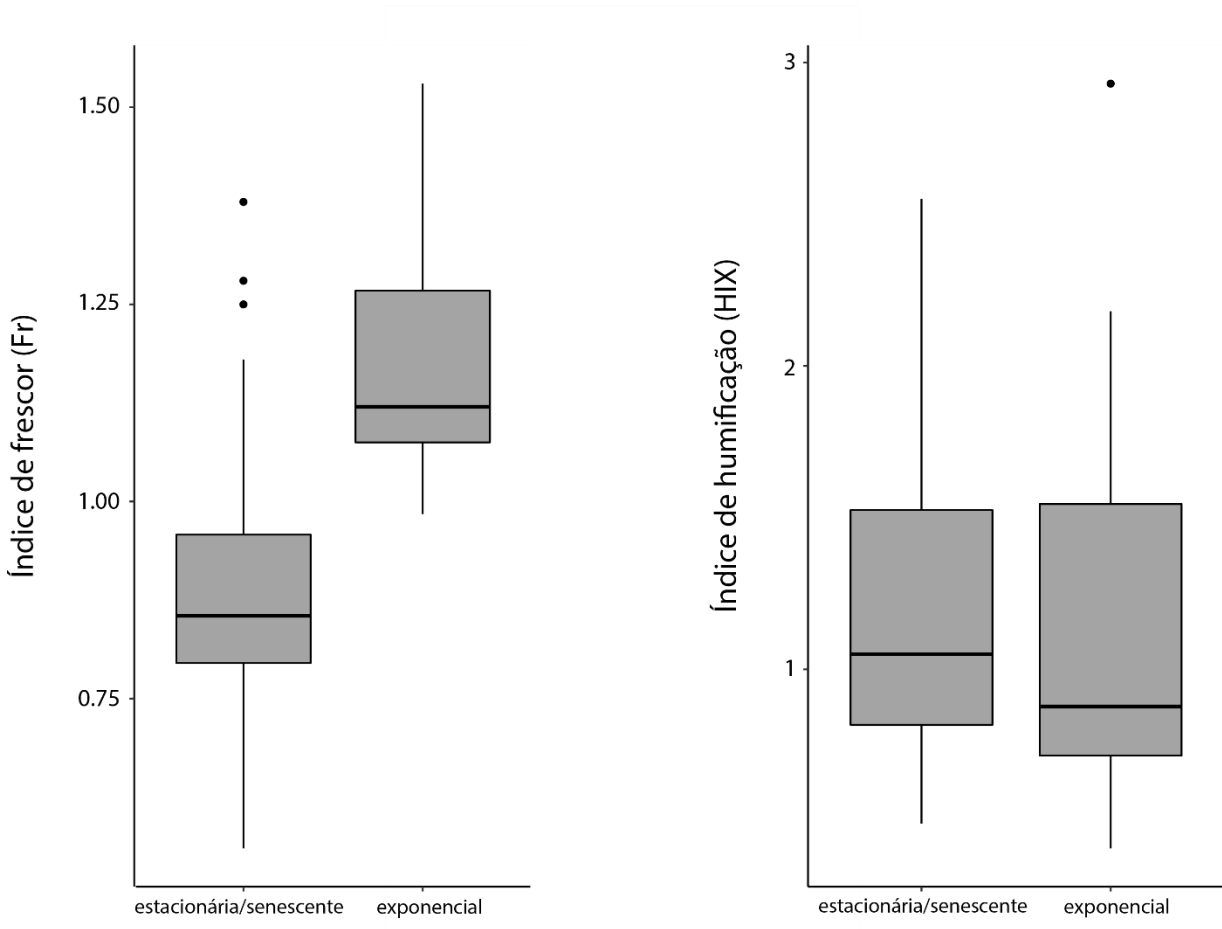


Figura 6 - Composição dos exsudados das culturas dos componentes validados pelo PARAFAC, marcados por família (A) e marcados por gênero (B).

Observamos diferenças nos índices Fr e HIX de acordo com a idade dos cultivos, independente da espécie (teste t na fase exponencial versus fase estacionária / senescente: $p = 9.577 \cdot 10^{-12}$ para Fr, $n = 27$ e $p = 1.816 \cdot 10^{-10}$ para HIX, $n = 27$, Fig. 7A). Além disso, comparamos diferentes fases de crescimento para a mesma espécie, quando disponíveis, realizando um teste t pareado. O índice Fr foi maior na fase exponencial do que na fase estacionária / senescente ($p = 0.001076$, $n = 7$, Fig. 7B), enquanto HIX não diferiu entre as fases de crescimento ($p = 0.1191$, $n = 8$, Fig. 7B).



A

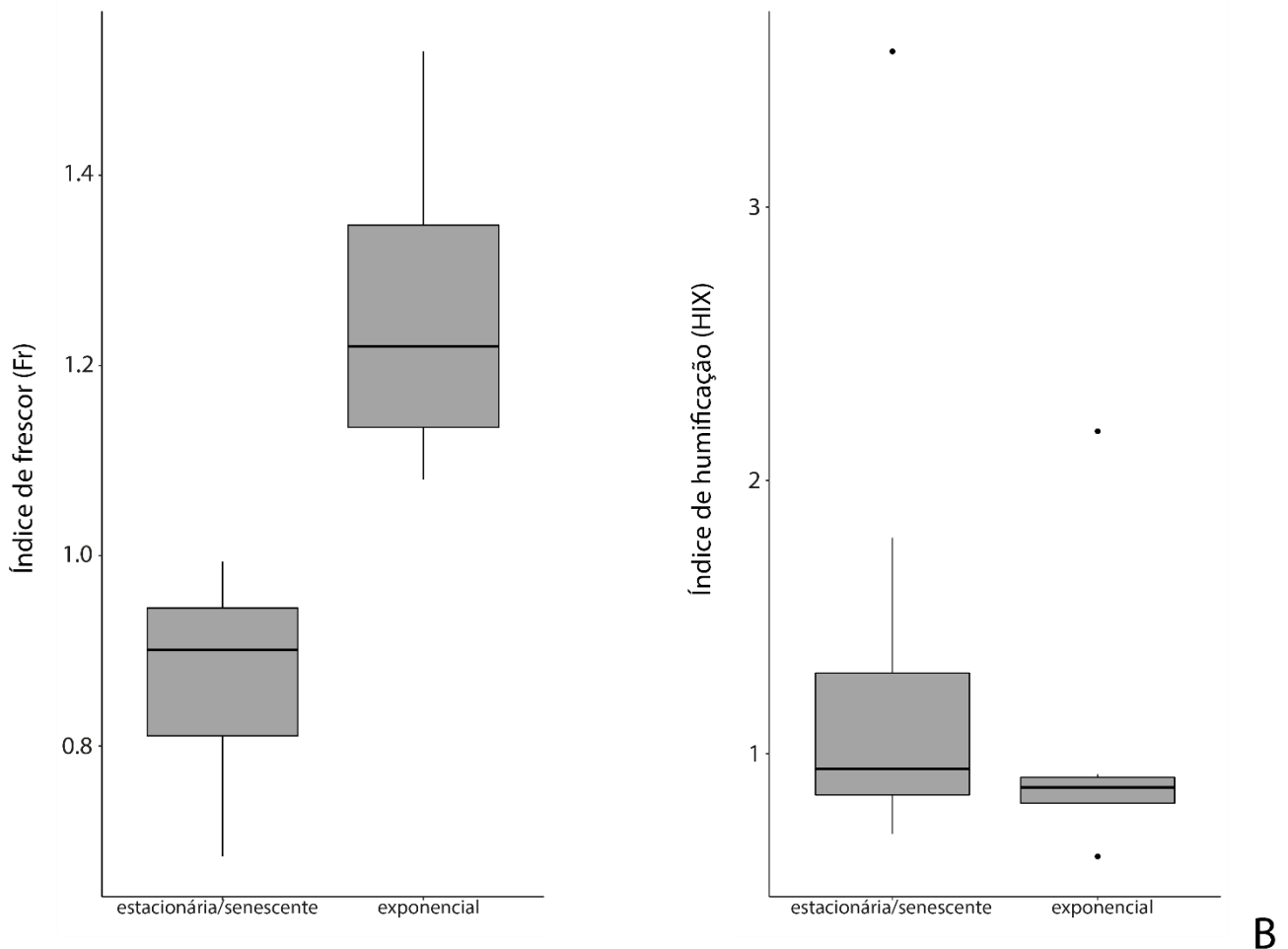


Figura 7 - Valores de Fr e HIX de culturas com diferentes períodos de incubação (A) e diferentes fases de crescimento para a mesma espécie (B). Exponencial corresponde a culturas que tiveram menos de uma semana ($n = 27$), estacionárias / senescentes foram culturas que tiveram mais de uma semana ($n = 96$). Linha central do retângulo = mediana; extremidade superior e inferior das linhas pós-retângulo = valores máximo e mínimo observados; e círculos = resíduos. As amostras 63,74,86,87,88 e 38, 50, 65, 88,92 foram retiradas desta análise por serem resíduos (mais informações em Material Suplementar).

4. Discussão

Os índices ópticos Fr, Sr, A: T r, C: A r obtidos em nossas culturas axênicas estavam geralmente dentro dos intervalos de valores relatados anteriormente para algas e águas doces naturais (HANSEN et al., 2016; HELMS et al., 2008; ZHANG et al., 2009), indicando que nossos dados podem ser úteis para interpretar matrizes de ambientes naturais (CORY et al., 2010; MCKNIGHT et al., 2001). Obtivemos uma ampla gama de valores de FI em nossas culturas axênicas, indicando que pode haver diferentes graus de fluorescência de acordo com a composição das espécies e estágio de crescimento.

Os valores HIX geralmente variam entre 0.6 e 0.9 (CHEN et al., 2011; FLECK et al., 2014; OHNO, 2002), mas o HIX neste estudo resultou em 1.2, mais do que o esperado, indicando uma possível degradação da matéria orgânica. Além disso, os índices HIX e Fr variaram de acordo com a idade da cultura, fortalecendo a ideia de que a degradação

ocorre pela ausência de microrganismos ou radiação UV, provavelmente por oxidação química (CHEN; CHEN, 2006), aumento de pH da solução provocado por hidroxilas e carboxilas ionizadas (COBLE et al., 2014), coesão ou absorção gerada por baixa energia cinética e forças físicas intermoleculares fracas (HE et al., 2016). Além disso, o HIX alto pode ser explicado pela presença de material intracelular, que se torna mais abundante durante a fase senescente (HUANG et al., 2009). A baixa taxa de degradação observada por réplicas de *Hariotina* e *Spondylosium* durante a fase de crescimento não exponencial pode indicar que a composição DOM produzida por esses representantes retarda a degradação química e supostamente é mais resistente à biodegradação (MOPPER; SCHULTZ, 1993; MORAN; ZEPP, 1997; WETZEL; HATCHER, 1997).

OpenFluor é um banco de dados sólido e robusto, com mais de 5.631 entradas de diferentes ecossistemas (água do mar, rios, lagos, manguezais e outros, consulte OpenFluor <https://openfluor.lablicate.com/of/measurement/statistics>). Entretanto, poucos estudos caracterizaram a FDOM produzida pelo fitoplâncton (DERRIEN; SHIN; HUR, 2019a; LEE et al., 2018). As DOMs alóctones de origem terrestre e atividade microbiana, referenciados nos componentes C1 e C4 de nossas culturas axênicas, respectivamente, demonstram que este tipo de estudo, separando os processos de produção e consumo, são essenciais para a compreensão dos componentes observados na natureza (ROMERA-CASTILLO et al., 2011). Comparando as propriedades ópticas dos componentes obtidos em nossa análise PARAFAC com o banco de dados OpenFluor, encontramos picos semelhantes em estudos em regiões polares. Isso pode ser explicado pela presença de DOM locais dominantes produzidas por fitoplâncton, musgos e líquenes em ecossistemas aquáticos nestas regiões (MATSUMOTO, 1989; MCKNIGHT et al., 1994; MCKNIGHT; AIKEN; SMITH, 1991). No oceano ártico, por exemplo, a produção primária no verão é alta (BEHRENFELD et al., 2006) e grandes quantidades de biomassa de algas crescem abaixo do gelo nessas regiões (BOETIUS et al., 2013; GOSSELIN et al., 1997). Além disso, a ausência de plantas vasculares nessas regiões torna esses dados mais representativos com a produção de DOM de origem algal (MATSUMOTO, 1989; POINTING et al., 2015).

A produção e degradação são processos ecológicos importantes responsáveis pela contribuição relativa de certos compostos durante o crescimento da fase exponencial e estacionária / senescente no ciclo de vida do fitoplâncton. A produção de proteínas deve predominar na fase de crescimento exponencial, enquanto na fase estacionária o conteúdo de proteínas deve diminuir enquanto os carboidratos e lipídeos aumentam

(MYKLESTAD, 2000). Em nosso estudo, famílias e gêneros em crescimento exponencial produziram predominantemente C1 e pico A + C, caracterizado por compostos com alta razão C: N.

Os grupos filogenéticos que mais contribuíram para a produção de cada um dos componentes (Microcystaceae, Ophiocytaceae para C1; Hydrodictyaceae, Oocystaceae para C2 e Desmidiaceae, Botryococcaceae para C3) podem ser especializados em exsudar um composto específico. Por exemplo, *Botryococcus* é conhecido por produzir grandes quantidades de hidrocarbonetos extracelulares, especialmente óleos na forma de triterpenos (METZGER; LARGEAU, 2005), e *Microcystis* é conhecido por produzir mais de 70 tipos diferentes de microcistinas (cianotoxinas extracelulares) com estruturas de heptapeptídeos cíclicos (CODD et al., 2005; JÄHNICHEN et al., 2007; SPOOF et al., 2003). Além disso, a maior contribuição de componentes observada nas famílias Scenedesmaceae e Selenastraceae e gênero *Botryococcus*, *Desmodesmus*, *Myrocistis*, *Monoraphidium* e *Selenastrum* pode ser explicada pelo maior número de cepas representando esses grupos taxonômicos. O número de representantes para as estruturas filogenéticas não foi comparável e isso pode ter causado uma tendência maior nesses grupos.

O agrupamento de espécies em fase de crescimento exponencial implica que no início do crescimento populacional do fitoplâncton não ocorra grande variação, independentemente de sua estrutura filogenética. MYKLESTAD (1974) mostrou que a composição química das algas é frequentemente diferente para diferentes classes e espécies e varia acentuadamente em função das condições de crescimento e é particularmente sensível à limitação de nutrientes, mas as condições para as réplicas neste estudo foram as mesmas. No entanto, o número de cepas obtidas nesta fase no presente estudo foi baixo.

5. Conclusão

Além de fornecer um banco de dados sólido da FDOM produzida pelo fitoplâncton de água doce, mostramos que a composição da FDOM é extremamente variável entre as espécies e em culturas replicadas da mesma espécie, e as propriedades ópticas da DOM derivada do fitoplâncton não parecem relacionadas à estrutura filogenética do fitoplâncton. As assinaturas de referência da DOM produzida pelo fitoplâncton de água doce fornecidas aqui ajudarão a interpretar as medições de campo da FDOM.

Agradecimentos

Esse projeto de mestrado foi apoiado e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa Tecnológica - CNPq (processo 309514 / 2017-7), e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo 2014 / 14139-3). Agradecemos a profa. Inessa Lacativa Bagatinni, ao Ms. Rodrigo Ventura de Mello, e ao técnico Antônio Luiz Sartori, da equipe do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos, por disponibilizar e identificar as cepas da Coleção de Cultivos de Microalgas de Água Doce (CCMA-UFSCAR). Também agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), por aprovar o projeto e disponibilizar espaço físico e recursos, tornando possível a conclusão do estudo.

Referências

AIKEN, G. R. Evaluation of ultrafiltration for determining molecular weight of fulvic acid.

Environmental science & technology, v. 18, n. 12, p. 978–981, 1984.

AITKENHEAD-PETERSON, J. A.; MCDOWELL, W. H.; NEFF, J. C. Sources, production, and regulation of allochthonous dissolved organic matter inputs to surface waters. In: **Aquatic ecosystems**. Elsevier, 2003. p. 25–70.

AMARAL, V. et al. Strong linkages between DOM optical properties and main clades of aquatic bacteria. **Limnology and Oceanography**, v. 61, n. 3, p. 906–918, 2016.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Elsevier, 2005.

ARRIGO, K. R.; BROWN, C. W. Impact of chromophoric dissolved organic matter on UV inhibition of primary productivity in the sea. **Marine Ecology Progress Series**, v. 140, p. 207–216, 1996.

AZAM, F. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine ecology progress series**, p. 257–263, 1983.

AZAM, F.; AMMERMAN, J. W. Cycling of Organic Matter by Bacterioplankton in Pelagic Marine Ecosystems: Microenvironmental Considerations. In: FASHAM, M. J. R. (Ed.). **Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems**. Boston, MA: Springer US, 1984. p. 345–360.

BAGATINI, I. L. et al. Host-Specificity and Dynamics in Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Phytoplankton. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e85950, 20 jan. 2014.

BAKER, A.; SPENCER, R. G. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. **Science of the total environment**, v. 333, n. 1–3, p. 217–232, 2004.

- BAKER, A. et al. Spectrophotometric properties of surface water dissolved organic matter in an afforested upland peat catchment. **Hydrological Processes: An International Journal**, v. 22, n. 13, p. 2325–2336, 2008.
- BATTIN, T. J. et al. Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. **Nature geoscience**, v. 1, n. 2, p. 95–100, 2008.
- BEHRENFELD, M. J. et al. Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. **Nature**, v. 444, n. 7120, p. 752–755, dez. 2006.
- BENNER, R. et al. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. **Science**, v. 255, n. 5051, p. 1561–1564, 1992.
- BENNER, R.; BIDDANDA, B. Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. **Limnology and Oceanography**, v. 43, n. 6, p. 1373–1378, set. 1998.
- BOETIUS, A. et al. Export of Algal Biomass from the Melting Arctic Sea Ice. **Science**, v. 339, n. 6126, p. 1430–1432, 22 mar. 2013.
- BOLIN, B. Carbon cycle modelling (SCOPE 16). 1981.
- BORISOVER, M. et al. Spatial and seasonal patterns of fluorescent organic matter in Lake Kinneret (Sea of Galilee) and its catchment basin. **Water Research**, v. 43, n. 12, p. 3104–3116, jul. 2009.
- BOYLE, E. S. et al. Optical properties of humic substances and CDOM: relation to structure. **Environmental science & technology**, v. 43, n. 7, p. 2262–2268, 2009.
- BRICAUD, A.; MOREL, A.; PRIEUR, L. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains 1. **Limnology and oceanography**, v. 26, n. 1, p. 43–53, 1981.
- BRO, R. PARAFAC. Tutorial and applications. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 38, n. 2, p. 149–171, 1997.
- BUFFLE, J.; DELADOEY, P.; HAERDI, W. The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 101, n. 2, p. 339–357, nov. 1978.
- CARDER, K. L. et al. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. **Limnology and oceanography**, v. 34, n. 1, p. 68–81, 1989.
- CARDER, K. L. et al. Reflectance model for quantifying chlorophyll a in the presence of productivity degradation products. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 96, n. C11, p. 20599–20611, 1991.
- CARLSON, C. A.; DUCKLOW, H. W.; MICHAELS, A. F. Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. **Nature**, v. 371, n. 6496, p. 405–408, set. 1994.

CASTILLO, C. R. et al. Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 55, n. 1, p. 446–454, 2010.

CATALÁN, N. et al. The relevance of environment vs. composition on dissolved organic matter degradation in freshwaters. **Limnology and Oceanography**, v. 66, n. 2, p. 306–320, fev. 2021.

CAWLEY, K. M. et al. Characterising the sources and fate of dissolved organic matter in Shark Bay, Australia: a preliminary study using optical properties and stable carbon isotopes. **Marine and Freshwater Research**, v. 63, n. 11, p. 1098, 2012a.

CAWLEY, K. M. et al. Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 8, p. 1678–1687, ago. 2012b.

CHEN, G.-Q.; CHEN, F. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 9, p. 607–616, 2006.

CHEN, H. et al. Correlation between molecular absorption spectral slope ratios and fluorescence humification indices in characterizing CDOM. **Aquatic Sciences**, v. 73, n. 1, p. 103–112, 2011.

CHEN, M. et al. Surface accumulation of low molecular weight dissolved organic matter in surface waters and horizontal off-shelf spreading of nutrients and humic-like fluorescence in the Chukchi Sea of the Arctic Ocean. **Science of The Total Environment**, v. 639, p. 624–632, out. 2018.

COBLE, P. G. et al. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 432–435, 1990.

COBLE, P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. **Marine chemistry**, v. 51, n. 4, p. 325–346, 1996.

COBLE, P. G. Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. **Chemical reviews**, v. 107, n. 2, p. 402–418, 2007.

COBLE, P. G. et al. **Aquatic organic matter fluorescence**. Cambridge University Press, 2014.

CODD, G. A. et al. Harmful Cyanobacteria. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. M. (Eds.). **Harmful Cyanobacteria**. Aquatic Ecology Series. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. v. 3p. 1–23.

COLE, J. J. et al. Plumbing the Global Carbon Cycle: Integrating Inland Waters into the Terrestrial Carbon Budget. **Ecosystems**, v. 10, n. 1, p. 172–185, 23 maio 2007.

CORY, R. M.; MCKNIGHT, D. M. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. **Environmental science & technology**, v. 39, n. 21, p. 8142–8149, 2005.

CORY, R. M. et al. Chemical characteristics of fulvic acids from Arctic surface waters: Microbial contributions and photochemical transformations. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 112, n. G4, 2007.

CORY, R. M. et al. Singlet oxygen in the coupled photochemical and biochemical oxidation of dissolved organic matter. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 10, p. 3683–3689, 2010.

CORY, R. M.; BOYER, E. W.; MCKNIGHT, D. M. Spectral methods to advance understanding of dissolved organic carbon dynamics in forested catchments. In: **Forest hydrology and biogeochemistry**. Springer, 2011. p. 117–135.

DE MELO, M. L. et al. Linking dissolved organic matter composition and bacterioplankton communities in an Amazon floodplain system. **Limnology and Oceanography**, v. 65, n. 1, p. 63–76, 2020.

DEGENS, E. T.; KEMPE, S.; RICHEY, J. E. **Summary: biogeochemistry of major world rivers**. Biogeochemistry of major world rivers. SCOPE 42. **Anais**.1991.

DERRIEN, M.; SHIN, K.-H.; HUR, J. Assessment on applicability of common source tracking tools for particulate organic matter in controlled end member mixing experiments. **Science of The Total Environment**, v. 666, p. 187–196, 20 maio 2019a.

DERRIEN, M.; SHIN, K.-H.; HUR, J. Biodegradation-induced signatures in sediment pore water dissolved organic matter: Implications from artificial sediments composed of two contrasting sources. **Science of The Total Environment**, v. 694, p. 133714, dez. 2019b.

DOWNING, J. A. et al. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 5, p. 2388–2397, 2006.

DRUON, J. N. et al. Modeling the dynamics and export of dissolved organic matter in the Northeastern US continental shelf. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 88, n. 4, p. 488–507, 2010.

DUCKLOW, H. W. et al. Bacterioplankton: a sink for carbon in a coastal marine plankton community. **Science**, v. 232, n. 4752, p. 865–867, 1986.

DUURSMA, E. K. Dissolved organic carbon, nitrogen and phosphorus in the sea. **Netherlands journal of sea research**, v. 1, n. 1–2, p. 1–141, 1961.

FLECK, J. A. et al. Concurrent photolytic degradation of aqueous methylmercury and dissolved organic matter. **Science of the Total Environment**, v. 484, p. 263–275, 2014.

FOX, T. R.; COMERFORD, N. B. Low-Molecular-Weight Organic Acids in Selected Forest Soils of the Southeastern USA. **Soil Science Society of America Journal**, v. 54, n. 4, p. 1139–1144, jul. 1990.

FOX, T. R. The Influence of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Properties and Processes in Forest Soils. In: MCFEE, W. W.; KELLY, J. M. (Eds.). **Carbon Forms and Functions in Forest Soils**. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2006. p. 43–62.

GAO, Z.; GUÉGUEN, C. Distribution of thiol, humic substances and colored dissolved organic matter during the 2015 Canadian Arctic GEOTRACES cruises. **Marine Chemistry**, v. 203, p. 1–9, jun. 2018.

GEORGIA, F. R.; POE, C. F. Study of Bacterial Fluorescence in Various Media: II. The Production of Fluorescence in Media Made from Peptones. *Journal of bacteriology*, v. 23, n. 2, p. 135–145, 1932.

GIORGIO, P. A. DEL; PRAIRIE, Y. T.; BIRD, D. F. Coupling Between Rates of Bacterial Production and the Abundance of Metabolically Active Bacteria in Lakes, Enumerated Using CTC Reduction and Flow Cytometry. ***Microbial Ecology***, v. 34, n. 2, p. 144–154, 1 set. 1997.

GRAEBER, D. et al. Interacting effects of climate and agriculture on fluvial DOM in temperate and subtropical catchments. ***Hydrology and Earth System Sciences***, v. 19, n. 5, p. 2377–2394, 2015.

GOSSELIN, M. et al. New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean. ***Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography***, v. 44, n. 8, p. 1623–1644, 1997.

GUILLARD, R. R.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C 1, 2. ***Journal of Phycology***, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

GUILLEMETTE, F.; DEL GIORGIO, P. A. Simultaneous consumption and production of fluorescent dissolved organic matter by lake bacterioplankton. ***Environmental microbiology***, v. 14, n. 6, p. 1432–1443, 2012.

GUILLEMETTE, F.; MCCALLISTER, S. L.; DEL GIORGIO, P. A. Differentiating the degradation dynamics of algal and terrestrial carbon within complex natural dissolved organic carbon in temperate lakes. ***Journal of Geophysical Research: Biogeosciences***, v. 118, n. 3, p. 963–973, 2013.

HANSELL, D. A.; CARLSON, C. A. Net community production of dissolved organic carbon. ***Global Biogeochemical Cycles***, v. 12, n. 3, p. 443–453, 1998.

HANSELL, D. A. DOC in the global ocean carbon cycle. ***Biogeochemistry of marine dissolved organic matter***, 2002.

HANSELL, D. A. et al. Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights. ***Oceanography***, v. 22, n. 4, p. 202–211, 2009.

HANSEN, A. M. et al. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. ***Limnology and oceanography***, v. 61, n. 3, p. 1015–1032, 2016.

HARADA, K. Production of Secondary Metabolites by Freshwater Cyanobacteria. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, v. 52, n. 8, p. 889–899, 2004.

HARJUNG, A. et al. Experimental evidence reveals impact of drought periods on dissolved organic matter quality and ecosystem metabolism in subalpine streams: DOM and metabolism under drought. ***Limnology and Oceanography***, v. 64, n. 1, p. 46–60, jan. 2019.

HE, W. et al. Dynamic exchanges between DOM and POM pools in coastal and inland aquatic ecosystems: A review. **Science of the Total Environment**, v. 551, p. 415–428, 2016.

HELMS, J. R. et al. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. **Limnology and oceanography**, v. 53, n. 3, p. 955–969, 2008.

HELMS, J. R. et al. Photochemical flocculation of terrestrial dissolved organic matter and iron. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 121, p. 398–413, nov. 2013.

HENDERSON, R. K. et al. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3435–3445, jul. 2008.

HERMANN, R. et al. Optical method for the determination of the oxygen-transfer capacity of small bioreactors based on sulfite oxidation: Optical Noninvasive Determination of the Oxygen-Transfer Capacity. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 74, n. 5, p. 355–363, 5 set. 2001.

HONG, H. et al. Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular biochemical composition. **Water Research**, v. 42, n. 20, p. 4941–4948, dez. 2008.

HUANG, J. et al. A comparison of the role of two blue–green algae in THM and HAA formation. **Water Research**, v. 43, n. 12, p. 3009–3018, 2009.

JAFFÉ, R. et al. Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long-term monitoring of optical properties: VARIATIONS IN DOM COMPOSITION IN ECOSYSTEMS. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 113, n. G4, dez. 2008.

JÄHNICHEN, S. et al. Impact of Inorganic Carbon Availability on Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 6994–7002, nov. 2007.

JERRY A. LEENHEER; CROUÉ, J.-P. Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 1, p. 18A-26A, 2003.

JIAO, N. et al. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 593–599, 2010.

KALLE, K. Fluoreszenz und gelbstoff im bottnischen und finnischen meerbusen. **Deutsche Hydrografische Zeitschrift**, v. 2, n. 4, p. 117–124, 1949.

KAWASAKI, N.; BENNER, R. Bacterial release of dissolved organic matter during cell growth and decline: molecular origin and composition. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 5, p. 2170–2180, 2006.

KIDA, M. et al. Origin, distributions, and environmental significance of ubiquitous humic-like fluorophores in Antarctic lakes and streams. **Water Research**, v. 163, p. 114901, out. 2019.

KIRK, J. T. O. Yellow substance (gelbstoff) and its contribution to the attenuation of photosynthetically active radiation in some inland and coastal south-eastern Australian waters. **Marine and Freshwater Research**, v. 27, n. 1, p. 61–71, 1976.

KIRK, J. T. **Light and photosynthesis in aquatic ecosystems**. [s.l.] Cambridge university press, 1994.

KULKARNI, H. V. et al. Influence of monsoonal recharge on arsenic and dissolved organic matter in the Holocene and Pleistocene aquifers of the Bengal Basin. **Science of The Total Environment**, v. 637–638, p. 588–599, out. 2018.

LAMBERT, T. et al. Effects of human land use on the terrestrial and aquatic sources of fluvial organic matter in a temperate river basin (The Meuse River, Belgium). **Biogeochemistry**, v. 136, n. 2, p. 191–211, nov. 2017.

LANDOLFI, A. et al. Overlooked runaway feedback in the marine nitrogen cycle: the vicious cycle. **Biogeosciences**, v. 10, n. 3, p. 1351–1363, 1 mar. 2013.

LARSSON, T.; WEDBORG, M.; TURNER, D. Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, n. 2, p. 357–363, 2007.

LECHTENFELD, O. J. et al. Marine sequestration of carbon in bacterial metabolites. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.

LEE, D. et al. Characteristics of intracellular algogenic organic matter and its reactivity with hydroxyl radicals. **Water Research**, v. 144, p. 13–25, nov. 2018.

LEENHEER, J. A. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. **Environmental science & technology**, v. 15, n. 5, p. 578–587, 1981.

LEWIS, D. G.; JOHNSON, W. C. Optical properties of sugars. VI. Circular dichroism of amylose and glucose oligomers. **Biopolymers**, v. 17, n. 6, p. 1439–1449, jun. 1978.

LI, L. et al. Characterization of intracellular & extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystis aeruginosa* and formation of AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 1233–1240, 2012.

LINDEMAN, R. L. The Trophic-Dynamic Aspect of Ecology. **Ecology**, v. 23, n. 4, p. 399–417, out. 1942.

MATSUMOTO, G. I. Biogeochemical study of organic substances in Antarctic lakes. In: VINCENT, W. F.; ELLIS-EVANS, J. C. (Eds.). **High Latitude Limnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1989. p. 265–289.

MCKNIGHT, D. M.; AIKEN, G. R.; SMITH, R. L. Aquatic fulvic acids in microbially based ecosystems: results from two desert lakes in Antarctica. **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 5, p. 998–1006, 1991.

MCKNIGHT, D. M. et al. Aquatic fulvic acids in algal-rich antarctic ponds. **Limnology and Oceanography**, v. 39, n. 8, p. 1972–1979, dez. 1994.

MCKNIGHT, D. M. et al. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. **Limnology and Oceanography**, v. 46, n. 1, p. 38–48, 2001.

METZGER, P.; LARGEAU, C. Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 5, p. 486–496, fev. 2005.

MIDORIKAWA, T.; TANOUE, E. Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. **Marine Chemistry**, v. 62, n. 3–4, p. 219–239, 1998.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C. A. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. **Marine Chemistry**, v. 41, n. 1–3, p. 229–238, 1993.

MORAN, M. A.; ZEPP, R. G. Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 6, p. 1307–1316, set. 1997.

MURPHY, K. R. et al. Organic Matter Fluorescence in Municipal Water Recycling Schemes: Toward a Unified PARAFAC Model. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 7, p. 2909–2916, 1 abr. 2011.

MURPHY, K. R. et al. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. **Analytical Methods**, v. 5, n. 23, p. 6557–6566, 2013.

MYKLESTAD, S. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 15, n. 3, p. 261–274, jul. 1974.

MYKLESTAD, S. M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. **Science of The Total Environment**, v. 165, n. 1–3, p. 155–164, abr. 1995.

MYKLESTAD, S. M. Dissolved organic carbon from phytoplankton. In: **Marine chemistry**. [s.l.]. Springer, 2000. p. 111–148.

NAIMAN, R. J.; LINK, G. L. Organic matter dynamics in 5 subarctic streams, Quebec, Canada. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 16, n. 1, p. 33–39, 1997.

NELSON, N. B.; SIEGEL, D. A.; MICHAELS, A. F. Seasonal dynamics of colored dissolved material in the Sargasso Sea. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 45, n. 6, p. 931–957, 1998.

NIETO-CID, M.; ÁLVAREZ-SALGADO, X. A.; PÉREZ, F. F. Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. **Limnology and Oceanography**, v. 51, n. 3, p. 1391–1400, 2006.

OBERNOSTERER, I.; BENNER, R. Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. **Limnology and Oceanography**, v. 49, n. 1, p. 117–124, jan. 2004.

OHNO, T. Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 4, p. 742–746, 2002.

OSTERHOLZ, H. et al. Deciphering associations between dissolved organic molecules and bacterial communities in a pelagic marine system. **The ISME journal**, v. 10, n. 7, p. 1717–1730, 2016.

PARLANTI, E. et al. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. **Organic geochemistry**, v. 31, n. 12, p. 1765–1781, 2000.

PIVOKONSKY, M.; KLOUCEK, O.; PIVOKONSKA, L. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algal organic matter. **Water Research**, v. 40, n. 16, p. 3045–3052, set. 2006.

PIVOKONSKY, M. et al. A comparison of the character of algal extracellular versus cellular organic matter produced by cyanobacterium, diatom and green alga. **Water Research**, v. 51, p. 37–46, mar. 2014.

POINTING, S. B. et al. Biogeography of photoautotrophs in the high polar biome. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 11 set. 2015.

PRENTICE, I. C. et al. **The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide**, 2001.

R CORE TEAM (2019). **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

REPETA, D. J. et al. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, n. 6, p. 955–962, mar. 2002.

ROCHELLE-NEWALL, E. J.; FISHER, T. R. Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay. **Marine Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 23–41, 2002.

ROMERA-CASTILLO, C. et al. Net Production and Consumption of Fluorescent Colored Dissolved Organic Matter by Natural Bacterial Assemblages Growing on Marine Phytoplankton Exudates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7490–7498, nov. 2011.

ROUSSEAU, C.; GREGG, W. Interannual Variation in Phytoplankton Primary Production at A Global Scale. **Remote Sensing**, v. 6, n. 1, p. 1–19, 19 dez. 2013.

SARMENTO, H.; GASOL, J. M. Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 2348–2360, 2012.

SARMENTO, H.; MORANA, C.; GASOL, J. M. Bacterioplankton niche partitioning in the use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon: quantity is more important than quality. **The ISME journal**, v. 10, n. 11, p. 2582–2592, 2016.

SCHLESINGER, W. H.; MELACK, J. M. Transport of organic carbon in the world's rivers. **Tellus**, v. 33, n. 2, p. 172–187, jan. 1981.

SERITTI, A. et al. Production of hydrophobic fluorescent organic matter by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Chemosphere**, v. 28, n. 1, p. 117–129, 1994.

SEYMOUR, J. R. et al. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. **Nature microbiology**, v. 2, n. 7, p. 1–12, 2017.

SHUTOVA, Y. et al. Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: From PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths. **Water Research**, v. 54, p. 159–169, maio 2014.

SIEGENTHALER, U.; SARMIENTO, J. L. Atmospheric carbon dioxide and the ocean. **Nature**, v. 365, n. 6442, p. 119–125, set. 1993.

SIGMAPLOT VERSION 12.3 (2013). **Systat Software, Inc.**, San Jose, California.

SPOOF, L. et al. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 105–119, dez. 2003.

STEDMON, C. A.; MARKAGER, S.; BRO, R. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. **Marine chemistry**, v. 82, n. 3–4, p. 239–254, 2003.

STEDMON, C. A.; BRO, R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6, n. 11, p. 572–579, 2008.

STEINER, M.-S.; DUERKOP, A.; WOLFBEIS, O. S. Optical methods for sensing glucose. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 9, p. 4805, 2011.

STEPANAUSKAS, R. et al. Sources, bioavailability, and photoreactivity of dissolved organic carbon in the Sacramento–San Joaquin River Delta. **Biogeochemistry**, v. 74, n. 2, p. 131–149, jun. 2005.

STUBBINS, A. et al. Anthropogenic aerosols as a source of ancient dissolved organic matter in glaciers. **Nature Geoscience**, v. 5, n. 3, p. 198–201, mar. 2012.

SWIFT, R. S. Fractionation of soil humic substances. **Humic Substances in Soil, Sediments and Water**, p. 387–408, 1985.

TEAM, R. C. R: 2019. **A Language and Environment for Statistical Computing version**, v. 3, n. 1, 2020.

TOMCO, P. L. et al. DOC export is exceeded by C fixation in May Creek: A late-successional watershed of the Copper River Basin, Alaska. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0225271, 20 nov. 2019.

TRANVIK, L. J. Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 12, n. 3, p. 177–183, 1993.

TWARDOWSKI, M. S.; DONAGHAY, P. L. Separating in situ and terrigenous sources of absorption by dissolved materials in coastal waters. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 106, n. C2, p. 2545–2560, 2001.

VERDUGO, P. et al. The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. **Marine Chemistry**, v. 92, n. 1–4, p. 67–85, 2004.

VOLKMAN, J. K.; TANOUE, E. **Journal of Oceanography**, v. 58, n. 2, p. 265–279, 2002.

WATANABE, M. M. Freshwater Culture. **Algal culturing techniques**, v. 13, 2005.

WETZ, M. S.; HALES, B.; WHEELER, P. A. Degradation of phytoplankton-derived organic matter: Implications for carbon and nitrogen biogeochemistry in coastal ecosystems. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 77, n. 3, p. 422–432, 2008.

WETZEL, R. G.; HATCHER, P. G.; BIANCHI, T. S. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. **Limnology and Oceanography**, v. 40, n. 8, p. 1369–1380, dez. 1995.

WETZEL, R. G.; HATCHER, P. G. Ultraviolet irradiance: Natural photolysis of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 26, n. 2, p. 412–412, dez. 1997.

WILSON, H. F.; XENOPOULOS, M. A. Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. **Nature Geoscience**, v. 2, n. 1, p. 37–41, 2009.

ZHANG, Y. et al. The contribution of phytoplankton degradation to chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in eutrophic shallow lakes: field and experimental evidence. **Water research**, v. 43, n. 18, p. 4685–4697, 2009.

WORSFOLD, P. J. et al. Characterisation and quantification of organic phosphorus and organic nitrogen components in aquatic systems: A Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 37–58, ago. 2008.

WÜNSCH, U. J.; MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A. The One-Sample PARAFAC Approach Reveals Molecular Size Distributions of Fluorescent Components in Dissolved Organic Matter. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 20, p. 11900–11908, 17 out. 2017.

WÜNSCH, U. J. et al. Quantifying the impact of solid-phase extraction on chromophoric dissolved organic matter composition. **Marine Chemistry**, v. 207, p. 33–41, nov. 2018.

YAMASHITA, Y. et al. Assessing the spatial and temporal variability of dissolved organic matter in Liverpool Bay using excitation–emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. **Ocean Dynamics**, v. 61, n. 5, p. 569–579, maio 2011.

YAMASHITA, Y.; BOYER, J. N.; JAFFÉ, R. Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. **Continental Shelf Research**, v. 66, p. 136–144, set. 2013.

YOSHINAGA, T.; ISO, Y.; ISOBE, T. Particulate, structural, and optical properties of D-glucose-derived carbon dots synthesized by microwave-assisted hydrothermal treatment. **Journal of Solid State Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. R3034, 2017.

ZHANG, Y. et al. The contribution of phytoplankton degradation to chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in eutrophic shallow lakes: field and experimental evidence. **Water research**, v. 43, n. 18, p. 4685–4697, 2009.

ZHOU, Z.; GUO, L.; OSBURN, C. L. Fluorescence EEMs and PARAFAC techniques in the analysis of petroleum components in the water column. In: **Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols**. Springer, 2015. p. 179–200.

ZSOLNAY, A. et al. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. **Chemosphere**, v. 38, n. 1, p. 45–50, 1999.

Material Suplementar

Tabela 1 - Descrições taxonômicas dos fitoplâncton observados, além dos reagentes inoculados durante o período de incubação (Capítulo 1). NA- Sem informação.

ID	Estrutura taxonômica	Gênero	Familia	Reagentes
1	Scenedesmaceae sp 1	Scene_sp1	Scenedesmaceae	NA
2	Selenastraceae sp1	Sele_sp1	Selenastraceae	NA
3	<i>Monoraphidium contortum</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	NA
4	<i>Desmodesmus spinosus</i> 1	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	NA
5	<i>Monoraphidium indicum</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	NA
6	<i>Ankistrodesmus</i> sp1_1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	NA
7	<i>Chlorolobion braunii</i> 1	<i>Chlorolobion</i>	Selenastraceae	NA
8	<i>Selenastrum bibraianum</i> 1	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	P+G
9	<i>Coelastrum sphaericum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	P+G
10	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	P+G
11	<i>Kirchneriella lunaris</i> 1	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	P+G
12	<i>Picoplanton chlorophyta</i> 1	P_chlo	Chlorophyta	P+G
13	<i>Picoplanton chlorophyta</i> 2	P_chlo	Chlorophyta	P+G
14	<i>Pediastrum duplex</i> 1	<i>Pediastrum</i>	Hydrodictyceae	P+G

15	<i>Chlorella minutissima</i> 1	Chlorella	Chlorellaceae	P+G
16	<i>Scenedemus bijugus</i> 1	Scenedesmus	Scenedesmaceae	P+G
17	<i>Chlorella vulgaris</i> 1	Chlorella	Chlorellaceae	P+G
18	<i>Ankistrodesmus densus</i> 1	Ankistrodesmus	Ankistrodesmus	P+G
19	<i>Messastrum gracile</i> 1	Messastrum	Selenastraceae	WC+PG
20	<i>Desmodesmus communis</i> 1	Desmodesmus	Scenedesmaceae	WC+PG
21	<i>Raphidocelis subcapitata</i> 1	Raphidocelis	Selenastraceae	WC+PG
22	<i>Nephrocytium lunatum</i> 1	Nephrocytium	Oocystaceae	WC+PG
23	<i>Ankistrodesmus flexuosus</i> 1	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC+PG
24	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 1	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC+PG
25	<i>Verrucodesmus verrucosus</i> 1	Verrucodesmus	Scenedesmaceae	WC+PG
26	<i>Coelastrum proboscideum</i> 1	Coelastrum	Scenedesmaceae	WC+PG
27	<i>Monoraphidium komarkovae</i> 1	Monoraphidium	Selenastraceae	WC+PG
28	<i>Tetranephris brasiliensis</i> 1	Tetranephris	Scenedesmaceae	WC+PG
29	<i>Muriella decolor</i> 1	Muriella	Chlorellaceae	WC+PG
30	<i>Monoraphidium pseudobraunii</i> 1	Monoraphidium	Selenastraceae	WC+PG
31	<i>Hariotina reticulata</i> 1	Hariotina	Scenedesmaceae	WC+PG
32	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 1	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC+PG
33	<i>Selenastrum bibraianum</i> 2	Selenastrum	Selenastraceae	WC+PG
34	<i>Kirchneriella obesa</i> 1	Kirchneriella	Selenastraceae	WC+PG
35	<i>Curvastrum pantanale</i> 1	Curvastrum	Selenastraceae	WC+PG
36	<i>Botryococcus terribilis</i> 1	Botryococcus	Botryococcaceae	WC+PG
37	<i>Centritractus belenophorus</i> 1	Centritractus	Centritractaceae	WC+PG
38	<i>Pediastrum duplex</i> 2	Pediastrum	Hydrodictyaceae	WC+PG
39	<i>Coelastrum astroideum</i> 1	Coelastrum	Scenedesmaceae	WC+PG
40	<i>Monoraphidium griffithii</i> 1	Monoraphidium	Monoraphidium	WC
41	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 2	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC
42	<i>Ankistrodesmus densus</i> 2	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC
43	<i>Hariotina reticulata</i> 2	Hariotina	Scenedesmaceae	WC
44	Picoplanton chlorophyta3	P_chlo	Chlorophyta	WC
45	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 3	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC
46	<i>Messastrum gracile</i> 2	Messastrum	Selenastraceae	WC
47	Selenastraceae sp2_1	sele_sp2	Selenastraceae	WC
48	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 2	Ankistrodesmus	Selenastraceae	WC

49	<i>Ankistrodesmus densus</i> 3	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	P+G
50	<i>Messastrum gracile</i> 3	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	P+G
51	<i>Euastrum evolutum</i> 1	<i>Euastrum</i>	Desmidiaceae	P+G
52	<i>Hyalotheca dissiliens</i> 1	<i>Hyalotheca</i>	Desmidiaceae	P+G
53	<i>Pleurotaenium ovatum</i> 1	<i>Pleurotaenium</i>	Desmidiaceae	P+G
54	<i>Pleurotaenium trabecula</i> 1	<i>Pleurotaenium</i>	Desmidiaceae	P+G
55	<i>Pleurotaenium truncatum</i> 1	<i>Pleurotaenium</i>	Desmidiaceae	P+G
56	<i>Scenedemus bijugus</i> 2	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	P+G
57	<i>Micrasterias</i> sp1	<i>Micrasterias</i>	Desmidiaceae	P+G
58	<i>Kirchneriella lunaris</i> 2	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	P+G
59	<i>Synura uvella</i> 1	<i>Synura</i>	Synuraceae	P+G
60	<i>Raphidocelis subcapitata</i> 2	<i>Raphidocelis</i>	Selenastraceae	P+G
61	<i>Chlorella vulgaris</i> 2	<i>Chlorella</i>	Chlorellaceae	P+G
62	<i>Chlorella vulgaris</i> 3	<i>Chlorella</i>	Chlorellaceae	P+G
63	<i>Micrasterias truncata</i> var <i>pusilla</i> 1	<i>Micrasterias</i>	Desmidiaceae	P+G
64	<i>Chlorella vulgaris</i> 4	<i>Chlorella</i>	Chlorellaceae	P+G
65	<i>Chlorella vulgaris</i> 5	<i>Chlorella</i>	Chlorellaceae	P+G
66	<i>Micrasterias truncata</i> var <i>pusilla</i> 2	<i>Micrasterias</i>	Desmidiaceae	P+G
67	<i>Messastrum gracile</i> 3	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	P+G
68	<i>Cosmarium pseudopyramidatum</i> 1	<i>Cosmarium</i>	Desmidiaceae	P+G
69	<i>Chlamydomonas chlorastera</i> 1	<i>Chlamydomona</i>	Chlamydomonadasceae	P+G
70	<i>Nephrocytium lunatum</i> 2	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	P+G
71	<i>Spondylosium pygmaeum</i> 1	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	P+G
72	<i>Muriella decolor</i> 2	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	WC
73	<i>Verrucodesmus verrucodesmus</i> 2	<i>Verrucodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
74	<i>Chlorolobion braunii</i> 2	<i>Chlorolobion</i>	Selenastraceae	WC
75	<i>Monoraphidium griffithii</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
76	<i>Desmodesmus communis</i> 2	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
77	<i>Monoraphidium komarkovae</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
78	<i>Ankistrodesmus flexuosus</i> 2	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
79	<i>Tetranephris brasiliensis</i> 2	<i>Tetranephris</i>	Scenedesmaceae	WC
80	<i>Scenedesmus ecornis</i> 1	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
81	<i>Coelastrum</i> sp2_1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
82	<i>Monoraphidium contortum</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC

83	<i>Kirchneriella lunaris</i> 3	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
84	<i>Coelastrum sphaericum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
85	<i>Selenastraceae sp3_1</i>	sele_sp3	Selenastraceae	WC
86	<i>Coelastrum proboscideum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
87	<i>Desmodesmus spinosus</i> 2	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
88	<i>Coelastrum stuhlmani</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
89	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
90	<i>Selenastraceae sp4_1</i>	sele_sp4	Selenastraceae	WC
91	<i>Scenedesmus spinosus</i> 1	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
92	<i>Selenastraceae sp2_2</i>	sele_sp2	Selenastraceae	WC
93	<i>Selenastraceae sp3_2</i>	sele_sp3	Selenastraceae	WC
94	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
95	<i>Coelastrum proboscideum</i> 3	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
96	<i>Selenastraceae sp4_2</i>	sele_sp4	Selenastraceae	WC
97	<i>Coelastrum verrucosum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
98	<i>Closterium sp1_1</i>	<i>Closterium</i>	Closteriaceae	WC
99	<i>Coelastrum sp1_2</i>	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
100	<i>Selenastraceae sp4_3</i>	sele_sp4	Selenastraceae	WC
101	<i>Cyclotella_sp1</i>	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	WC
102	<i>Cyclotella_sp2</i>	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	WC
103	<i>Cyclotella_sp3</i>	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	WC
104	<i>Desmodesmus spinosus</i> 3	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
105	<i>Desmodesmus spinosus</i> 4	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
106	<i>Desmodesmus spinosus</i> 5	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
107	<i>Nephrocytium lunatum</i> 3	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	WC
108	<i>Nephrocytium lunatum</i> 4	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	WC
109	<i>Nephrocytium lunatum</i> 5	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	WC
110	<i>Spondylosium pygmaeum</i> 2	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	WC
111	<i>Spondylosium pygmaeum</i> 3	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	WC
112	<i>Spondylosium pygmaeum</i> 4	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	WC
113	<i>Chlamydomonas chlorastera</i> 2	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	WC
114	<i>Chlamydomonas chlorastera</i> 3	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	WC
115	<i>Chlamydomonas chlorastera</i> 4	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	WC
116	<i>Messastrum gracile</i> 4	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC

117	<i>Messastrum gracile</i> 5	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC
118	<i>Messastrum gracile</i> 6	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC
119	<i>Kirchneriella obesa</i> 2	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
120	<i>Kirchneriella obesa</i> 3	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
121	<i>Ophiocytium</i> _sp1	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	WC
122	<i>Ophiocytium</i> _sp2	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	WC
123	<i>Muriella decolor</i> 3	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	WC
124	<i>Muriella decolor</i> 4	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	WC
125	<i>Botryococcus braunii</i> 1	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	WC
126	<i>Botryococcus braunii</i> 2	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	WC
127	<i>Pediastrum duplex</i> 3	<i>Pediastrum</i>	Hydrodictyceae	WC
128	<i>Pediastrum duplex</i> 4	<i>Pediastrum</i>	Hydrodictyceae	WC
129	<i>Monoraphidium griffithii</i> 3	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
130	<i>Coelastrum astroideum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
131	<i>Monoraphidium indicum</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
132	<i>Coelastrum proboscideum</i> 3	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
133	<i>Ophiocytium</i> sp1_3	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	WC
134	<i>Chlorolobion braunii</i> 3	<i>Chlorolobion</i>	Selenastraceae	WC
135	<i>Botryococcus terribilis</i> 2	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	WC
136	<i>Botryococcus braunii</i> 3	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	WC
137	Scenedesmaceae sp1_2	scene_sp1	Scenedesmaceae	WC
138	<i>Curvastrum pantanale</i> 2	<i>Curvastrum</i>	Selenastraceae	WC
139	<i>Monoraphidium komarkovae</i> 3	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
140	<i>Centritractus belenophorus</i> 2	<i>Centritractus</i>	Centritractaceae	WC
141	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 3	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
142	<i>Coelastrum proboscideum</i> 4	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
143	<i>Monoraphidium pseudobraunii</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	WC
144	<i>Coelastrum verrucosum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
145	<i>Tetranephris brasiliensis</i> 3	<i>Tetranephris</i>	Scenedesmaceae	WC
146	<i>Closterium</i> sp1_2	<i>Closterium</i>	Closteriaceae	WC
147	Selenastraceae sp3_3	sele_sp3	Selenastraceae	WC
148	<i>Verrucodesmus Verrucodesmus</i> 2	<i>Verrucodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
149	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> 3	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
150	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 4	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC

151	<i>Selenastraceae</i> sp4_4	sele_sp4	Selenastraceae	WC
152	<i>Coelastrum</i> sp	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
153	<i>Coelastrum proboscideum</i> 5	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
154	<i>Kirchneriella lunaris</i> 4	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
155	<i>Scenedesmus ecornis</i> 2	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
156	<i>Ankistrodesmus flexuosus</i> 3	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
157	<i>Desmodesmus communis</i> 3	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
158	<i>Raphidocelis subcapitata</i> 3	<i>Raphidocelis</i>	Selenastraceae	WC
159	<i>Coelastrum sphaericum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	WC
160	<i>Scenedesmus spinosus</i> 2	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	WC
161	<i>Selenastrum bibraianum</i> 3	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
162	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> 2	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
163	<i>Selenastrum bibraianum</i> 4	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
164	<i>Selenastrum bibraianum</i> 5	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
165	<i>Selenastrum bibraianum</i> 6	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
166	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 4	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
167	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 5	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
168	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 6	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
169	<i>Kirchneriella obesa</i> 4	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
170	<i>Kirchneriella obesa</i> 5	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
171	<i>Kirchneriella obesa</i> 6	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	WC
172	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 7	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
173	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 8	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
174	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 9	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	WC
175	<i>Messastrum gracile</i> 7	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC
176	<i>Messastrum gracile</i> 8	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC
177	<i>Messastrum gracile</i> 9	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	WC
178	<i>Selenastrum bibraianum</i> 7	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
179	<i>Selenastrum bibraianum</i> 8	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	WC
180	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_1	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	WC
181	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_2	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	WC
182	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_3	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	WC
183	<i>Microcystis aeruginosa</i> 1	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	WC
184	<i>Microcystis aeruginosa</i> 2	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	WC

185	<i>Microcystis aeruginosa</i> 3	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	WC
186	<i>Cryptomonas</i> sp1	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	WC
187	<i>Cryptomonas</i> sp2	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	WC
188	<i>Cryptomonas</i> sp3	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	WC

Tabela 2 - Descrições taxonômicas dos fitoplâncton selecionados (Capítulo 3).

ID	Specie (replica number)	Gênero	Família	Fase de crescimento	CCMA-UFSCAR
1	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	277
2	<i>Ankistrodesmus densus</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	239
3	<i>Hariotina reticulata</i> 1	<i>Hariotina</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	326
4	<i>Picoplanton chlorophyta</i> 1	<i>P_chlo</i>	P_chlo	estacionária/senescente	322
5	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 2	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	278
6	<i>Messastrum gracile</i> 1	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	470
7	<i>Selenastraceae</i> sp2_1	<i>sele_sp2</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	447
8	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	333
9	<i>Muriella decolor</i> 1	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	estacionária/senescente	320
10	<i>Verrucodesmus Verrucodesmussus</i> 1	<i>Verrucodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	244
11	<i>Chlorolobion braunii</i> 1	<i>Chlorolobion</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	137
12	<i>Monoraphidium griffithii</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	325
13	<i>Desmodesmus communis</i> 1	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	30
14	<i>Monoraphidium komarkovae</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	291T1
15	<i>Ankistrodesmus flexuosus</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	83
16	<i>Tetranephris brasiliensis</i> 1	<i>Tetranephris</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	307
17	<i>Scenedesmus ecornis</i> 1	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	88
18	<i>Coelastrum</i> sp2_1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	272
19	<i>Monoraphidium contortum</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	306
20	<i>Kirchneriella lunaris</i> 1	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	87

21	<i>Coelastrum sphaericum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	60
22	<i>Selenastraceae</i> sp3_1	<i>sele_sp3</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	265
23	<i>Coelastrum proboscideum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	139
24	<i>Desmodesmus spinosus</i> 1	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	62
25	<i>Coelastrum stuhlmani</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	67
26	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	202
27	<i>Selenastraceae</i> sp4_1	<i>sele_sp4</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	174
28	<i>Scenedesmus spinosus</i> 1	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	46
29	<i>Selenastraceae</i> sp2_2	<i>sele_sp2</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	132
30	<i>Selenastraceae</i> sp3_2	<i>sele_sp3</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	261
31	<i>Coelastrum pseudomicroporum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	181
32	<i>Coelastrum proboscideum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	336
33	<i>Selenastraceae</i> sp4_2	<i>sele_sp4</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	230
34	<i>Coelastrum verrucosum</i> 1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	318
35	<i>Closterium</i> sp1_1	<i>Closterium</i>	Closteriaceae	estacionária/senescente	279
36	<i>Coelastrum</i> sp1_1	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	155
37	<i>Selenastraceae</i> sp4_3	<i>sele_sp4</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	234
38	<i>Cyclotella</i> sp1_1	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	estacionária/senescente	BB041
39	<i>Cyclotella</i> sp1_2	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	estacionária/senescente	BB041
40	<i>Cyclotella</i> sp1_3	<i>Cyclotella</i>	Stephanodiscaceae	estacionária/senescente	BB041
41	<i>Desmodesmus spinosus</i> 2	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	62
42	<i>Desmodesmus spinosus</i> 3	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	62
43	<i>Desmodesmus spinosus</i> 4	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	62
44	<i>Nephrocytium lunatum</i> 1	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	estacionária/senescente	65
45	<i>Nephrocytium lunatum</i> 2	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	estacionária/senescente	65
46	<i>Nephrocytium lunatum</i> 3	<i>Nephrocytium</i>	Oocystaceae	estacionária/senescente	65

47	<i>Spondylosium pygmaeum1</i>	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	estacionária/senescente	14
48	<i>Spondylosium pygmaeum2</i>	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	estacionária/senescente	14
49	<i>Spondylosium pygmaeum3</i>	<i>Spondylosium</i>	Desmidiaceae	estacionária/senescente	14
50	<i>Chlamydomonas chlorastera1</i>	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	estacionária/senescente	9
51	<i>Chlamydomonas chlorastera2</i>	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	estacionária/senescente	9
52	<i>Chlamydomonas chlorastera3</i>	<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadaceae	estacionária/senescente	9
53	<i>Messastrum gracile2</i>	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	5
54	<i>Messastrum gracile3</i>	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	5
55	<i>Messastrum gracile4</i>	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	5
56	<i>Kirchneriella obesa1</i>	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	345
57	<i>Kirchneriella obesa2</i>	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	345
58	<i>Ophiocytium sp1_1</i>	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	estacionária/senescente	553
59	<i>Ophiocytium sp1_2</i>	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	estacionária/senescente	553
60	<i>Muriella decolor2</i>	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	estacionária/senescente	320
61	<i>Muriella decolor3</i>	<i>Muriella</i>	Chlorellaceae	estacionária/senescente	320
62	<i>Botryococcus braunii1</i>	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	estacionária/senescente	399
63	<i>Botryococcus braunii2</i>	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	estacionária/senescente	399
64	<i>Pediastrum duplex1</i>	<i>Pediastrum</i>	Hydrodictyceae	estacionária/senescente	55
65	<i>Pediastrum duplex2</i>	<i>Pediastrum</i>	Hydrodictyceae	estacionária/senescente	55
66	<i>Ankistrodesmus sp3_1</i>	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	593
67	<i>Monoraphidium griffithii2</i>	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	610
68	<i>Coelastrum proboscideum3</i>	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	336
69	<i>Ophiocytium sp1_3</i>	<i>Ophiocytium</i>	Ophiocytaceae	estacionária/senescente	553
70	<i>Chlorolobion braunii2</i>	<i>Chlorolobion</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	455
71	<i>Botryococcus terribilis1</i>	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	estacionária/senescente	481
72	<i>Botryococcus braunii3</i>	<i>Botryococcus</i>	Botryococcaceae	estacionária/senescente	399

73	<i>Scenedesmaceae</i> sp1_1	<i>scene_sp1</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	390
74	<i>Curvastrum pantanale</i>	<i>Curvastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	350
75	<i>Monoraphidium komarkovae</i> 2	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	291
76	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 2	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	333
77	<i>Coelastrum proboscideum</i> 4	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	336
78	<i>Monoraphidium pseudobraunii</i> 1	<i>Monoraphidium</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	325
79	<i>Coelastrum verrucosum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	318
80	<i>Tetranephris brasiliensis</i> 2	<i>Tetranephris</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	307
81	<i>Closterium</i> sp1_2	<i>Closterium</i>	Closteriaceae	estacionária/senescente	279
82	<i>Selenastraceae</i> sp3_3	<i>sele_sp3</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	265
83	<i>Verrucodesmus Verrucodesmus</i> 2	<i>Verrucodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	244
84	<i>Coelastrum pseudomicroporur</i>	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	202
85	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> 3	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	176
86	<i>Selenastraceae</i> sp4_4	<i>sele_sp4</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	174
87	<i>Coelastrum proboscideum</i> 5	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	139
88	<i>Kirchneriella lunaris</i> 2	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	123
89	<i>Scenedesmus ecornis</i> 2	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	88
90	<i>Ankistrodesmus flexuosus</i> 2	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	83
91	<i>Desmodesmus communis</i> 2	<i>Desmodesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	30
92	<i>Raphidocelis subcapitata</i> 1	<i>Raphidocelis</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	48
93	<i>Coelastrum sphaericum</i> 2	<i>Coelastrum</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	60
94	<i>Scenedesmus spinosus</i> 2	<i>Scenedesmus</i>	Scenedesmaceae	estacionária/senescente	46
95	<i>Selenastrum bibraianum</i> 1	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	47
96	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> 1	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	estacionária/senescente	24
97	<i>Selenastrum bibraianum</i> 2	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	613
98	<i>Selenastrum bibraianum</i> 3	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	613

99	<i>Selenastrum bibraianum</i> 4	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	613
100	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 3	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	578
101	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 4	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	578
102	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 5	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	578
103	<i>Kirchneriella obesa</i> 3	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	exponencial	516
104	<i>Kirchneriella obesa</i> 4	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	exponencial	516
105	<i>Kirchneriella obesa</i> 5	<i>Kirchneriella</i>	Selenastraceae	exponencial	516
106	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 6	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	605
107	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 7	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	605
108	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> 8	<i>Ankistrodesmus</i>	Selenastraceae	exponencial	605
109	<i>Messastrum gracile</i> 5	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	622
110	<i>Messastrum gracile</i> 6	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	622
111	<i>Messastrum gracile</i> 7	<i>Messastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	622
112	<i>Selenastrum bibraianum</i> 5	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	630
113	<i>Selenastrum bibraianum</i> 6	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	630
114	<i>Selenastrum bibraianum</i> 7	<i>Selenastrum</i>	Selenastraceae	exponencial	630
115	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_1	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	exponencial	663
116	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_2	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	exponencial	663
117	<i>Dictyosphaerium</i> sp1_3	<i>Dictyosphaerium</i>	Chlorellaceae	exponencial	663
118	<i>Microcystis aeruginosa</i> 1	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	exponencial	NA
119	<i>Microcystis aeruginosa</i> 2	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	exponencial	NA
120	<i>Microcystis aeruginosa</i> 3	<i>Microcystis</i>	Microcystaceae	exponencial	NA
121	<i>Cryptomonas</i> sp1	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	exponencial	NA
122	<i>Cryptomonas</i> sp2	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	exponencial	NA
123	<i>Cryptomonas</i> sp3	<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadaceae	exponencial	NA