

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE HIDROBIOLOGIA

ISRAEL CASSIANO DE OLIVEIRA

**EFEITO DO AUMENTO DE TEMPERATURA SOBRE A MATÉRIA ORGÂNICA
DISSOLVIDA FLUORESCENTE PRODUZIDA POR MICROALGAS DE ÁGUA
DOCE EM CULTIVOS AXÊNICOS**

SÃO CARLOS - SP

2023



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCCB/CCBS/R

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518304 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 23/2023/CCCB/CCBS/R

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISRAEL CASSIANO DE OLIVEIRA

EFEITO DO AUMENTO DE TEMPERATURA SOBRE A MATÉRIA ORGÂNICA EXSUDADA POR MICROALGAS DE
ÁGUA DOCE EM CULTIVOS AXÊNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 31 de outubro de 2023

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmento
Membro da Banca 1	Cristina Romera-Castillo
Membro da Banca 2	Michaela Ladeira de Melo



Documento assinado eletronicamente por **Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmento, Docente**, em 31/10/2023, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1252451** e o código CRC **63C0A0D2**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.038462/2023-32

SEI nº 1252451

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Michaela Ladeira de Melo



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COORDENAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCCB/CCBS/R

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518304 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 23/2023/CCCB/CCBS/R

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISRAEL CASSIANO DE OLIVEIRA

EFEITO DO AUMENTO DE TEMPERATURA SOBRE A MATÉRIA ORGÂNICA EXSUDADA POR MICROALGAS DE
ÁGUA DOCE EM CULTIVOS AXÊNICOS

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 31 de outubro de 2023

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Hugo Miguel Preto de Morais Sarmiento
Membro da Banca 1	Cristina Romera-Castillo
Membro da Banca 2	Michaela Ladeira de Melo



Documento assinado eletronicamente por **Hugo Miguel Preto de Morais Sarmiento, Docente**, em 31/10/2023, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1252451** e o código CRC **63C0A0D2**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.038462/2023-32

SEI nº 1252451

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

ROMERA
CASTILLO
CRISTINA
77338473F

Firmado digitalmente por
ROMERA CASTILLO CRISTINA -
77338473F
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=dCES-77338473F,
givenName=CRISTINA,
sn=ROMERA CASTILLO,
cn=ROMERA CASTILLO CRISTINA
77338473F
Fecha: 2023.11.27 15:45:13
+01'00'

Israel Cassiano de Oliveira

Efeito do aumento de temperatura sobre a matéria orgânica dissolvida fluorescente produzida por microalgas de água doce em cultivos axênicos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Hugo Sarmento

Coorientadora: Inessa Lacativa Bagatini

São Carlos - SP
2023

A professoras, professores e todas as pessoas
que esmeradamente despertaram em mim
o respeito e apreço pela natureza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ubirajara e Cidinha, por todo amor e dedicação, pelas incontáveis orações, pelos ensinamentos, por se fazerem presentes sobretudo nos momentos mais importantes da minha vida e por apoiarem minhas escolhas. Agradeço à Miriã, a melhor irmã que eu poderia ter, pela amizade e amor, pelas conversas, abraços, risadas e lágrimas compartilhadas e por me aguentar contando um monte de curiosidades sobre biologia. Aos meus avós Rubens e Zilah, pelo afeto e por terem investido generosamente na minha educação desde minha infância e me acolhido nos primeiros anos de faculdade. Aos meus tios Haydée e Bernardo, pelos bons momentos compartilhados e pelo apoio.

Agradeço ao Prof. Dr. Hugo Sarmiento e à Prof^a Dr^a Inessa Lacativa Bagatini que, ao me orientarem, contribuíram de forma valiosa e imprescindível para esta e outras investigações desde sua concepção. Também sou profundamente grato pela amizade e por todos os conhecimentos teóricos e práticos que me transmitiram, essenciais para minha construção – em andamento – enquanto biólogo e pesquisador. Agradeço à Dr^a Cristina Romera Castillo e à Dr^a Michaela Ladeira de Melo, integrantes da banca avaliadora deste trabalho, pela solicitude e pelas valiosas contribuições.

Agradeço a Adriana Miwa e Prof. Maria do Carmo Calijuri, do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes da USP, pelo apoio nas análises de carbono orgânico dissolvido. Agradeço a Fábio Lourenço Villaverde, técnico do LMPB, e a Antônio Luiz Sartori, técnico do Laboratório de Ficologia, pelo suporte para a realização dos experimentos. Agradeço a Jaqueline, Daniel, Douglas, Leonardo e à Prof^a Ana Teresa Lombardi, do Laboratório de Biotecnologia de Algas, por ajuda com o equipamento para as medições de luz. Agradeço à Cinthia e ao Renan, do Laboratório de Plâncton, pela parceria no uso das BODs, da água deionizada e dos corantes da citometria.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo investimento nesta pesquisa de Iniciação Científica (processo 2022/16279-3). Agradeço também à Coordenadoria dos Programas de Iniciação Científica e Tecnológica (CoPICT), ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da UFSCar e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e institucional durante a realização de minha primeira Iniciação Científica, durante a qual foram consolidados muitos conhecimentos fundamentais para a realização do presente trabalho.

Agradeço a todos aqueles que tenho a felicidade de chamar de amigos. Na graduação, Hiago, Isa, Jac, Príncia e Vitão, pessoas talentosíssimas e amáveis com quem dividi momentos inesquecíveis e aprendi tantas coisas. Nos laboratórios (e agregados), Camila, Fernanda, Greyce, Karime, Isabela, Eloísa, Mariana, Daniel, Erick, Clara, Paula, Edna, Pedro, Célio, Bárbara, Sarah, Juliana, Maryssa, Thaís, Lucas, Nathan, Rodrigo, Ana Beatriz, Ana Eliza e Ana Luisa, pessoas incríveis com as quais tenho muitas memórias boas, aprendi muitas coisas – desde corriqueiras até grandes lições – e com algumas ainda tenho o prazer de conviver. Ao Ícaro, amigo e grande companheiro durante minha primeira IC, quero registrar meu agradecimento especial pelo tempo que dividimos, pelo trabalho que desenvolvemos juntos e pelos conhecimentos adquiridos. Também não posso deixar de reforçar meus agradecimentos à Eloísa, que participou em vários pontos deste estudo, sendo de grande ajuda.

Agradeço à minha psicóloga, Thaís, por ter me acompanhado nesses últimos anos em uma jornada transformadora de (auto)descobertas; me ajudado a lidar com as frustrações, tristezas e medos, estivessem eles relacionados ou não a esta pesquisa; e me ajudado a ser uma pessoa melhor comigo mesmo e para aqueles que amo.

Agradeço à *Microcystis aeruginosa* e à *Cyclotella* sp. que, apesar de terem dado trabalho, entregaram tudo. E aos equipamentos por não terem pifado nem estourado durante as análises e experimentos, me pouparam de um problemão.

Agradeço a Deus por ter cuidado de mim de forma misteriosa e concedido sua bênção ao meu trabalho e à minha graduação.

RESUMO

A matéria orgânica dissolvida (DOM, do inglês *Dissolved Organic Matter*) abrange uma vasta gama de moléculas de origem biológica e é a forma de carbono mais abundante e biodisponível em ambientes aquáticos. A DOM desempenha papel-chave no ciclo do carbono, pois influencia o pH e a penetração de luz na coluna d'água, exercendo efeitos sobre a produtividade primária, e constitui a fonte primária de energia para microrganismos heterotróficos. O fitoplâncton, através de seu metabolismo ou morte celular, representa uma importante fonte de DOM para sistemas aquáticos. Porém, pouco se sabe ainda sobre a composição destes substratos orgânicos e quais os fatores que regulam sua produção e qualidade, principalmente sob a perspectiva de mudanças climáticas globais. Pequenas alterações na DOM fitoplanctônica (DOMp), desencadeadas por mudanças em fatores ambientais, podem causar modificações na estrutura do microbioma e, portanto, nos fluxos de carbono nas teias tróficas aquáticas – ou seja, no ciclo do carbono. A fim de examinar as consequências do aumento de temperatura na DOMp, cultivos axênicos de *Microcystis aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram submetidos a experimentos de aquecimento de +4°C, com e sem aclimação prévia, e analisados pelas técnicas de citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência e quantificação de carbono orgânico dissolvido em diferentes pontos da curva de crescimento. Identificaram-se 2 componentes fluorescentes de caráter protéico e 2 componentes de caráter húmico/fúlvico. Constatou-se que, ao passo de que a composição da DOMp varia mais acentuadamente em função dos estágios de crescimento, a temperatura parece induzir alterações sobre a biodisponibilidade e taxa de excreção de carbono nos exsudatos. Os valores de alguns índices óticos e razões espectrais divergiram dos reportados para fitoplâncton, o que possui implicações importantes para o entendimento da DOM de águas naturais. Além disso, alguns fluoróforos tipicamente associados compostos húmicos parecem incluir outras substâncias de natureza e origem distintas, potencialmente relacionadas ao estresse oxidativo. Espera-se que os resultados obtidos nessa investigação proporcionem um avanço no entendimento dos processos de produção de DOMp, ajudem a aperfeiçoar a interpretação de dados de propriedades óticas da DOM em ambientes naturais e contribuam para uma melhor compreensão do impacto das mudanças climáticas sobre porções-chave do ciclo do carbono.

Palavras-chave: Matéria Orgânica Dissolvida. PARAFAC, Mudanças Climáticas. Fitoplâncton. Ciclo do Carbono.

RESUMEN

La materia orgánica disuelta (DOM, del inglés *Dissolved Organic Matter*) abarca una amplia gama de moléculas de origen biológico y es la forma de carbono más abundante y biodisponible en los medios acuáticos. La DOM desarrolla papeles-clave en el ciclo del carbono, ya que influye en el pH y en la penetración de la luz en la columna de agua, ejerciendo efectos sobre la productividad primaria, y constituye la principal fuente de alimento para los microorganismos heterótrofos. El fitoplancton, por medio de su metabolismo o muerte celular, representa una importante fuente de DOM para los sistemas acuáticos. Sin embargo, poco se sabe sobre la composición de estos sustratos orgánicos y los factores que regulan su producción y calidad, especialmente desde la perspectiva del cambio climático global. Pequeños cambios en la DOM fitoplanctónica (DOMp), provocados por cambios en los factores ambientales, pueden causar modificaciones en la estructura del microbioma y, por tanto, en los flujos de carbono en las redes tróficas acuáticas, es decir, en el ciclo del carbono. Para examinar las consecuencias del aumento de temperatura en la DOMp, se sometieron cultivos axénicos de *Microcystis aeruginosa* y *Cyclotella* sp. a experimentos de calentamiento a +4°C, con y sin aclimatación previa, y se analizaron mediante citometría de flujo, espectroscopia de fluorescencia y cuantificación del carbono orgánico disuelto en distintos puntos de la curva de crecimiento. Se identificaron 2 componentes de proteínas fluorescentes y 2 componentes húmicos/fúlvicos. Se observó que, mientras que la composición de DOMp varía más marcadamente según la fase de crecimiento, la temperatura parece inducir cambios en la biodisponibilidad y la tasa de liberación de carbono en los exudados. Los valores de algunos índices ópticos y relaciones espectrales difirieron de los comunicados para el fitoplancton, lo que tiene importantes implicaciones para comprender la DOM en aguas naturales. Además, algunos fluoróforos típicamente asociados a los compuestos húmicos parecen incluir otras sustancias de naturaleza y origen diferentes, potencialmente relacionadas con el estrés oxidativo. Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación permitan avanzar en la comprensión de los procesos de producción de DOMp, ayuden a mejorar la interpretación de los datos de propiedades ópticas de DOM en aguas naturales y contribuyan a una mejor comprensión del impacto del cambio climático en partes clave del ciclo del carbono.

Palabras clave: Materia orgánica disuelta fluorescente. Cambio climático. Fitoplancton. Ciclo del carbono.

ABSTRACT

Dissolved organic matter (DOM) encompasses a wide range of biologically derived molecules and is the most abundant and bioavailable form of carbon in aquatic environments. DOM plays a key role in the carbon cycle, as it influences pH and light penetration in the water column, affecting primary productivity, and serves as the primary energy source for heterotrophic microorganisms. Phytoplankton, through its metabolism or cellular death, represents a major source of DOM for aquatic systems. However, little is still known about the composition of these organic substrates and the factors that regulate their production and quality, especially from the perspective of global climate change. Small changes in phytoplankton-derived DOM (DOMp), triggered by changes in environmental factors, can cause shifts in microbiome structure and, therefore, carbon fluxes in aquatic food webs – thus, in the carbon cycle. To examine the consequences of temperature increase on DOMp, axenic cultures of *Microcystis aeruginosa* and *Cyclotella* sp. were subjected to +4°C warming experiments, with and without prior acclimation, and analyzed using flow cytometry, fluorescence spectroscopy, and quantification of dissolved organic carbon at different growth stages. Two proteinaceous fluorescent components and two humic/fulvic-like components were identified. While the composition of DOMp varies more pronouncedly with growth stages, temperature appears to induce changes in the bioavailability and carbon exudation rate of exudates. Values of some optical indices and spectral ratios differed from those reported for phytoplankton, which has important implications for understanding DOM in natural waters. Additionally, some fluorophores typically associated with humic compounds appear to include other substances of different nature and origin, potentially related to oxidative stress. It is expected that the results obtained in this investigation will advance the understanding of DOMp production processes, help refine the interpretation of DOM optical property data in natural environments, and contribute to a better understanding of the impact of climate change on key portions of the carbon cycle.

Keywords: Dissolved Organic Matter, PARAFAC, Climate Change, Phytoplankton, Carbon Cycle.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 HIPÓTESES	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS	20
3.1.1 MEIO DE CULTIVO	20
3.1.2 CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ILUMINAÇÃO	21
3.1.3 GARANTIA DE CONDIÇÃO AXÊNICA	24
3.2 PILOTO: REGISTRO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO	25
3.3 PREPARAÇÃO: ACLIMATAÇÃO	26
3.4 EXPERIMENTOS	27
3.4.1 CITOMETRIA DE FLUXO	29
3.4.1 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E MEDIÇÕES DE DOC	30
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4 RESULTADOS	32
4.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E PLANO DE AMOSTRAGEM	32
4.2 DOC	34
4.3 FDOM	37
4.3.1 COMPONENTES	37
4.3.2 ÍNDICES ÓPTICOS	42
4.3.1 RAZÕES ESPECTRAIS	47
4.4 ROS	50
5 DISCUSSÃO	52
5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E PLANO DE AMOSTRAGEM	52
5.2 DOC	52
5.3 FDOM	53
5.4 ROS	58
6 CONCLUSÕES	58
7 REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA: CONCEITUAÇÃO E RELEVÂNCIA

O carbono é o elemento chave da biosfera, pois é extremamente abundante e presente em todas as formas de vida conhecidas. Seu ciclo biogeoquímico está intrinsecamente ligado à regulação do clima, compreendendo uma rede complexa de processos, fluxos e interconversões em formas orgânicas e inorgânicas (e.g. COLE; HARARUK; SOLOMON, 2021; WONG *et al.*, 2019). Nos ecossistemas aquáticos, esse elemento pode ser encontrado em 3 formas distintas: carbono inorgânico dissolvido (como íons bicarbonato), carbono orgânico particulado (que integra a matéria orgânica particulada, composta por detritos lenhosos e de folhiço), e carbono orgânico dissolvido (DOC, do inglês *Dissolved Organic Carbon*, que é aquele que compõe as moléculas da matéria orgânica dissolvida, DOM) (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011).

No ambiente natural não existe uma fronteira que separe os materiais particulados e dissolvidos, uma vez que se trata de um gradiente, um contínuo de tamanho desde partículas macroscópicas a moléculas de diversas composições químicas. A distinção entre essas porções é uma convenção: a fração que atravessa um filtro de 45µm de poro é considerada dissolvida, e a fração retida é considerada particulada. Portanto, a definição de DOM é operacional (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011; HAN *et al.*, 2022).

O conceito de “matéria orgânica dissolvida” é abrangente, pois se refere a uma mistura complexa de inúmeros polímeros aromáticos e alifáticos de origem biológica, com ampla variação química e espaço-temporal, que representa o maior *pool* de carbono orgânico nos ecossistemas aquáticos (COBLE, 2007; LI; HUR, 2017; KELSO; ROSI; BAKER, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2021; STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003). Estima-se que a DOM seja composta majoritariamente por ácidos húmicos e fúlvicos diversos, mas aminoácidos, proteínas, mono e polissacarídeos, lipídeos, vitaminas e toxinas também estão presentes (ARTIFON; ZANARDI-LAMARDO; FILLMANN, 2019; CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2021; MYKLESTAD, 2005).

Justamente por sua variabilidade e complexidade de estruturas químicas, a DOM está envolvida em uma série de processos no ambiente natural, tais como tamponar o pH aquático (AIKEN, 2014), alterar a penetração de radiação ultravioleta na coluna d'água, influenciando a produtividade primária e prevenindo danos ao DNA celular (ROMERA-CASTILLO *et al.*, 2011; YATES *et al.*, 2019), fornecer nutrientes para micro-heterótrofos (EIGEMANN *et al.*,

2022; D'ANDRILLI *et al.*, 2019), e interagir com poluentes e metais-traços, influenciando seus destinos (ARTIFON; ZANARDI-LAMARDO; FILLMANN, 2019; PERELOMOV *et al.*, 2018). Outro aspecto importante é a preocupação concernente ao tratamento de água em estações de saneamento, pois a DOM reage com desinfetantes químicos adicionados à água e forma subprodutos indesejáveis ou mesmo nocivos à saúde humana. Alguns desses subprodutos são os trihalometanos, os ácidos haloacéticos e o clorofórmio, produzidos pela reação entre o cloro e substâncias húmicas da DOM (AWAD *et al.*, 2016; DIANA; FELIPE-SOTELO; BOND, 2019; SRIBOONNAK *et al.*, 2021; YOUSIF; AL-MUSAWI, 2021).

As parcelas cromofórica e fluorescente da DOM (CDOM e FDOM) têm sido amplamente investigadas nos últimos anos (fig. 1), proporcionando avanços significativos na compreensão de porções do ciclo do carbono. Apesar de estimar-se que representa apenas ~1% do total, a FDOM engloba a maioria dos componentes-chave da DOM. Isso ocorre porque os fluoróforos – isto é, os elementos e arranjos moleculares que conferem fluorescência às moléculas – recorrentemente são grupos funcionais aromáticos, indicadores tanto de alterações físico-químicas no ambiente aquático (por sua reatividade) como das fontes da DOM (CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011 *apud* LEE *et al.*, 2018; LI; HUR, 2017; YANG *et al.*, 2021; COBLE, 2007).

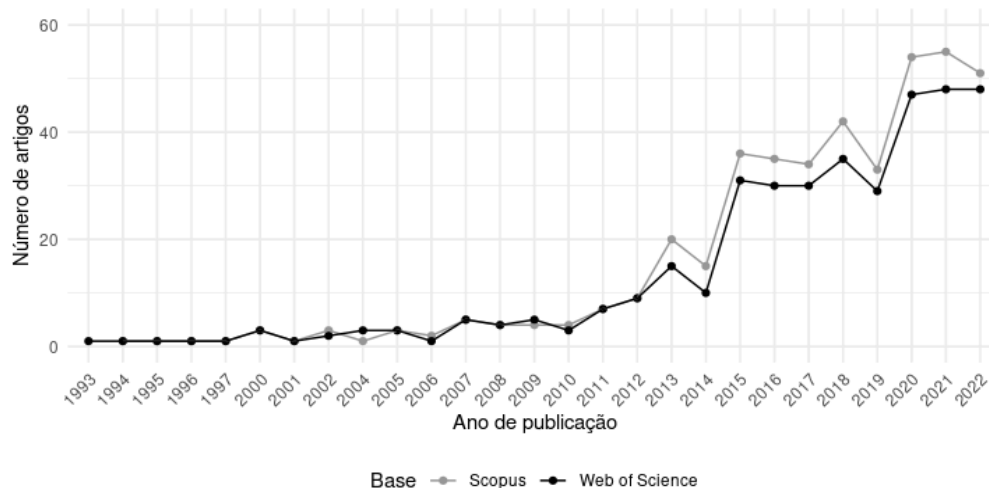


Figura 1 – Número de artigos publicados em cada ano contendo o termo “FDOM” no título, no resumo ou nas palavras-chave. Dados obtidos nas bases de periódicos Scopus e Web of Science, em 14 de setembro de 2023. Elaborado pelo autor.

A FDOM pode ser estudada em detalhe pela espectroscopia de fluorescência, aliada à Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC). Nesse método, a espectroscopia de fluorescência fornece matrizes de excitação-emissão (EEMs) para cada amostra. Tais matrizes permitem representar, por meio de uma superfície topográfica, a intensidade de emissão da amostra, em diferentes comprimentos de onda, ao ser excitada por um espectro eletromagnético emitido em série (fig. 2a) (COBLE, 2007; CORY; BOYER; MCKNIGHT, 2011; DALMAGRO *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021).

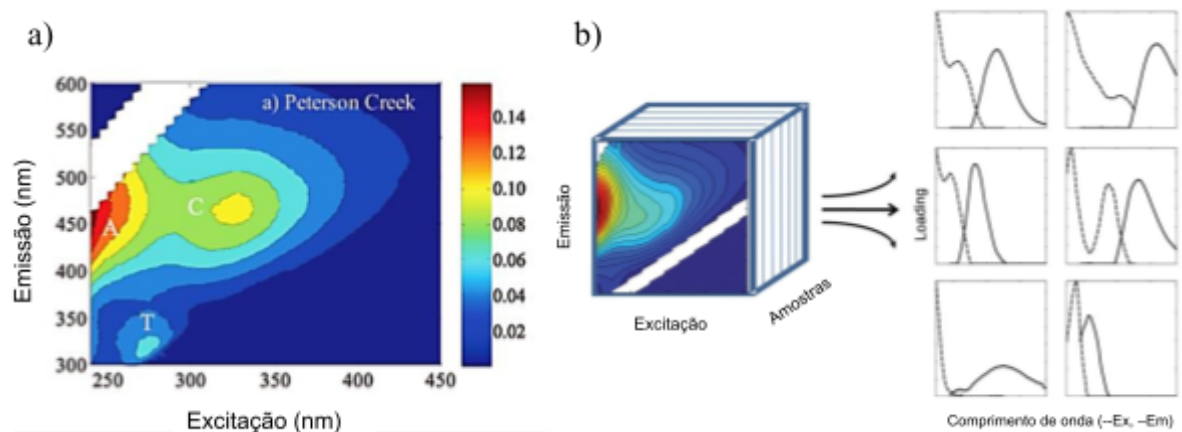


Figura 2 – Ilustrações de EEMs e do processo da PARAFAC. **a)** Exemplo de EEM obtido de amostra fluvial, exibindo picos característicos indicados por letras e com escala de intensidade expressa em unidades Raman. Modificado de Fellman, Hood & Spencer (2010). **b)** Ilustração esquematizando a aplicação do método de PARAFAC, decompondo uma série de EEMs em seis componentes subjacentes. Modificado de Murphy *et al.*, (2014).

Então, com a aplicação da PARAFAC, numerosas EEMs são sincronizados e analisados (fig. 2b), permitindo identificar grupos de fluoróforos covariantes e associá-los a picos característicos, referidos na literatura como componentes, motivos, sinais, assinaturas ou “impressões digitais”, elencados na tabela 1 (COBLE, 1996; COBLE, 2007; MURPHY *et al.*, 2014; SCISCENKO *et al.*, 2022; STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003). Essa técnica tem se mostrado bastante vantajosa pela rapidez e baixo custo, além do pequeno volume necessário por alíquota e por exigir menor esforço de obtenção, manejo e armazenamento, reduzindo o risco de alteração do material por contaminação ou degradação – e, por outro lado, fornece dados abundantes, precisos e úteis para diversas análises (BAKER; SPENCER, 2004; GABOR *et al.*, 2014; FELLMAN; HOOD; SPENCER, 2010; COBLE, 2007).

Tabela 1 – Picos comumente referidos e região de localização para componentes de EEMs obtidos de substâncias húmicas aquáticas e DOM.

Nome	λ_{ex} máx.(nm)	λ_{em} máx. (nm)	Descrição
A	260	400 – 460	Ácidos húmicos, fúlvicos e similares ^a
B	275	305	Tirosina e similares ^a
C	320 – 360	420 – 460	Ácidos húmicos e similares ^a
D	390	509	Ácido fúlvico edáfico ^b
E	455	521	Ácido fúlvico edáfico ^b
M	290 – 310	370 – 410	Ácidos húmicos microbianos ou marinhos (e similares) ^{ac}
N	280	370	Derivado de plâncton ^b
T	275	340	Triptofano e similares ^a

Modificado de AIKEN, 2017. ^aCoble (2007), ^bStedmon, Markager & Bro (2003), ^cYamashita *et al.* 2008.

1.2 O FITOPLÂNCTON COMO FONTE DE DOM

Além da caracterização química, a DOM pode ser classificada de acordo com suas fontes. Quando surge da degradação de detritos vegetais e edáficos e é levada aos corpos d'água por lixiviação ou erosão, é dita de origem terrestre (alóctone). Por outro lado, quando oriunda do metabolismo dentro do ecossistema aquático, é categorizada como autóctone. Esse segundo tipo de DOM é majoritariamente produzida por fitoplâncton (mas também por macrófitas), visto que tais organismos produzem uma enorme gama de moléculas orgânicas a partir da fixação do dióxido de carbono (BERTILSSON; JONES, 2003; MYKLESTAD, 2005; MORANA *et al.*, 2014; SARMENTO; MORANA; GASOL, 2016).

Parte desses produtos é liberada para o ambiente através da exsudação, processo cujas explicações permanecem hipotéticas, mas pensa-se que é resulta da combinação de processos naturais de vazamento passivo e de transporte ativo de diferentes substâncias através da membrana plasmática (EIGEMANN *et al.*, 2022; MÜHLENBRUCH *et al.*, 2018; THORNTON, 2014). Tais produtos têm recebido diversas denominações na literatura recente: metabólitos extracelulares ou exometabólitos (PERERA *et al.*, 2022; SMUTNA *et al.*, 2021),

exsudatos (CALFEE; GLASGO; ZINSER, 2022; SARMENTO; GASOL, 2012), DOC fotossinteticamente produzido (PDOC) (KANG *et al.*, 2022), DOM derivada de fitoplâncton (DOMp) (EIGEMANN *et al.*, 2022; TADA *et al.*, 2017), matéria orgânica algal (AOM) (VILLACORTE *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018), ou substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também chamadas de exopolímeros, mais precisamente descritas como precursores imediatos da DOMp (YANG *et al.*, 2021).

Esse pool de compostos orgânicos é a fonte preferencial de carbono para procariontes heterotróficos, dentre os quais podemos encontrar táxons especialistas, adaptados ao consumo de DOMp de espécies particulares de fitoplâncton; mas também táxons generalistas, que respondem mais a variações na concentração do que na composição de DOMp disponível (BAGATINI *et al.*, 2014; EIGEMANN *et al.*, 2022; ROMERA-CASTILLO *et al.*, 2011; SARMENTO; GASOL, 2012; SARMENTO; MORANA; GASOL, 2016; TADA *et al.*, 2017; TISSERAND *et al.*, 2020). Em contrapartida, bactérias providenciam nutrientes essenciais e cofatores que promovem crescimento e proliferação do fitoplâncton. Um exemplo disso é a interação de bactérias dos gêneros *Sulfitobacter*, *Phaeobacter* e *Roseobacter* com diatomáceas e dinoflagelados, que resultam até mesmo em uma reprogramação metabólica e transcricional do fitoplâncton (AMIN *et al.*, 2015; JOHANSSON *et al.*, 2019; SHIBL *et al.*, 2020).

A composição da DOMp varia em função da espécie, sendo similar entre táxons filogeneticamente relacionados, e também ao longo dos estágios de crescimento, e pode incluir peptídeos, aminoácidos livres, mono e polissacarídeos, ácidos graxos, esteróis, toxinas, lipídeos e ácidos húmicos (MYKLESTAD, 2005; ROMERA-CASTILLO *et al.*, 2009; THORNTON, 2014; BECKER *et al.*, 2014). Mudanças no tipo e quantidade de proteínas, aminoácidos e polissacarídeos liberados, além de diferenças no peso molecular, biodisponibilidade e grau de aromaticidade são alguns dos principais parâmetros da DOM que se alteram entre espécies de fitoplâncton (CAHYONUGROHO; HARIYANTO; SUPRIYANTO, 2022; ROMERA-CASTILLO *et al.*, 2009). Além disso, a composição e biodisponibilidade dos exsudatos é alterada por fatores bióticos, como senescência e lise celular, predação (“*sloppy feeding*”) e lise viral, que causam o extravasamento do citoplasma (BERTILSSON; JONES, 2003; JIAO *et al.*, 2010; SUTTLE, 2007; XIAO *et al.*, 2021); e por fatores abióticos, como temperatura, disponibilidade de nutrientes, condições de iluminação e pH (THORNTON, 2014).

Outro fator biótico importante é a variação na permeabilidade da membrana plasmática, fator observado em células senescentes, por exemplo. Essas variações são tidas como uma das principais responsáveis por influenciar a taxa de liberação de DOM por difusão, permitindo a passagem de moléculas menores e não carregadas. Entretanto os fatores que afetam a permeabilidade das membranas celulares do fitoplâncton e a subsequente difusão de matéria orgânica são em grande parte desconhecidos (ANDERSON; WILLIAMS, 1998; THORNTON, 2014).

1.3 DOM FITOPLANCTÔNICA E A MUDANÇA CLIMÁTICA

Uma vez que fatores ambientais desempenham papéis-chave no controle da produção e liberação de DOMp (MORANA *et al.*, 2014), espera-se que o fenômeno das mudanças climáticas provoque mudanças diretas e indiretas nos padrões de exsudação do fitoplâncton, seja alterando a quantidade de matéria orgânica exportada, seja remodelando sua composição, ou ambos. Tais modificações podem estar ligadas a alterações metabólicas decorrentes do aumento de temperatura (TOSELAND *et al.*, 2013) ou à ocorrência de florações algais (*blooms*) que podem modificar a composição da comunidade fitoplanctônica (TROMBETTA *et al.*, 2019). Essas alterações na DOMp, mesmo se pequenas, podem desencadear mudanças na composição das comunidades microbianas (especialmente em relação a bactérias) e alterar a eficiência e intensidade dos fluxos de carbono nas teias tróficas aquáticas – e, por consequência, porções significativas do ciclo do carbono (LANDA *et al.*, 2016; SARMENTO; GASOL, 2012; TISSERAND *et al.*, 2020).

Projeções do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) estimam um aumento na temperatura média da superfície global ao final do século XXI de até 5°C em relação aos níveis pré-industriais (1850-1900) (IPCC, 2021; IPCC, 2022). Considerando que na última década observou-se um aquecimento de cerca de 1°C na temperatura média da superfície global em relação aos níveis pré-industriais, calcula-se um aumento de até 4°C ao final do século em relação aos valores atuais (IPCC, 2021; IPCC, 2022).

Para identificar os impactos dessas mudanças sobre a dinâmica e composição tanto do fitoplâncton como de todo microbioma aquático, um número crescente de investigações tem sido realizado em mesocosmos em ecossistemas temperados, frequentemente combinando aquecimento e mudanças de estado trófico (DIEHL *et al.*, 2022; FEUCHTMAYR *et al.*, 2019; URRUTIA-CORDERO *et al.*, 2020; VIJAYARAJ *et al.*, 2022; YVON-DUROCHER;

SCHAUM; TRIMMER, 2017). Há também uma extensa literatura a respeito dos efeitos da temperatura sobre o tamanho celular e as taxas de crescimento do fitoplâncton, fruto de numerosas investigações conduzidas ao longo dos últimos 50 anos (EPPLEY, 1972; HILLEBRAND, 2021; MOUSING; ELLEGAARD; RICHARDSON, 2014; PETER; SOMMER, 2012; SHERMAN *et al.*, 2016; YVON-DUROCHER *et al.*, 2011; ZOHARY; FLAIM; SOMMER, 2021). Todavia, os impactos da elevação de temperatura ambiental sobre a produção de DOMp ainda são pouco conhecidos.

1.4 PONDERAÇÕES SOBRE A DELIMITAÇÃO DO ESTUDO

A Coleção de Culturas de Água Doce do Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar) abriga uma das maiores coleções axênicas de microalgas de água doce do mundo. Este valioso acervo torna possível a realização de experimentos, como por exemplo, testar o efeito individual do estresse térmico na produção de exsudatos de diferentes espécies de microalgas. Assim, essa abordagem tem uma vantagem sobre experimentos em mesocosmos ou estudos de campo, pois embora tais estudos sejam bastante profícuos, há pouco controle sobre o sistema, e então avaliar o efeito individual de cada variável ambiental (temperatura, luz, pH...) e discernir com exatidão as fontes de DOM torna-se uma tarefa complicada.



Figura 3 – Diferentes estratégias de pesquisa organizadas em um espectro. À medida que se move do laboratório ao campo perde-se controle mas ganha-se complexidade. Um exemplo de "whole-ecosystem experiments" pode ser encontrado em O'CONNELL *et al.*, 2020. Autoria própria.

Experimentos em microcosmos ou com cultivos de espécies isoladas permitem um controle maior dos estressores e dos fatores bióticos e abióticos. Em contrapartida, a redução da complexidade do sistema leva à perda de propriedades emergentes. No entanto, essa desvantagem pode ser parcialmente compensada ao eleger espécies-chave ou organismos de grupos funcionais representativos na realização dos experimentos (ALLEN *et al.*, 2021; MOUSING; ELLEGAARD; RICHARDSON, 2014; VIJAYARAJ *et al.*, 2022). Considerando

a dualidade controle-complexidade, podemos ordenar diferentes abordagens de investigação em um espectro, conforme o esquema simplificado na figura 3.

Neste contexto, podemos colocar em perspectiva cada tipo de pesquisa e combinar estratégias de diferentes pontos desse espectro de forma complementar – interpretando conjuntamente os resultados obtidos para formular explicações mais robustas, que contemplem vários níveis de organização – e, desse modo, aprimorar e expandir o conhecimento atual sobre o funcionamento e constituição do microbioma aquático.

Por meio da abordagem proposta, as respostas da exsudação fitoplanctônica ao aumento de temperatura são isoladas das respostas a outros estressores e, assim, podem ser descritas, esclarecendo a influência particular da temperatura sobre a DOMp. Essas informações serão úteis tanto para interpretar a resposta de sistemas mais complexos a aquecimentos experimentais como para aperfeiçoar previsões sobre a atuação do fitoplâncton no balanço global de carbono no contexto das mudanças climáticas. Em adição, a caracterização da DOMp de água doce contribui para expandir dados a esse respeito, que atualmente são escassos, e também para facilitar a busca pela origem de sinais fluorescentes em águas naturais, as quais recebem matéria orgânica de inúmeras fontes.

1.1 HIPÓTESES

Para esta investigação, estabelecemos 3 hipóteses principais:

- a) Espera-se que o aquecimento exerça efeito majoritário sobre a concentração de DOMp fluorescente, ao passo de que as mudanças na composição sejam ocasionadas principalmente pelos diferentes estágios de crescimento;
- b) Espera-se que moléculas menores e difusíveis pela membrana celular estejam mais presentes na DOMp em temperaturas maiores, uma vez que o aquecimento aumenta a fluidez das bicamadas lipídicas;
- c) Supõe-se que concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) será maior na linhagem não aclimatada em relação à linhagem aclimatada e, em ambas, os valores serão maiores que o da linhagem controle – em todos os casos exibindo variações ao longo dos estágios de crescimento”.

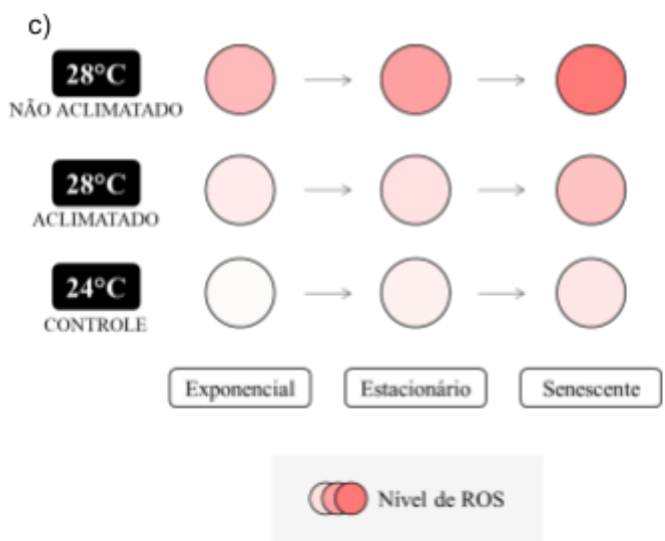
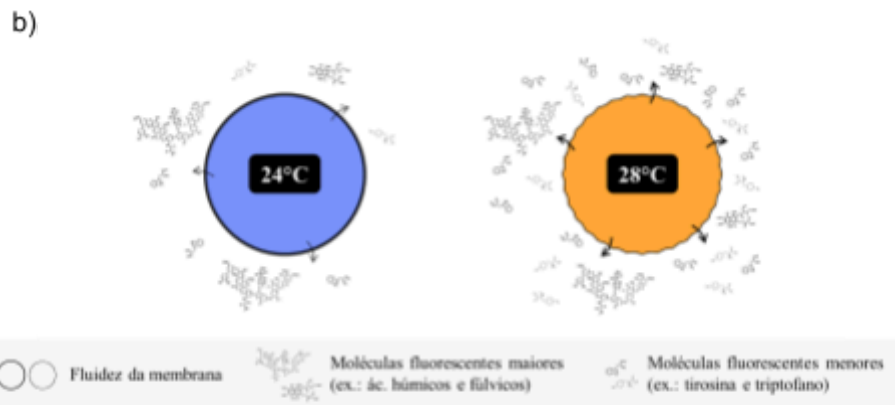
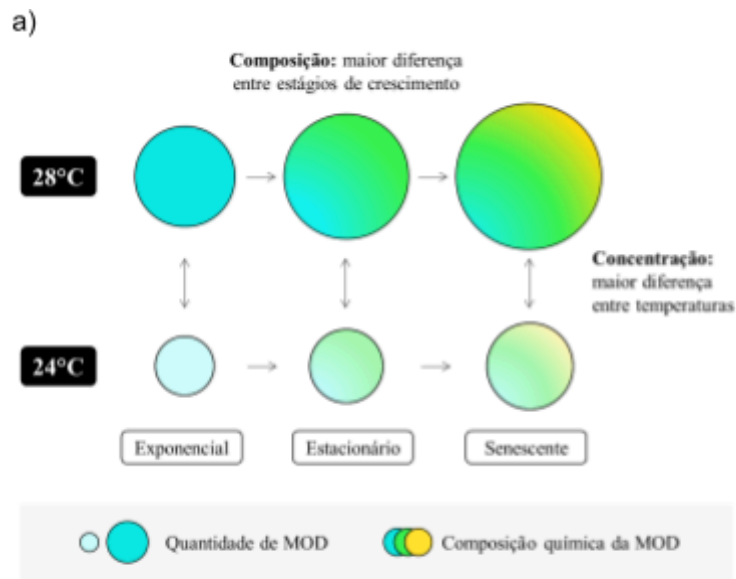


Figura 4 – Esquemas das três hipóteses. Elaborado pelo autor. O esquema b contém imagens extraídas de <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine>, <https://www.abcam.com/products/biochemicals/l-tryptophan-essential-amino-acid-ab146400.html> e <http://www.earthgreen.com/humic-vs-fulvic-acids>

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do aumento de temperatura sobre a produção DOMp em condições axênicas, portanto, separadamente dos processos de decomposição por outros microrganismos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar o efeito do aumento da temperatura sobre a concentração e composição da DOMp liberada por duas espécies cosmopolitas de fitoplâncton;
- 2) Verificar se o aumento da temperatura intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por fitoplâncton aclimatado e não-aclimatado a temperaturas superiores;
- 3) Caracterizar a DOM fluorescente derivada das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Cyclotella* sp. ao longo dos estágios de crescimento populacional em cultivo axênico
- 4) Contribuir com o banco de dados global OpenFluor (<https://openfluor.lablicate.com>) com dados sólidos a respeito da DOMp, de modo a apoiar a interpretação de dados coletados no ambiente natural.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos ensaios foram obtidas as cepas axênicas de *Microcystis aeruginosa* CCMA-UFSCar 666 (Cyanobacteria, Chroococcales) e *Cyclotella* sp. CCMA-UFSCar BB041 (Bacillariophyta, Mediophyceae, Stephanodiscales). Essas espécies foram escolhidas porque são organismos-modelo viáveis em cultivo e por isso empregados em estudos diversos (e.g. AMANO; TAKAHASHI; MACHIDA, 2011; CUI *et al.*, 2022; MESQUITA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017); são cosmopolitas em água doce (e.g. FAUSTINO *et al.* 2016; LI *et al.*, 2016; PAERL *et al.* 2001); são adequadas para análise em citômetro de fluxo, pois raramente ou nunca formam grandes colônias ou filamentos em cultivo; e genomas de espécies desses mesmos gêneros já foram sequenciados e estão disponíveis em bancos de dados. Na coleção, essas cepas são mantidas em 8 a 10 mL meio

WC em tubos de vidro de 20 mL de capacidade, sob iluminação com LED branca quente de aproximadamente $50 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, num ciclo de 12:12h (claro:escuro), a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Em linhas gerais, o experimento consistiu em amostrar os cultivos em quatro momentos distintos: 24h após a inoculação e durante os estágios exponencial, estacionário e senescente. Em cada um desses pontos, as amostras foram submetidas a análises de produção de ROS, contagem de células, caracterização de FDOM e quantificação de DOC. Para tal, o estudo foi realizado em três etapas: uma piloto (seção 3.2), uma de preparação (seção 3.3) e uma experimental (seção 3.4). Entretanto, alguns procedimentos são comuns a todas as etapas e estão descritos nas seções a seguir.

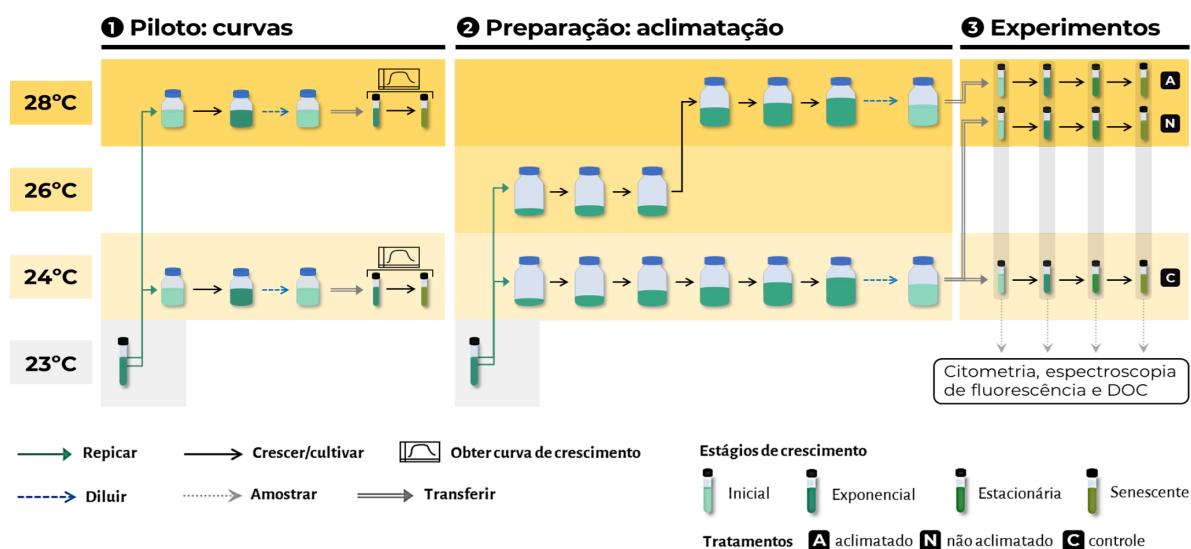


Figura 5 – Esquema geral das etapas do estudo, utilizando *M. aeruginosa* como exemplo. Elaborado pelo autor.

3.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

3.1.1 MEIO DE CULTIVO

Os cultivos utilizados nos experimentos foram mantidos em meio WC estéril (GUILLARD & LORENZEN, 1972), pH 7.0, cuja composição está descrita na tabela 2. Foram utilizados tubos de 10 mL de capacidade com 6 mL de meio a fim de proporcionar uma coluna de respiração para as trocas gasosas dos micro-organismos.

Tabela 2 – Composição do meio WC

Composto	Concentração (mg/L)	Composto	Concentração (mg/L)
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	36,76	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,022
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	36,97	CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,01
NaHCO ₃	12,60	MnCl ₂ • 4 H ₂ O	0,18
NaNO ₃	85,01	H ₃ BO ₃	1,0
Na ₂ SiO ₃ • 9 H ₂ O	28,42*	Tiamina	0,1
Na ₂ EDTA	4,36	Biotina	0,5 µg/L
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	3,15	Cobalamina	0,5 µg/L
CuSO ₄ • 5 H ₂ O	0,01		

Extraído de GUILLARD & LORENZEN, 1972.

3.1.2 CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ILUMINAÇÃO

A temperatura-controle de 24°C foi definida pela média de 4 anos da temperatura das águas superficiais do reservatório do Lobo (apêndice 1), em Itirapina-SP, cujo regime de temperatura é similar ao do local de isolamento das cepas utilizadas no estudo (Barra Bonita-SP). No reservatório do Lobo são realizadas coletas mensais desde 2018 como parte de um projeto de longo prazo desenvolvido pelo Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos (LMPB), do Departamento de Hidrobiologia (DHb) da UFSCar. Desse modo, a temperatura-tratamento adotada foi de 28°C, representando um aumento de 4°C, escolha que levou em consideração 3 fatores:

- a) O valor máximo fornecido pelo 6º e mais recente relatório de avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), na seção que aborda especificamente os principais riscos para os ecossistemas terrestres e de água doce (2.5.4) (PARMESAN *et al.*, 2022). Nela, exploram-se os efeitos de um aumento máximo de 5°C em relação a níveis pré-industriais (1850-1900), o que corresponde a uma elevação aproximada de 4°C em relação aos níveis atuais (2011-2020);

Key risks to terrestrial and freshwater ecosystems from climate change

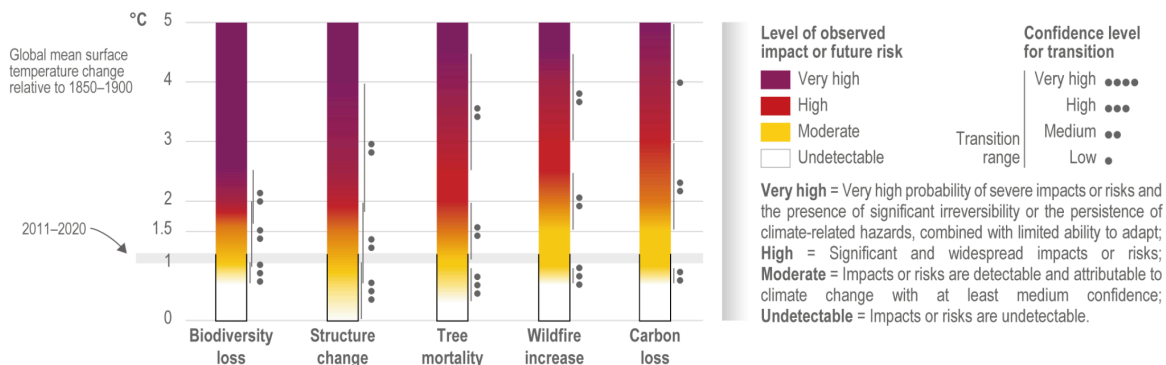


Figura 6 – Principais riscos das alterações climáticas para os ecossistemas terrestres e de água doce, de acordo com análises do IPCC. Fonte: Parmesan *et al.*, 2022.

- b) A amplitude térmica de 10.14°C medida no reservatório do Lobo, para que o aquecimento simulado nos experimentos fosse ao menos compatível com o auge do verão – uma vez que o prolongamento de estações quentes é também um dos efeitos esperados das mudanças climáticas. Dessa maneira, mesmo que não represente um cenário anormal e seja previsto pela variação normal da temperatura do lago, o aquecimento experimental poderá fornecer informações úteis;
- c) Estar em linha com vários estudos relativos a ambientes de água doce publicados recentemente, que também optaram pelo aumento de 4°C (ALLEN *et al.*, 2021; FEUCHTMAYR *et al.*, 2019; URRUTIA-CORDERO *et al.*, 2020; VIJAYARAJ *et al.*, 2022; YVON-DUROCHER *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018), para que os dados produzidos pelo presente estudo possam ser, em alguma medida, comparáveis.

Os cultivos foram mantidos em incubadoras BOD (Ethik Technology, modelos 411FPD e 411D), nas quais a variação de temperatura na água foi ajustada para $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com o auxílio de um sensor de temperatura MicroOptode (Unisense), conectado a um computador executando o software SensorTrace Suite (versão 3.4.300.19348, Unisense). Este equipamento foi acoplado a um tubo de ensaio de 10 mL preenchido por água destilada para monitorar a variação da temperatura na água ao longo de 24h, registrando os valores a cada 10 minutos (figuras 7 e 8). Constatando que a iluminação também funciona como uma fonte

de calor, a programação das incubadoras foi ajustada para compensar a energia térmica adicional (cerca de $+0,5^{\circ}\text{C}$) e estabilizar a temperatura o mais próximo à desejada (24, 26 ou 28°C), com variação de cerca de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (desvio-padrão calculado a partir dos dados de 24h).

Para a fonte de luz, foram confeccionados três painéis de iluminação utilizando 3 tábuas de madeira suportando 7 fitas LED de luz branca quente conectadas em série (figura 9a). Para obter uma iluminação difusa, 3 chapas de acrílico transparente foram cobertas com duas camadas de papel manteiga cada. Estas duas peças foram posicionadas nas incubadoras conforme a figura 9b. Aqui cabe mencionar que as fitas LED não emitem quantidades detectáveis de radiação UVA, UVB e UVC, assim os efeitos de fotodegradação sobre a FDOM podem ser desconsiderados.

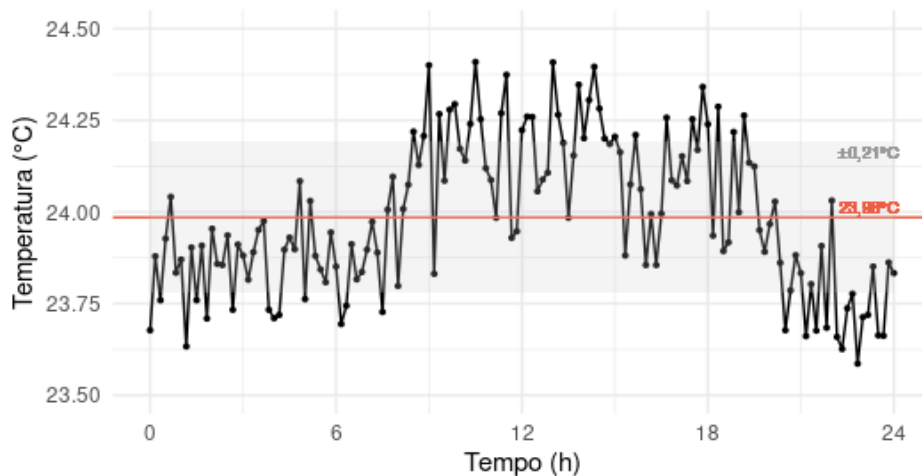


Figura 7 – Variação da temperatura na água destilada em uma das incubadoras ao longo de 24h, em um ciclo de claro:escuro 12:12. Média: $23,98^{\circ}\text{C}$ (em vermelho); desvio-padrão: $\pm 0,21^{\circ}\text{C}$ (em cinza).

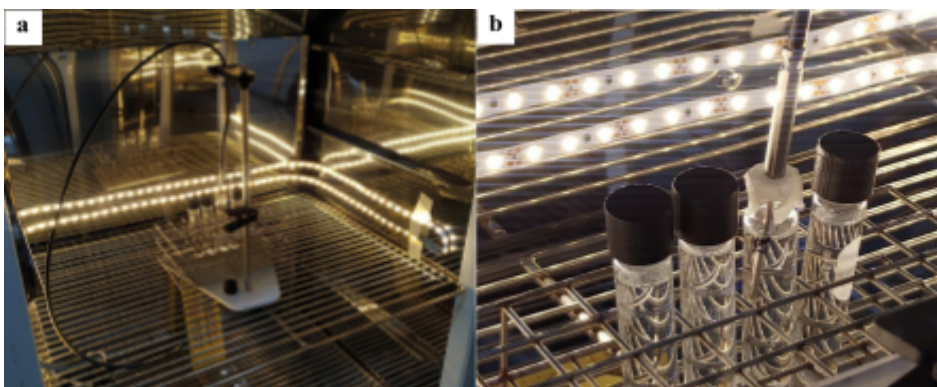


Figura 8 – Fotos do equipamento montado para calibração da temperatura real. **a)** estrutura montada para medição de temperatura; **b)** detalhe do sensor imerso em água destilada dentro do tubo. A estrutura de iluminação difere da apresentada na figura 9 porque estas fotografias foram registradas durante os primeiros testes de iluminação, antes da confecção dos painéis. O mesmo procedimento de medição de temperatura foi repetido após a montagem da estrutura de iluminação definitiva e o resultado está representado na figura 7.

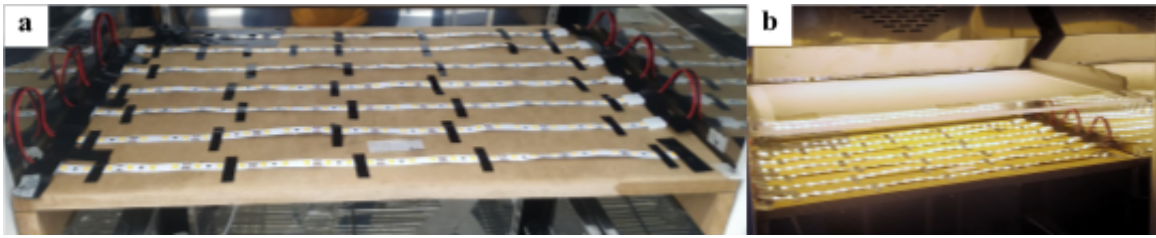


Figura 9 – Fotos da estrutura de iluminação. **a)** Painel de iluminação confeccionado; **b)** estrutura de iluminação completa montada na incubadora.

A intensidade luminosa foi ajustada com um *dimmer* para a faixa pré-determinada de $200 \pm 20^* \mu\text{mol}$ de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, determinada por um medidor de luz LI-250A (LI-COR Biosciences), com o sensor imerso em 6 mL de água destilada em um tubo de ensaio de vidro de 10 mL (o mesmo utilizado para os cultivos). O ciclo de 12:12h (claro:escuro) foi configurado com um temporizador analógico Elcon TM-22. $^*\pm 20$ expressa a amplitude da variação na intensidade luminosa.

3.1.3 GARANTIA DE CONDIÇÃO AXÊNICA

As cepas de *M. aeruginosa* (BAGATINI *et al.*, 2014) e de *Cyclotella* sp. (dados não publicados) foram sequenciadas utilizando o marcador 16S rDNA e a condição axênica foi confirmada. Além disso, os cultivos da CCMA-UFSCar são testados periodicamente em meio WC pH 7,0 com adição de peptona e glicose. Todos os procedimentos de distribuição de alíquotas, diluição e inoculação foram realizados em condições assépticas (isto é, em um fluxo laminar com bico de Bunsen, utilizando materiais autoclavados – a 121°C e 1 atm por 30 min). Todos os frascos e tubos utilizados possuem tampa rosqueável. Em adição, em cada evento de amostragem testes para verificar contaminação serão realizados por dois métodos distintos:

- a) Citometria: em um fluxo laminar, uma amostra de cerca de 1 mL é retirada do cultivo e transferida a um pequeno frasco de vidro. Então, fora das condições assépticas, 300 μL da amostra são transferidos para tubos de citometria e incorporam-se 3 μL do corante fluorescente SYTO 13™ (Thermo Fisher) seguido por homogeneização e 10 minutos de incubação no escuro. A amostra é então lida em um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences) conforme procedimentos descritos na seção 3.4.1.

Se bactérias heterotróficas estiverem presentes, é possível identificar uma população bem definida no citograma (figura 10a);

- b) Cultivo em meio com P+G (caso a citometria forneça suspeita positiva ou resultado ambíguo): em condições assépticas, 2 gotas do cultivo são adicionadas a um meio WC pH 7,0 com adicional de peptona bacteriológica e dextrose em concentrações de 250 mg/L cada. Após dois dias de incubação no escuro, constata-se contaminação se a solução se tornar turva.

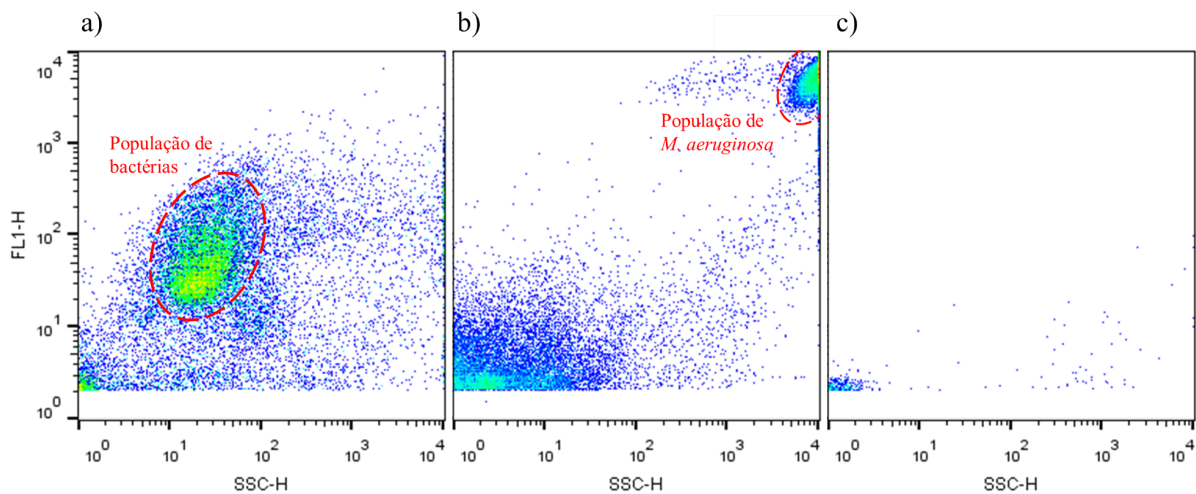


Figura 10 – Citogramas de amostras analisadas para contaminação bacteriana. Citogramas de **a)** uma amostra de água recém-coletada do reservatório do Lobo; **b)** uma amostra de *M. aeruginosa* axênica em estágio exponencial; e **c)** uma amostra de água ultrapura. Elaborado pelo autor utilizando o software FlowJo (BD Biosciences). Escalas em unidades arbitrárias.

3.2 PILOTO: REGISTRO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

Dois frascos de borossilicato de 100mL contendo 50 mL de meio WC estéril foram inoculados com a cepa e acondicionados nas incubadoras, um a 24 e outro a 28°C, por 10 a 15 dias para *M. aeruginosa* e 15 a 20 dias para *Cyclotella* sp. Ao final desse período, transferiram-se 5 mL para novos frascos, idênticos aos iniciais, para diluição. Após homogeneizadas, cada uma dessas soluções de células foi imediatamente repartida em em alíquotas de 6 mL e distribuídas em tubos de 10 mL, produzindo, no total, 3 tubos mantidos na incubadora a 24°C e 3 na incubadora a 28°C.

Registrou-se diariamente a absorbância a 680nm (GRIFFITHS *et al.*, 2011) em um espectrofotômetro Hach DR 5000 para acompanhar e registrar a curva de crescimento das duas espécies em ambas as temperaturas. Cabe ressaltar que o espectrofotômetro possui um

encaixe específico para tubos de 10 mL, e portanto, os cultivos são lidos *in vivo* diretamente no recipiente, sem necessidade de abrir o tubo e transferir o líquido para uma cubeta, evitando contaminação. As informações obtidas nessa etapa foram úteis para estabelecer a frequência de repicagem na próxima etapa (seção 3.3), definir os pontos de amostragem na última etapa (seção 3.4), além de obter resultados preliminares.

3.3 PREPARAÇÃO: ACLIMATAÇÃO

O fenômeno de aclimatação consiste em um conjunto de ajustes fisiológicos, morfológicos ou anatômicos realizados por um organismo que melhoram sua performance ou sobrevivência em resposta a uma mudança ambiental (DEMMIG-ADAMS *et al.*, 2008), por exemplo, estresses químicos ou térmicos. Considerando que a presente investigação busca avaliar efeitos de estresse térmico sobre microalgas no contexto de mudanças climáticas, supõe-se que é necessário incluir um procedimento de aclimatação à temperatura de 28°C, pois os cultivos são mantidos a 23°C na CCMA-UFSCar e o processo de aumento de temperatura projetado pelo IPCC ocorre a longo prazo, e não repentinamente. Isso foi feito em dois passos, primeiro a uma temperatura intermediária e depois na temperatura do experimento, sempre manipulando os cultivos em condições assépticas como descrito anteriormente.

Para *Microcystis aeruginosa*, 1 frasco de borosilicato de 100mL contendo 10 mL de meio WC foi inoculado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. A cada 7 dias, vertiam-se dentro do frasco 10 mL de WC, armazenados separadamente em tubos de ensaio. Durante 3 semanas o cultivo de aclimatação foi mantido a 26±0,2°C e, após, por 3 semanas a 28±0,2°C. Para *Cyclotella* sp., 4 tubos de ensaio de 20 mL de capacidade com 8 mL de WC foram inoculados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. A cada 7 a 14 dias o cultivo era repicado para tubos idênticos, e sempre um pouco do WC fresco dos tubos novos era transferido aos tubos antigos, a fim de prolongar a vida útil dos cultivos. O cultivo de aclimatação foi mantido a 26±0,2°C por 23 dias e, após, a 28±0,2°C por mais 27 dias. Os mesmos procedimentos de cultivo e repicagem foram empregados, porém sem aumento de temperatura (mantendo 24±0,2°C), para obter cultivos-controle com biomassa suficiente para iniciar os experimentos.

É importante ressaltar que, por conta do crescimento insatisfatório do cultivo-estoque de *Cyclotella* sp., foi necessário utilizar como fonte um cultivo em WC com adição de

peptona e glicose para inocular os cultivos de aclimatação. No entanto, para evitar a interferência da peptona na espectroscopia de fluorescência, utilizou-se uma pipeta de Pasteur de vidro para coletar apenas as células depositadas no fundo do tubo de ensaio, obtendo o maior número de células com o menor volume de cultivo, e transferi-las a um tubo com WC sem adição de peptona e glicose. Após esse procedimento, a repicagem sequencial dos cultivos de aclimatação contribuiu para a diluição da peptona a níveis que não prejudicaram a espectroscopia de fluorescência, o que foi verificado nas leituras dos cultivos em 24-38h, nas quais não se detectaram diferenças significativas e consistentes entre a fluorescência de peptídeos de cada linhagem (seções 4.3.1 e 4.3.3 e apêndice 6).

Além disso, foram necessárias tentativas repetidas de cultivo de *Cyclotella* sp. aclimatada, e assim os cultivos de aclimatação permaneceram por mais tempo no segundo passo de aclimatação, na incubadora a 28°C. Na primeira tentativa, os cultivos de aclimatação permaneceram 27 dias a 28°C; na segunda, 61 dias; e na terceira já tinham se passado 98 dias. Por fim, também vale mencionar que o uso de tubos de ensaio de 20 mL se deu em virtude de tentativas mal-sucedidas de realizar a aclimatação de *Cyclotella* sp. em frascos de borossilicato, cuja causa não foi possível determinar.

3.4 EXPERIMENTOS

Uma vez finalizada a etapa anterior, realizou-se a diluição e distribuição nos tubos em condições assépticas. Uma amostra foi retirada dos cultivos-controle e dos cultivos de aclimatação para ser lida em citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences), utilizando os parâmetros FL3-H (fluorescência vermelha, de clorofila) e SSC-H (dispersão lateral), para obter a contagem de células e determinar o volume de inóculo. Com essas informações, a diluição foi realizada, seguida da repartição em alíquotas de 6 mL, alocadas em tubos de 10 mL de capacidade.

Para *M. aeruginosa* pretendeu-se atingir a concentração inicial de 2×10^4 células/mL, e, para *Cyclotella* sp., de 3×10^4 células/mL – uma concentração maior no cultivo da diatomácea no intento de minimizar o número de cultivos mal-sucedidos. Os valores reais alcançados estão discriminados na tabela 3.

Tabela 3 – Detalhamento das condições experimentais iniciais por espécie e linhagem

Espécie e linhagem	Concentração inicial (células/mL)	Número de réplicas	Volume dos cultivos (mL)
<i>M. aeruginosa</i> aclimatada	5,75x10 ⁴	26 (18+8*)	6,0 (5,0*)
<i>M. aeruginosa</i> controle	4,06x10 ⁴	18	6,0
<i>M. aeruginosa</i> não-aclimatada	4,06x10 ⁴	18	6,0
<i>Cyclotella</i> sp. aclimatada (1ª tentativa)	2,49x10 ⁴	21	6,0
<i>Cyclotella</i> sp. aclimatada (2ª tentativa)	3,84x10 ⁴	24	5,0
<i>Cyclotella</i> sp. aclimatada (3ª tentativa)	2,48x10 ⁴	10	5,0
<i>Cyclotella</i> sp. controle (1ª tentativa)	2,65x10 ⁴	21	6,0
<i>Cyclotella</i> sp. controle (2ª tentativa)	2,11x10 ⁴	10	5,0
<i>Cyclotella</i> sp. não-aclimatada	2,65x10 ⁴	21	6,0 **

* 8 novos tubos com cultivos foram preparados a partir do excedente da solução inicial de células, que foi mantida na incubadora sob as mesmas condições. O volume do excedente foi suficiente para preparar tubos com apenas 5 mL de cultivo cada. Essa manobra foi necessária para garantir amostras do estágio senescente, pois os demais cultivos declinaram precocemente. ** Três cultivos (1 amostrado após 24h e dois amostrados na fase exponencial) continham cerca de 5 mL de meio por conta de um defeito na ponteira utilizada.

A 2ª tentativa de cultivo de *Cyclotella* sp. aclimatada foi necessária pela aparente mortalidade precoce de todos os cultivos da primeira tentativa (apêndice 3). A 3ª tentativa com a linhagem aclimatada e a 2ª tentativa com a linhagem controle foram necessárias porque a amostragem do estágio exponencial foi tardia e, na verdade, os cultivos já poderiam ser considerados estacionários. Nos três casos, pensando em aumentar as chances de obtenção de culturas bem-estabelecidas, o volume foi reduzido a 5 mL, visando prover uma coluna de

respiração maior, e o número de réplicas ampliado: 24 cultivos para coletar 9 amostras (tréplicas de 3 estágios) na 2ª tentativa da linhagem aclimatada; e 10 cultivos para coletar 3 amostras (tréplicas de 1 estágio) na 3ª tentativa da linhagem aclimatada e na 2ª tentativa do controle.

A medição de clorofila *in vivo* era realizada diariamente em espectrofotômetro até a amostragem do estágio estacionário, a partir do qual as medições passavam a ser feitas a cada dois dias. Conforme citado no início da seção 3, os cultivos foram amostrados destrutivamente em 4 pontos da curva de crescimento: inicial, 24h após o acondicionamento nas estufas; aproximadamente na metade dos períodos de crescimento exponencial e estacionário; e no início do período senescente. Em cada um desses pontos, 3 tubos de cada linhagem foram retirados das estufas, sempre por volta das 11h da manhã, e submetidos à citometria de fluxo, espectroscopia de fluorescência e quantificação de DOC, de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

3.4.1 CITOMETRIA DE FLUXO

Em adição ao teste de condição axênica (descrito na seção 3.1.3), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada conforme procedimentos adaptados de Alho *et al.*, 2018. Em um tubo plástico para citometria se adicionaram-se 297 μL do cultivo e 3 μL de uma solução de DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, CAS 2044-85-1, Sigma Aldrich) em dimetilsulfóxido a $10^4 \mu\text{M}$, obtendo uma concentração final de $10 \mu\text{M}$. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a 1 hora de incubação na temperatura de origem das amostras (24 ou 28°C), no escuro (por ser um corante suscetível à fotodegradação).

Ao final do tempo de incubação, acrescentaram-se 10 μL de uma solução de *beads* fluorescentes de 6 μm (Polysciences) e a amostra era lida em um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences). Utilizaram-se os parâmetros FL3-H (fluorescência vermelha, de clorofila), FL1-H (fluorescência verde, de corante) e SSC-H (dispersão lateral), de acordo com os procedimentos estabelecidos por Sarmiento *et al.* (2008). Ao final do experimento, o conjunto de dados obtidos foi processado no software FlowJo (BD Biosciences).

Para extrair informações acerca de ROS, a média geométrica da população foi dividida pela média geométrica das *beads* para o parâmetro FL1-H. Por se tratarem de

unidades arbitrárias, o valor da razão $FL1-H_{pop}/FL1-H_{beads}$ foi multiplicado por 1000. Para extrair o valor de abundância celular em células/mL, basta utilizar a seguinte fórmula:

$$\frac{n \times 1000}{V \times t} \quad (1)$$

Onde n é o número de eventos totais registrados durante a leitura da amostra, para uma população delimitada; V é o volume de amostra lido por minuto em $\mu\text{L}/\text{min}$, dado pela voltagem de operação do equipamento (nas leituras realizadas, variou entre 9,18 e 10,17 μL); e t é o tempo de leitura da amostra, em minutos (nas leituras realizadas, sempre 2). No caso das amostras dos estágios exponencial, estacionário e senescente o valor final ainda foi multiplicado por 10, uma vez que foi necessário adicionar 1,8 mL de WC estéril às amostras imediatamente antes da leitura, por conta da grande concentração de células.

3.4.1 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E MEDIÇÕES DE DOC

O conteúdo de cada tubo de cultivo era agitado e em seguida filtrado individualmente com um filtro de fibra de vidro GF/F (Whatman), de 25 mm de diâmetro, acoplado a uma seringa de plástico de 10 mL. O material filtrado era armazenado em um frasco âmbar e imediatamente acondicionado em geladeira a 4°C por um período máximo de 5 dias (7 para as amostras de 24h) até a leitura em espectrofluorímetro. Para a espectroscopia de fluorescência, uma parte da amostra armazenada em frasco âmbar foi transferida para uma cubeta de quartzo de 1 cm de passo óptico e analisada em um espectrofluorômetro Edinburgh FS5, em ambiente escuro, sob temperatura constante de 25°C.

Para a obtenção das EEMs, cada alíquota é incidida por um espectro de excitação de 240 a 450 nm, com intervalo de 5 nm e tempo de permanência de 0.25 s, medindo um espectro de emissão de 300 a 560 nm com intervalo de 2 nm. O espectro de absorbância de 200 a 800 nm é coletado com intervalo de 1 nm e tempo de permanência de 0.2 s (NIETO-CID; ÁLVAREZ-SALGADO; PÉREZ, 2006). Esses mesmos parâmetros foram empregados na obtenção das EEMs e dados de absorbância da água ultrapura e dos meios de cultivo WC, amostras “brancas” para serem subtraídas e comparadas aos dados recolhidos, respectivamente. A correção de *inner filter* foi realizada subtraindo a intensidade de

fluorescência da dispersão Raman (KOTHAWALA *et al.*, 2013; LARSSON; WEDBORG; TURNER, 2007).

Ao final, a amostra lida era devolvida ao frasco âmbar e era fixada com 10 μ L de ácido fosfórico, sendo mantida a 4°C até o final dos experimentos, quando se realizaram as medições de DOC em um analisador Shimadzu TOC-VCPH. Como o equipamento requer um volume de amostra mínimo de cerca de 15 mL, 2 mL de cada amostra foram diluídos em 18 mL de água ultrapura, e assim os valores fornecidos foram multiplicados por 10. Medições de carbono foram realizadas na água ultrapura usada nas diluições para obter um “branco”, empregado para corrigir o valor das amostras.

Os filtros de fibra de vidro e os frascos âmbar foram previamente calcinados a 450°C durante 4 horas, para eliminar qualquer contaminação por carbono orgânico; e a seringa, o aparato de filtração, as tampas e batoques dos frascos âmbar e a cuveta foram lavados previamente em solução HCl 10% e água ultrapura, com a mesma finalidade. Em adição, a seringa e o filtro de fibra de vidro eram enxaguados com 10 mL de água ultrapura imediatamente antes de cada filtração, para evitar contaminação.

O processamento dos dados de absorvância e fluorescência foi conduzido através da Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) (STEDMON; MARKAGER; BRO, 2003) e pelo cálculo de índices ópticos e de fluorescência, ambos executados no software MATLAB versão R2018a (Mathworks) com a ferramenta DOMFluor (MURPHY *et al.*, 2014), utilizando um total de 72 amostras. Com isso, extraíram-se índices ópticos como Slope ratio (Sr) e os índices de fluorescência (FI), frescor (Fr) e humificação (HIX) e, com os dados de DOC, o coeficiente de absorção específica de ultravioleta a 254 nm ($SUVA_{254}$); além de razões entre intensidades de fluorescência em regiões de picos característicos: A+C/T, C/A, C/M, (BEGUM *et al.*, 2023; MELO *et al.*, 2020; GABOR *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2016).

A PARAFAC também forneceu um modelo com os principais componentes (fluoróforos) presentes nas amostras, os quais foram comparados com os picos característicos listados por Coble (2007) e Stedmon *et al.* (2003). Em adição, executou-se um cruzamento de dados entre o modelo gerado e os modelos publicamente depositados no banco de dados OpenFluor (<https://openfluor.lablicate.com>) (MELO *et al.*, 2020; MURPHY *et al.*, 2014), selecionando aqueles que alcançaram coeficientes de congruência de Tucker para excitação e emissão (TCC_{Ex} e TCC_{Em}) iguais ou superiores a 97% para melhor compreender e descrever a origem e características básicas dos componentes identificados.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Por fim, análises estatísticas foram desenvolvidas com o software RStudio (R CORE TEAM, 2023), sempre considerando significativos os resultados com valores $p < 0,05$. A fluorescência absoluta, em Unidades Ramán (R.U. do inglês *Raman Units*), e relativa (em %) de cada componente, índices ópticos, razões espectrais, e os valores de ROS e DOC foram comparados entre linhagens em cada estágio de crescimento por meio da aplicação do teste paramétrico ANOVA 1-way seguida do teste de Tukey ou da aplicação do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, dependendo da distribuição e variação dos dados. Para comparações entre pares de dados, utilizou-se o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney, respectivamente para dados com distribuição normal e variâncias homogêneas, e para dados com distribuição não normal ou variância não-homogênea. A normalidade dos dados foi previamente verificada em cada caso pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Para determinar a influência individual dos fatores “tempo” (mudança de estágio de crescimento) e “temperatura” sobre a variação na concentração e composição da FDOMp, foram calculados coeficientes de variação para cada componente em função destes parâmetros.

Para analisar a taxa de excreção de DOC ao longo do tempo – bem como para contornar as dificuldades impostas pela irregularidade nos tempos de amostragem em *Cyclotella* sp. para os estágios exponencial e estacionário – testaram-se diferenças entre inclinações de retas (“*slopes*”) ajustadas a dados de concentração de DOC em função dos dias decorridos entre 24h e o estágio estacionário. Inicialmente pretendeu-se comparar os *slopes* das regressões lineares por meio de teste t para *slopes* (COHEN *et al.*, 2003), uma vez que todas apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) e resíduos normalmente distribuídos ($p > 0,05$), porém a aplicação desse também requer a homocedasticidade dos resíduos em cada modelo, que não foi atendida. Assim, optou-se por obter os *slopes* por meio da técnica de *resampling* com *bootstrap* (1000 iterações) e comparar a mediana dos *slopes* pelo teste de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

4.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E PLANO DE AMOSTRAGEM

Foram produzidas curvas de crescimento na etapa piloto (figuras 11a e 11b) e se estabeleceram os valores da tabela 4, implementados durante a etapa experimental na tentativa de coletar os cultivos em cada um dos estágios de crescimento. No entanto, algumas alterações para *Cyclotella* sp. aclimatada são apresentadas na tabela 4 e discutidas na seção 5.1 juntamente com algumas considerações sobre as limitações deste plano de amostragem.

Tabela 4 – valores-referência aproximados de absorvância de clorofila a 680nm *in vivo* para amostragem de cultivos durante os experimentos

Estágio	<i>M. aeruginosa</i>	<i>Cyclotella</i> sp.	<i>Cyclotella</i> sp. aclimatada
Exponencial	0,250	0,100	0,050
Estacionário	0,500	0,150	0,100
Senescente	0,250	0,100	< 0,100

Cabe aqui ressaltar que, tanto nas análises apresentadas nas seções adiante, removeram-se 6 amostras do conjunto de dados: três amostras de *Cyclotella* sp. exponencial aclimatada (3ª tentativa) e três amostras de *Cyclotella* sp. exponencial controle (2ª tentativa), por conta de anormalidades na composição da FDOM (apêndice 4) provavelmente relacionadas à idade avançada dos cultivos-estoque.

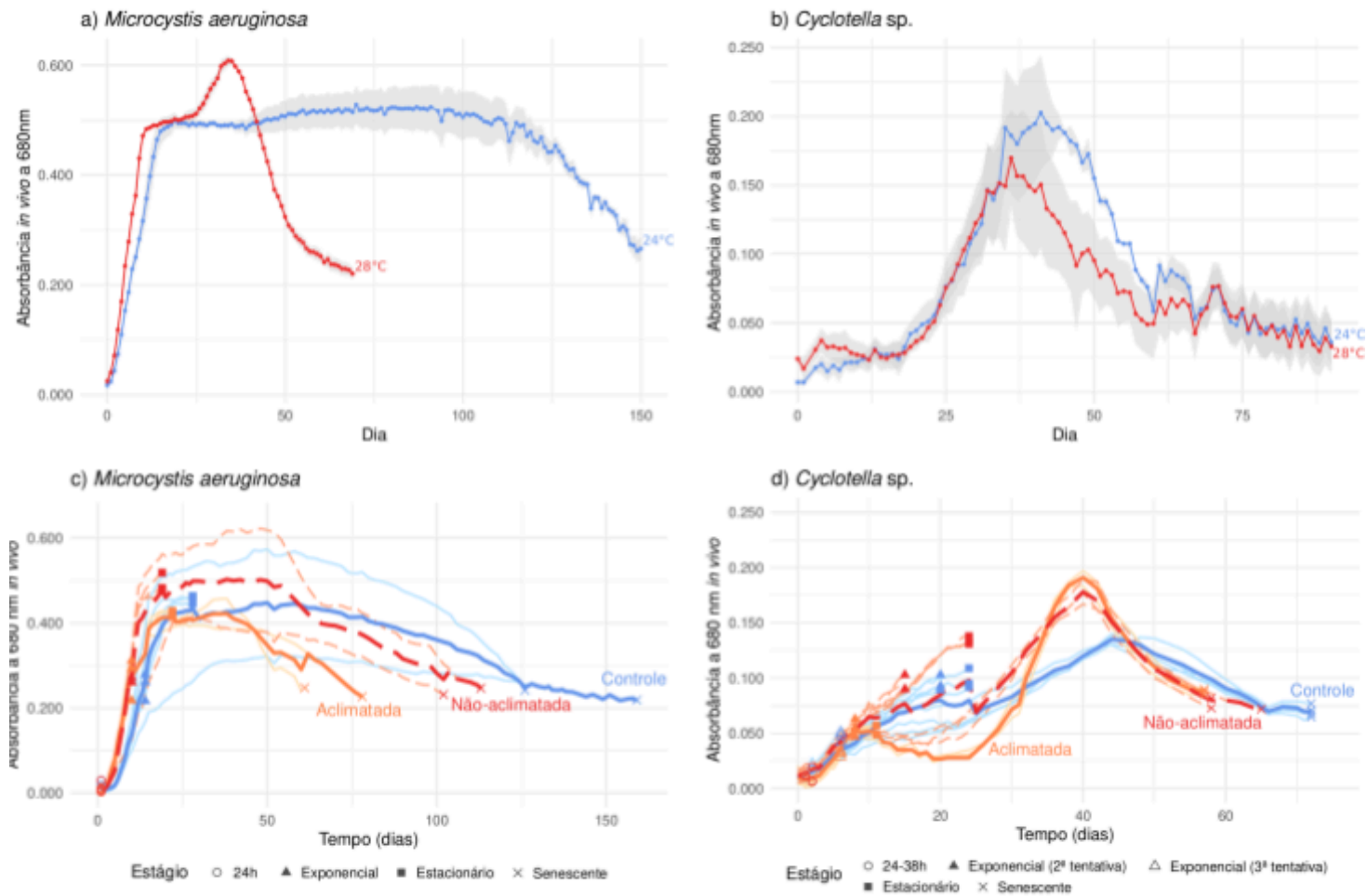


Figura 11 – curvas de crescimento de *Microcystis aeruginosa* e *Cyclotella* sp. Os gráficos a) e b) mostram as curvas obtidas na etapa piloto. As linhas representam as médias a 24°C (azul) e 28°C (vermelho), sombras indicam o desvio-padrão. Foram realizados 3 cultivos para cada temperatura em cada espécie, exceto para *Cyclotella* sp. a 24°C (uma das réplicas não cresceu). Os gráficos c) e d) mostram as curvas obtidas na etapa experimental. As linhas mais espessas representam as médias de cada linhagem; as linhas mais finas, os valores de cada réplica amostrada; e os pontos, os momentos de amostragem de cultivos.

4.2 CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO (DOC)

A concentração de DOC nos exsudatos das duas espécies aumentou linearmente ao longo do tempo até o estágio estacionário, e diferenças entre linhagens foram encontradas apenas para *Cyclotella* sp. (figura 12): no estágio exponencial, as médias das linhagens controle e não-aclimatada são similares entre si (12,00 e 13,12), e ambos são maiores que os da aclimatada (6,72); no estacionário, a linhagem não-aclimatada apresentou medianas maiores (18,80) que os da aclimatada (7,82), mas ambos sem diferença em relação ao controle (13,49) ($p \geq 0.05$).

Com o teste de *slopes* obtidos por *bootstrap* (figura 13) identificou-se que a mediana dos *slopes* para *M. aeruginosa* é maior na linhagem não-aclimatada (0,43) e menor na linhagem controle (0,26), com a linhagem aclimatada apresentando um valor intermediário e significativamente diferente dos outros dois (0,42). E para *Cyclotella* sp., mediana dos *slopes* da linhagem não-aclimatada (0,72) é maior que a da linhagem aclimatada (0,37), com a linhagem controle assumindo um valor intermediário e significativamente diferente dos outros dois (0,39) ($p < 0.05$).

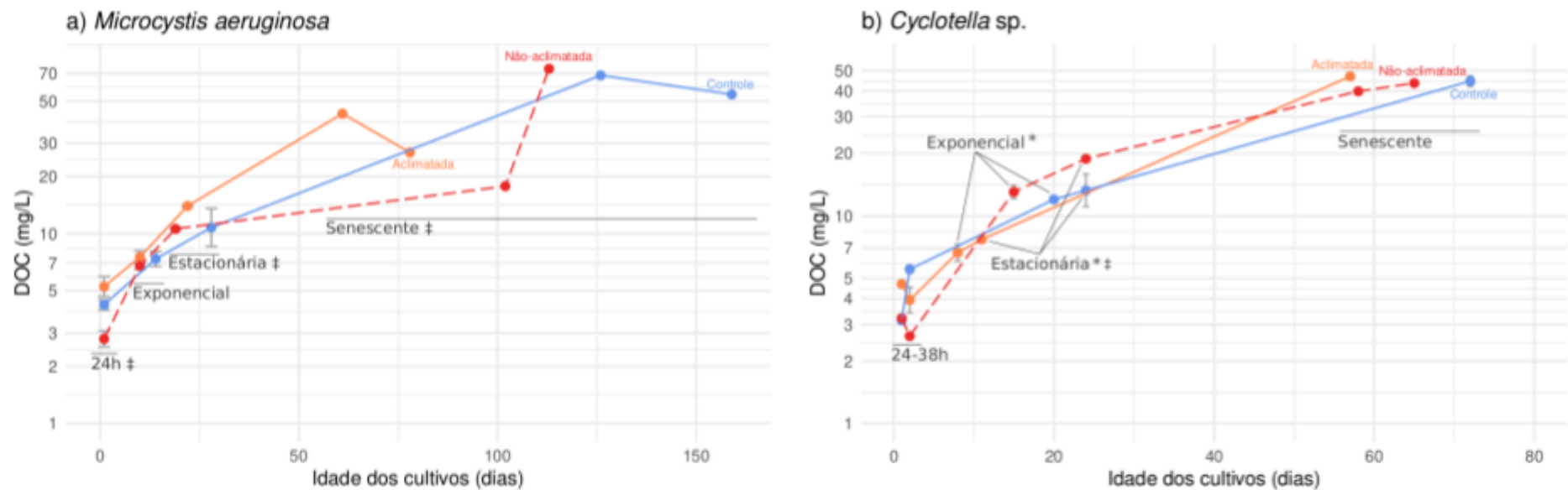
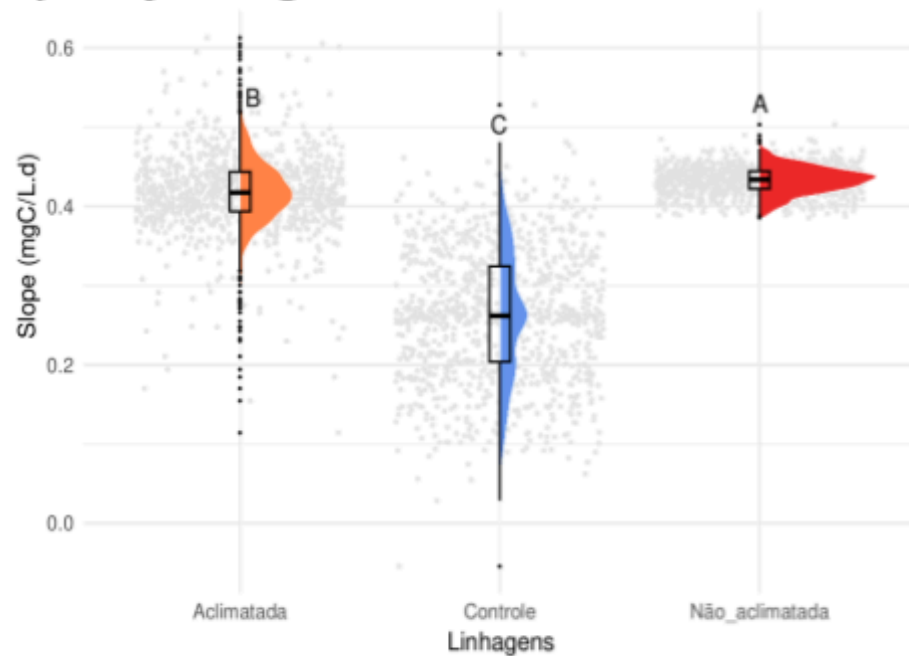


Figura 12 – Variação na concentração de DOC ao longo do tempo, para cada linhagem de cada espécie. A escala da variável independente está em \log_{10} para permitir uma melhor visualização de cada ponto. Comparações entre linhagens em cada estágio foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis quando indicado por ‡, caso contrário, por ANOVA. Os estágios que apresentaram diferença significativa entre linhagens estão marcados com * ($p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais).

a) *Microcystis aeruginosa*



b) *Cyclotella* sp.

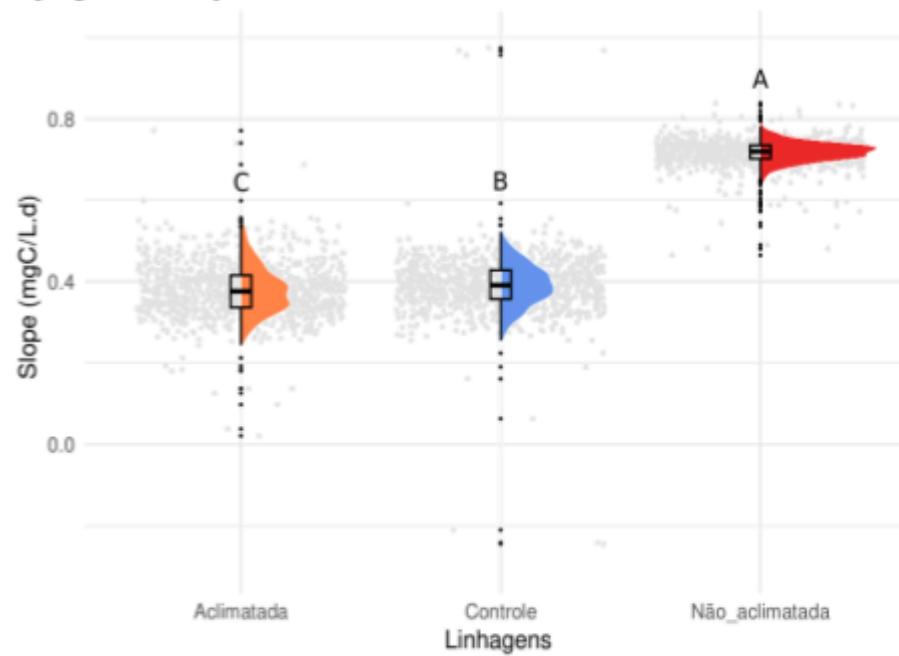


Figura 13 – Distribuição dos valores de *slope* da taxa de excreção de DOC por linhagem. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens ($p < 0,05$) em ordem alfabética do maior para o menor valor, resultado de um teste de Kruskal-Wallis ($n=3000$). Um *outlier* da linhagem controle de *Cyclotella* sp. com valor em torno de 2,5 está omitido do gráfico.

4.3 MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA FLUORESCENTE (FDOM)

4.3.1 COMPONENTES

A PARAFAC identificou como outliers todas as amostras senescentes de *M. aeruginosa*, sendo necessária sua remoção para o sucesso da análise. Ao final, foram fornecidos dois modelos válidos: um de 2 e outro de 4 componentes. O desempate foi feito pelo modelo com menor valor de soma dos erros quadráticos (SEQ), sendo escolhido o modelo de 4 componentes ($SEQ_2 \approx 1698,69$ e $SEQ_4 \approx 481,16$, uma diferença de quase 4x).

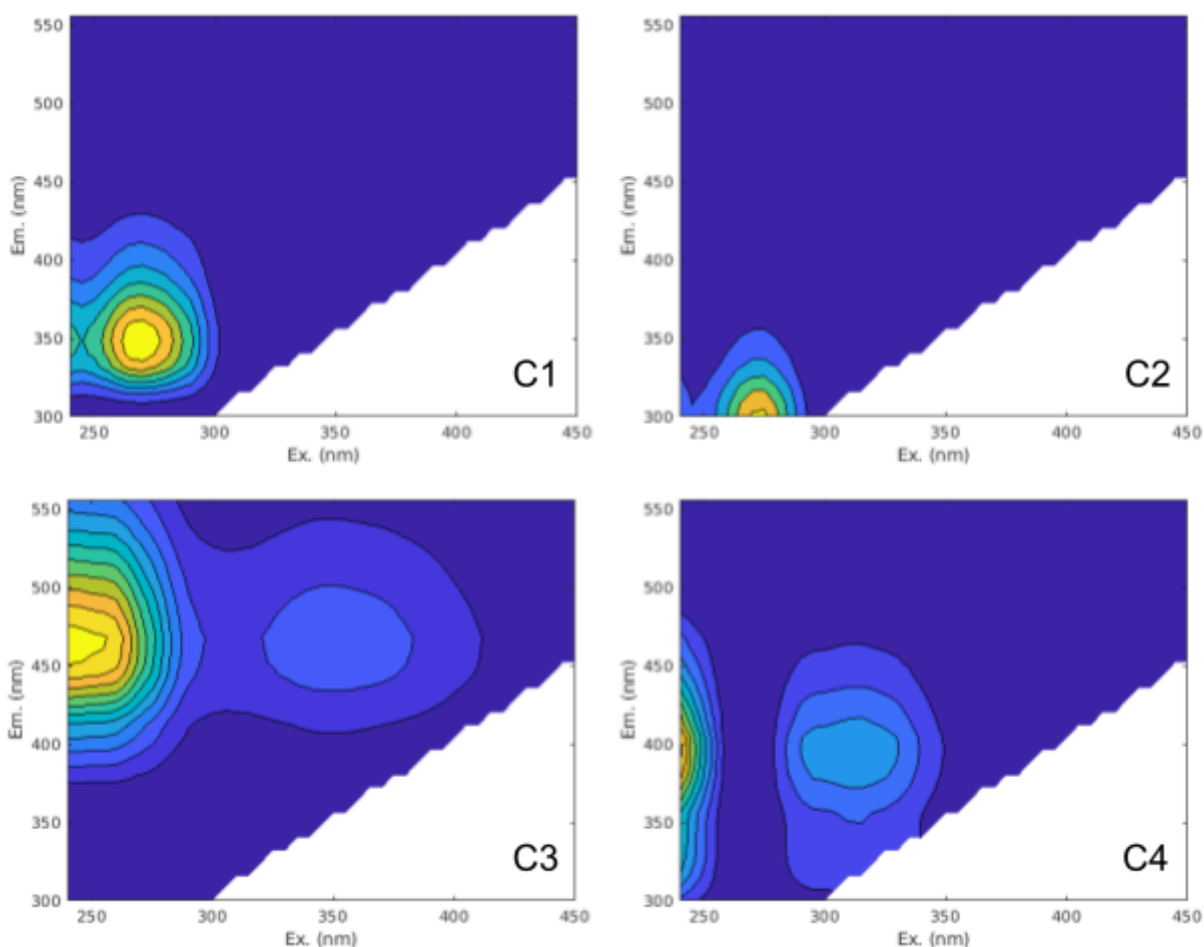


Figura 14 – Matrizes de excitação e emissão dos quatro componentes do modelo obtido por PARAFAC.

Este modelo foi comparado com os demais 267 modelos depositados publicamente na base de dados OpenFluor até a data da escrita desse texto (Setembro de 2023). Como o valor de 0,97 para TCC_{Ex} e TCC_{Em} retornou correspondências somente para os primeiros três componentes, optou-se por diminuí-lo para obter correspondências para o quarto componente. Assim, utilizou-se o valor de 0,97 para os componentes 1 a 3, alcançando, respectivamente,

11, 29 e 12 correspondências; e o valor de 0,95 para o componente 4, resultando em 4 correspondências. Os resultados da revisão dos artigos correspondentes são mostrados na tabela 5 em conjunto com a caracterização dos componentes.

Tabela 5 – Comparação entre os componentes identificados, picos característicos registrados na literatura e correspondências no OpenFluor

	λ_{ex} máx. (nm)	λ_{em} máx. (nm)	Correspondências com picos catalogados	Descrição das correspondências no OpenFluor
C1	270	348	T (<i>Tryptophan-like</i>)	DL-triptofano e indol (WÜNSCH; MURPHY; STEDMON, 2015) Similar a proteína, microbiano/algal/bacteriano (LAMBERT <i>et al.</i> , 2017; CORY; MCKNIGHT, 2005) Aminoácidos livres ou ligados a proteínas (DERRIEN; SHIN; HUR, 2019)
C2	275	300	B (<i>Tyrosine-like</i>)	L-tirosina e p-cresol (WÜNSCH; MURPHY; STEDMON, 2015) Similar a tanino e proteínas (D'ANDRILLI <i>et al.</i> , 2017) Materiais proteínicos recém-produzidos e/ou recém-degradados (D'ANDRILLI <i>et al.</i> , 2019), livres ou ligados a proteínas (CHEN <i>et al.</i> , 2017)
C3	<240(350)	468	A+C (<i>Fulvic and humic-like</i>)	Similar a húmico terrestre (WILLIAMS; FROST; XENOPOULOS, 2013; DAINARD; GUÉGUEN, 2013), processado por micro-organismos (OSBURN <i>et al.</i> , 2012), fotorefratário (KIDA <i>et al.</i> , 2019)
C4	<240(315)	396	A+M (<i>Marine/Microbial humic-like</i>)	Similar a húmico microbiano (WANG <i>et al.</i> , 2020; LAPIERRE; DEL GIORGIO, 2014), presente em culturas de algas (SØNDERGAARD; STEDMON; BORCH, 2011)

Uma Análise de Componentes Principais (PCA) foi executada para cada espécie sobre os dados de fluorescência absoluta das amostras. Em ambos os casos, mais de 95% da variação foi explicada pelo 1º componente principal (PC1). Levando esse fator em consideração, verifica-se nas duas espécies uma separação das amostras principalmente de acordo com o estágio de crescimento. Ademais, para *M. aeruginosa*, as amostras da linhagem aclimatada se separaram das demais apenas no estágio estacionário, e para *Cyclotella* sp., as amostras estacionárias da linhagem não-aclimatada se separam das demais.

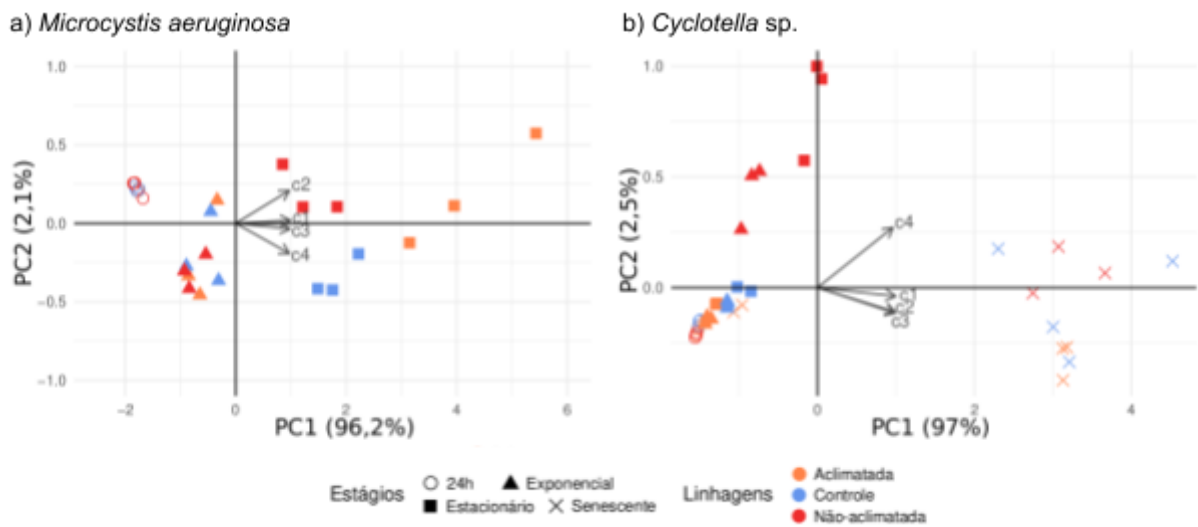


Figura 15 – Resultados da PCA sobre os dados de fluorescência absoluta dos componentes. Percebe-se uma separação mais conspícua das amostras em função das fases de crescimento (agrupamentos se formando da direita para a esquerda) do que em função das linhagens, especialmente para *Microcystis aeruginosa*. Além disso, o destaque das amostras dos estágios exponencial e estacionário da linhagem não-aclimatada de *Cyclotella* sp. evidencia o impacto da assimetria nos tempos de amostragem (apêndice 2).

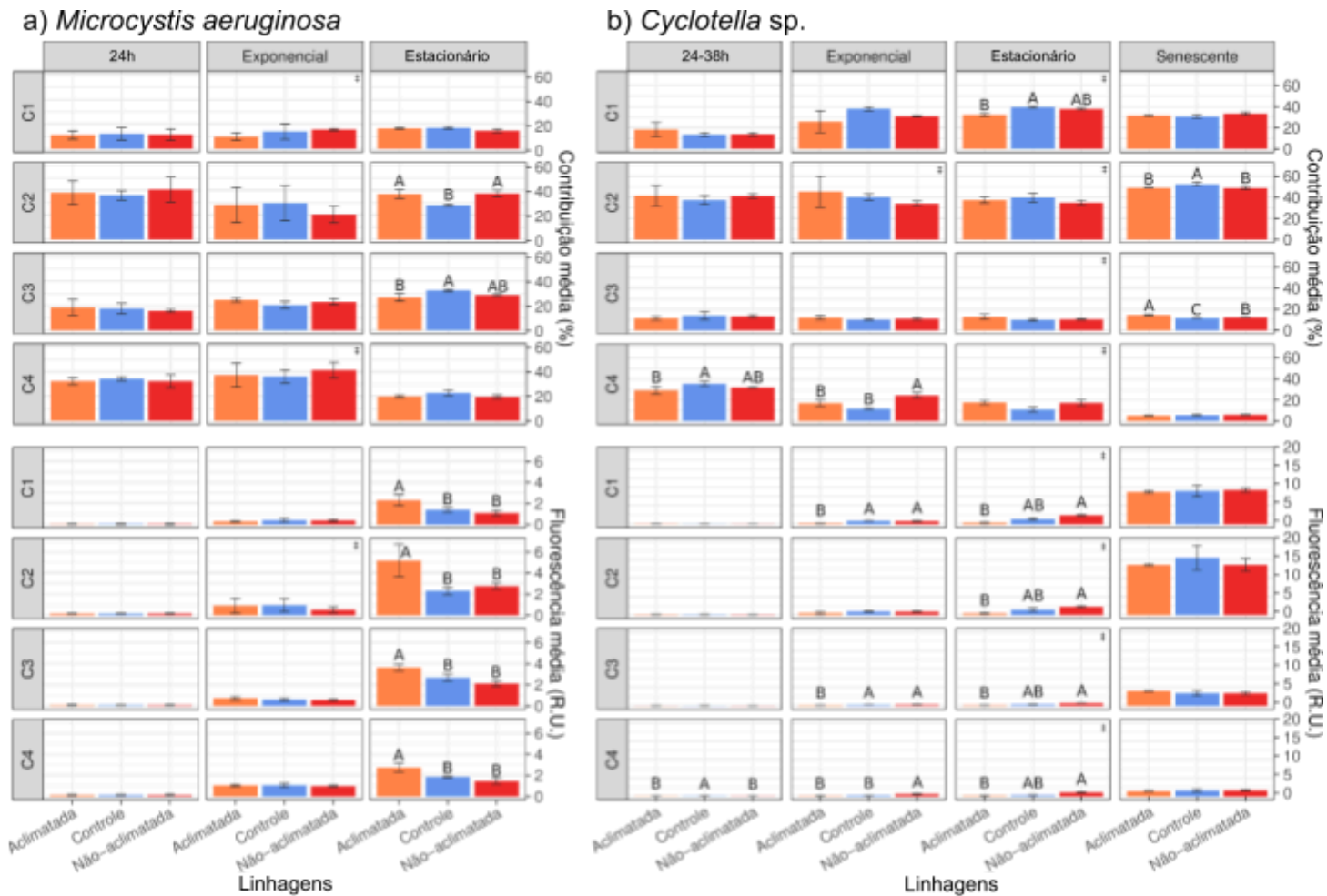


Figura 16 – Variação na composição da FDOM das duas espécies de alga ao longo dos estágios de crescimento, evidenciada nos valores de fluorescência relativa (gráficos superiores) e fluorescência absoluta (gráficos inferiores). Letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens ($p < 0,05$) em ordem alfabética do maior para o menor valor, e quando ausentes não há diferença. Os gráficos marcados com ‡ apresentam os resultados de um teste de Kruskal-Wallis, e aqueles sem marcação apresentam os resultados de uma ANOVA. Barras de erro representam o desvio-padrão. Em todos os casos $n=9$, exceto para *Cyclotella* sp. estacionária ($n=8$) e senescente ($n=10$).

Nos cultivos de *M. aeruginosa* diferenças foram encontradas apenas no estágio estacionário. A fluorescência relativa média do componente 2 (%C2) é significativamente maior nos cultivos mantidos a 28°C (aclimatados: 36,94%; não-aclimatados: 37,31%) em relação ao controle (27,94%), e a contribuição média do componente 3 (%C3) é maior no controle (32,36%) do que na linhagem aclimatada (26,55%), sem diferença com os cultivos não-aclimatados (28,50%). Já a média da fluorescência absoluta de todos os componentes é significativamente maior na linhagem aclimatada (C1: 2,30, C2: 5,19, C3: 3,63, C4: 2,75) em relação às duas outras (não-aclimatada C1: 1,10, C2: 2,77, C3: 2,12, C4: 1,47; controle C1: 1,40, C2: 2,31, C3: 2,67, C4: 1,86), sendo em média 1,78 vezes maior.

Nos cultivos de *Cyclotella* sp., por sua vez, identificaram-se contrastes entre linhagens em todos os pontos da curva de crescimento. No que se trata da fluorescência relativa, nas amostras de 24h o percentual médio do componente 4 (%C4) é mais alto no controle (35,35%) em relação à linhagem aclimatada (29,05%), mas sem diferença com a não-aclimatada (31,75%). A mesma relação de valores é observada para o componente 1 (%C1) no estágio estacionário: a mediana é maior no controle (39,55%) em relação à linhagem aclimatada (32,64%), mas sem diferença com a não-aclimatada (37,72%). No estágio exponencial, a média de %C4 na linhagem não-aclimatada (24,19%) é maior que a da linhagem aclimatada (16,98%) e mais que o dobro do controle (11,65%). Nas amostras senescentes, a %C2 média nos cultivos mantidos a 28°C (aclimatados: 48,90%, não-aclimatados: 48,66%) é inferior à dos cultivos controle (52,35%), e a %C3 média dos cultivos aclimatados (14,42%) é maior que a dos não-aclimatados (12,15%), e nos dois casos superior à %C3 do controle (11,47%).

Em termos de fluorescência absoluta, nas amostras de *Cyclotella* sp. em 24-38h a média de C4 no controle (0,13) se mostrou superior aos das linhagens aclimatada (0,10) e não-aclimatada (0,08). No estágio exponencial, a fluorescência média de C1 e C3 é menor nos cultivos aclimatados (0,24 e 0,12, respectivamente) em relação aos não-aclimatados (0,82 e 0,29) e ao controle (0,89 e 0,24), e a fluorescência média de C4 é maior nos cultivos não-aclimatados (0,64) do que nos cultivos aclimatados (0,17) e no controle (0,27). Por último, no estágio estacionário a mediana da fluorescência de todos os componentes foi maior na linhagem não-aclimatada (C1: 2,48, C2: 2,36, C3: 0,66, C4: 1,18) em relação à aclimatada (C1: 0,45, C2: 0,53, C3: 0,16, C4: 0,23), mas ambas sem diferença com o controle (C1: 1,37, C2: 1,40, C3: 0,34, C4: 0,37).

Em virtude da clara divergência entre os tempos de amostragem para cada linhagem nos estágios exponencial e estacionário de *Cyclotella* sp., foram estabelecidas comparações para componentes normalizados pelo tamanho da população (figura 17). Diferenças foram encontradas para C1 no estágio exponencial, com uma mediana maior nos cultivos controle ($1,53 \cdot 10^{-6}$), intermediária nos não-aclimatados ($1,28 \cdot 10^{-6}$) e menor nos aclimatados ($7,90 \cdot 10^{-7}$); e para C3 no estágio estacionário, com uma mediana maior nos cultivos não-aclimatados ($9,26 \cdot 10^{-7}$), intermediário no controle ($7,12 \cdot 10^{-7}$) e menor nos aclimatados ($5,66 \cdot 10^{-7}$).

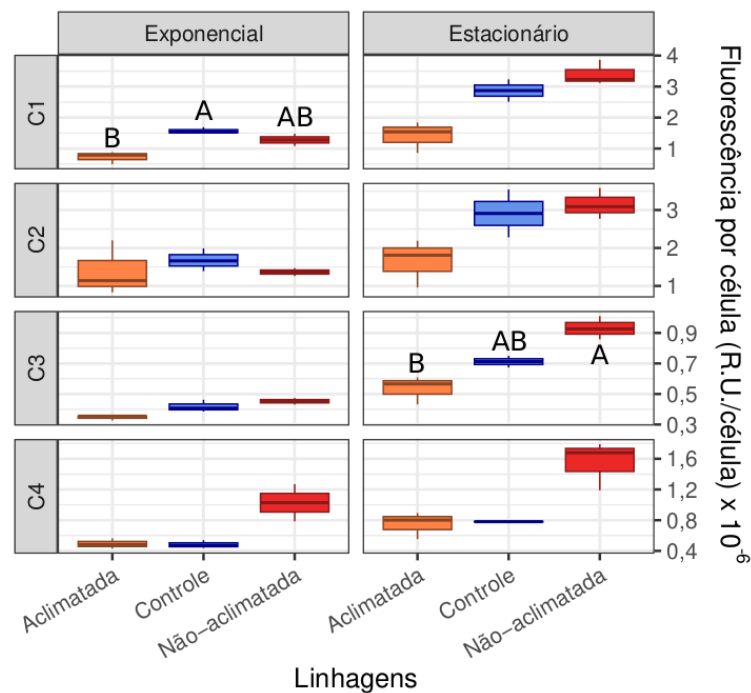


Figura 17 – Comparação da fluorescência absoluta de cada componente normalizado pelo número de células no cultivo, entre linhagens distintas de *Cyclotella* sp. Letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens ($p < 0,05$, $n=7$) resultante de um teste de Kruskal-Wallis, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Uma amostra da linhagem não-aclimatada foi removida por apresentar valor discrepante de concentração de células.

Os coeficientes de variação calculados para os valores de fluorescência absoluta e contribuição relativa dos componentes nas amostras são apresentados na figura 18 e nas tabelas 1 e 2 do apêndice 5. Os testes estatísticos indicam que o fator “tempo” (mudança de estágio de crescimento) exerce efeito maior do que o fator “temperatura” sobre a fluorescência absoluta de todos os componentes, ou seja, sobre a concentração de FDOMp. Por outro lado, ambos fatores (tempo e temperatura) têm influências similares sobre a contribuição relativa de cada componente, ou seja, sobre a composição da FDOMp – com exceção do componente 4, sobre o qual o fator “tempo” predomina.

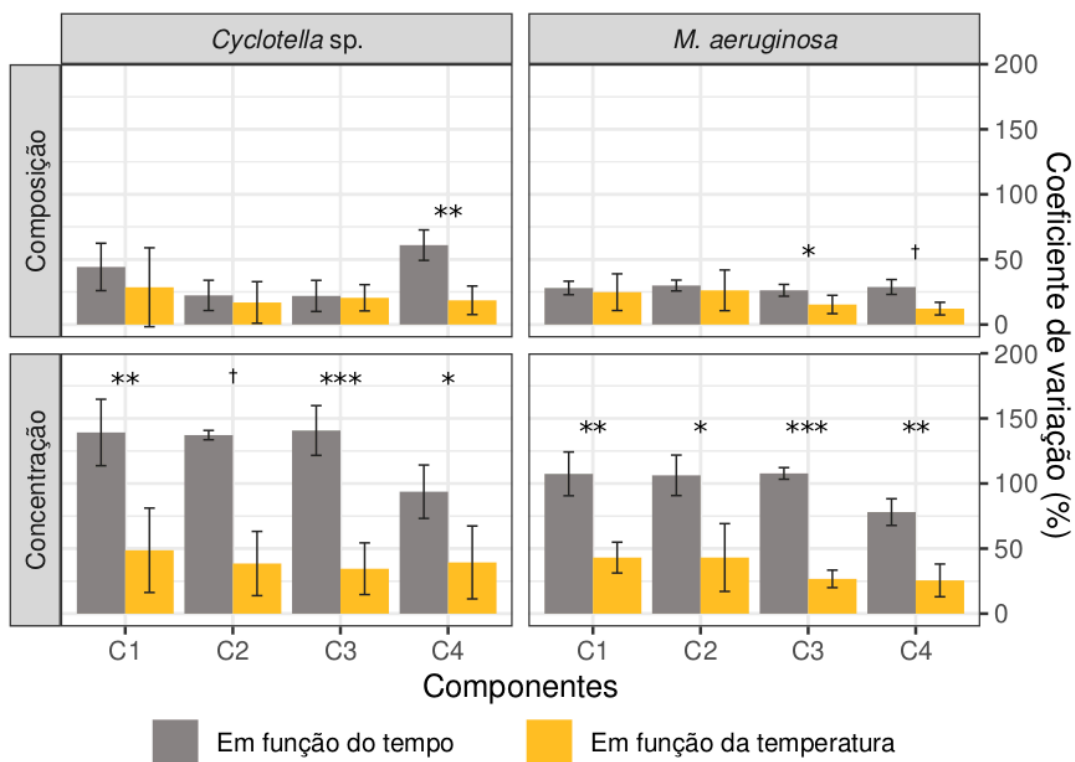


Figura 18 – Coeficientes de variação para os dados de fluorescência absoluta (concentração) e relativa (composição) para ambas espécies de fitoplâncton. As barras cinzas mostram a média dos três coeficientes (um para cada linhagem) de variação dos componentes através dos estágios de crescimento, ou seja, a variação em função do tempo; e as barras amarelas representam a média dos três ou quatro coeficientes (um para cada estágio de crescimento, sendo 3 para *M. aeruginosa* e 4 para *Cyclotella sp.*) de variação dos componentes entre linhagens, ou seja, a variação em função da linhagem/temperatura. Em outras palavras, as colunas cinzas mostram a média de cada uma das colunas superiores das tabelas no apêndice 5, e as amarelas, das colunas inferiores. Os símbolos denotam diferença significativa entre os pares de valores, de acordo com o nível de significância e o teste estatístico aplicado: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ para os Testes t de Student unicaudais à direita; e † $p < 0,05$ para os testes de Wilcoxon-Mann-Whitney unicaudais à direita. Nesses testes, $n=6$ para *M. aeruginosa* e $n=7$ para *Cyclotella sp.*.

4.3.2 ÍNDICES ÓPTICOS

O índice de frescor (Fr), calculado pela razão entre a intensidade de emissão em 380 nm e a intensidade máxima de emissão no intervalo de 420-435nm, na excitação de 310 nm, é indicativo de DOM produzida recentemente, com valores maiores associados a uma maior proporção de DOM “fresca” (FELLMAN; HOOD; SPENCER, 2010; HANSEN *et al.*, 2016). Para *M. aeruginosa* não foram identificadas diferenças entre linhagens em nenhum estágio da curva, apenas diferenças entre estágios: maior no exponencial e menor no estacionário (1,39 e 1,08, respectivamente). As amostras de 24h se assimilaram às do estágio estacionário (1,02) e as amostras de senescência apresentaram uma variação maior (0,91 a 2,28). Para *Cyclotella sp.*, há diferença entre linhagens apenas no estágio exponencial: as amostras da linhagem

não-aclimatada exibiram valor maior (1,63) do que as linhagens aclimatada (1,28) e controle (1,35). As amostras dos estágios exponencial e estacionário apresentam valores similares entre si e maiores do que as amostras de senescência (1,53, 1,39 e 0,98, respectivamente). Já as amostras de 24-38h apresentaram variação mais ampla (0,89 a 1,48). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 1,11 e 1,27, respectivamente. Todos os valores mencionados nesta subseção se referem à mediana dos dados.

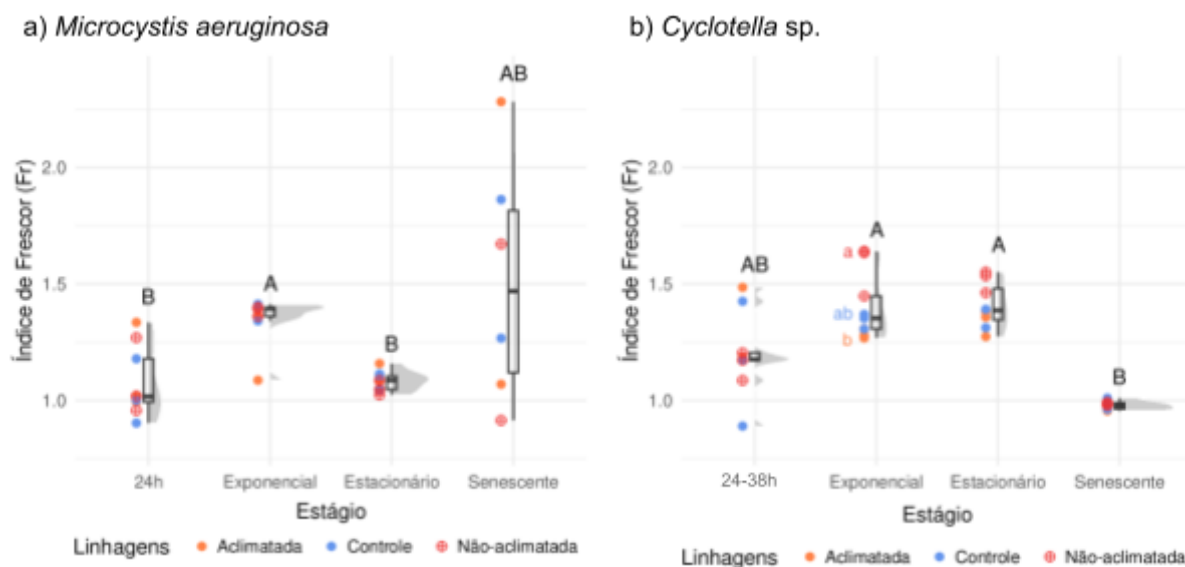


Figura 19 – Diferenças no índice de frescor entre linhagens e estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença entre estágios, letras minúsculas denotam diferença entre linhagens, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Resultados de testes de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais.

O índice de fluorescência (FI), obtido pela razão entre as intensidades de emissão a 470 e 520 nm na faixa de excitação de 370 nm, indica se o pool de DOM é de natureza mais microbiana (~1,8) ou derivada terrestre (~1,2) (GABOR *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2016). Para *M. aeruginosa* foram identificadas diferenças entre linhagens somente após 24h de incubação, com a linhagem aclimatada mostrando um valor maior (1,65) do que a não-aclimatada (1,48), mas sem diferença com a linhagem controle (1,56). Os valores dos estágios exponencial, estacionário e senescente são similares entre si (1,88, 1,85 e 1,86, respectivamente) e todos são maiores que o valor das amostras de 24h (1,56). Para *Cyclotella* sp., constataram-se valores maiores no estágio exponencial para a linhagem não-aclimatada (1,40) em relação à aclimatada (1,33), mas sem diferença com o controle (1,36). Os valores dos estágios exponencial e estacionário são similares entre si (1,34 e 1,36), mas menores que

os valores das amostras de 24h e senescentes (1,49 e 1,56). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 1,84 e 1,45, respectivamente.

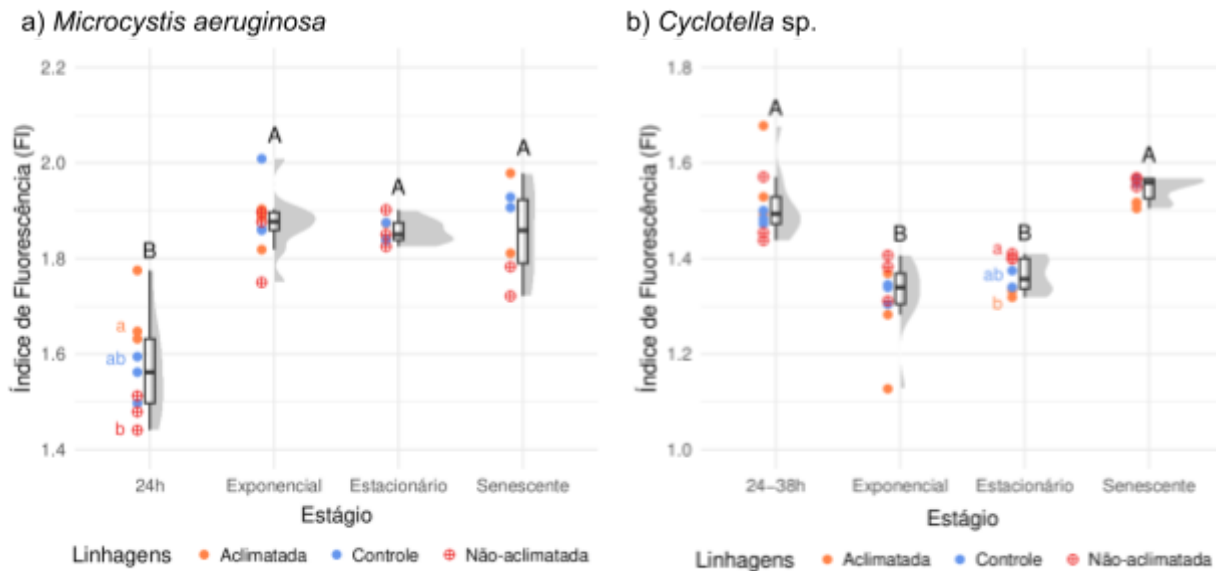


Figura 20 – Diferenças no índice de fluorescência entre linhagens e estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença entre estágios, letras minúsculas denotam diferença entre linhagens, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Resultados de testes de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais.

O índice de humificação (HIX), calculado pela divisão dos picos de intensidade de emissão dos intervalos de 435-480nm por 300-345nm, na altura da excitação de 254nm, responde ao aumento do comprimento de onda de emissão e é indicativo de maior policondensação e menor razão hidrogênio/carbono das moléculas orgânicas (FELLMAN; HOOD; SPENCER, 2010; GABOR *et al.*, 2014). Para *M. aeruginosa* observaram-se diferenças entre linhagens somente no estágio estacionário, com a linhagem controle mostrando valores maiores (2,54) do que a aclimatada (1,77), mas sem diferença com a linhagem não-aclimatada (2,22). Os valores dos estágios exponencial e estacionário são similares entre si (1,97 e 2,22) e ambos são maiores que os valores das amostras de 24h e senescentes (0,76 e 0,45). Para *Cyclotella* sp., constataram-se valores maiores no estágio exponencial para a linhagem não-aclimatada (0,81) em relação à controle (0,55), mas sem diferença com a aclimatada (0,66), e valores maiores no estágio senescente para a linhagem aclimatada (0,79) em relação à controle (0,64), mas sem diferença com a não-aclimatada (0,68). O valor do estágio senescente (0,68) é superior ao das amostras de 24-38h (0,50), mas

ambos não exibem diferença em relação aos valores dos estágios exponencial e estacionário são similares entre si (0,66 e 0,63). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 1,43 e 0,64, respectivamente.

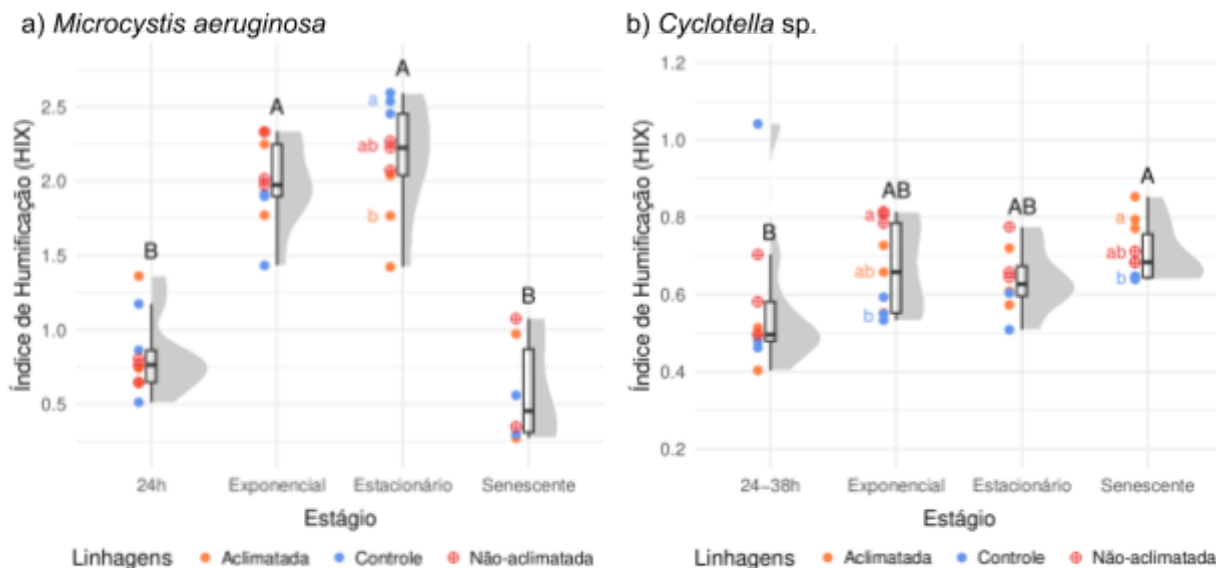


Figura 21 – Diferenças no índice de humificação entre linhagens e estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença entre estágios, letras minúsculas denotam diferença entre linhagens, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Resultados de testes de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais.

O *slope ratio* (Sr), calculado pela razão entre as inclinações (*slopes*) dos intervalos de absorvância de 275-295 nm e 350-400 nm em um espectro de absorvância log-transformado, é inversamente relacionado ao peso molecular da DOM (HANSEN *et al.*, 2016; HELMS *et al.*, 2008). Não foram constatadas diferenças entre linhagens para *M. aeruginosa*. Para *Cyclotella* sp., apenas no estágio estacionário a linhagem não-aclimatada apresentou valor mais alto (1,42) que a acimatada (0,71), mas ambos sem diferença em relação ao controle (1,20). Nas duas espécies observa-se um aumento significativo no decorrer do tempo, com os estágios exponencial e estacionário representando estados intermediários (-0,12, 0,09, 0,23 e 1,28 para *M. aeruginosa* e 0,01, 0,72, 1,20 e 1,66 para *Cyclotella* sp., em ordem de tempo crescente). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 0,17 e 0,96, respectivamente.

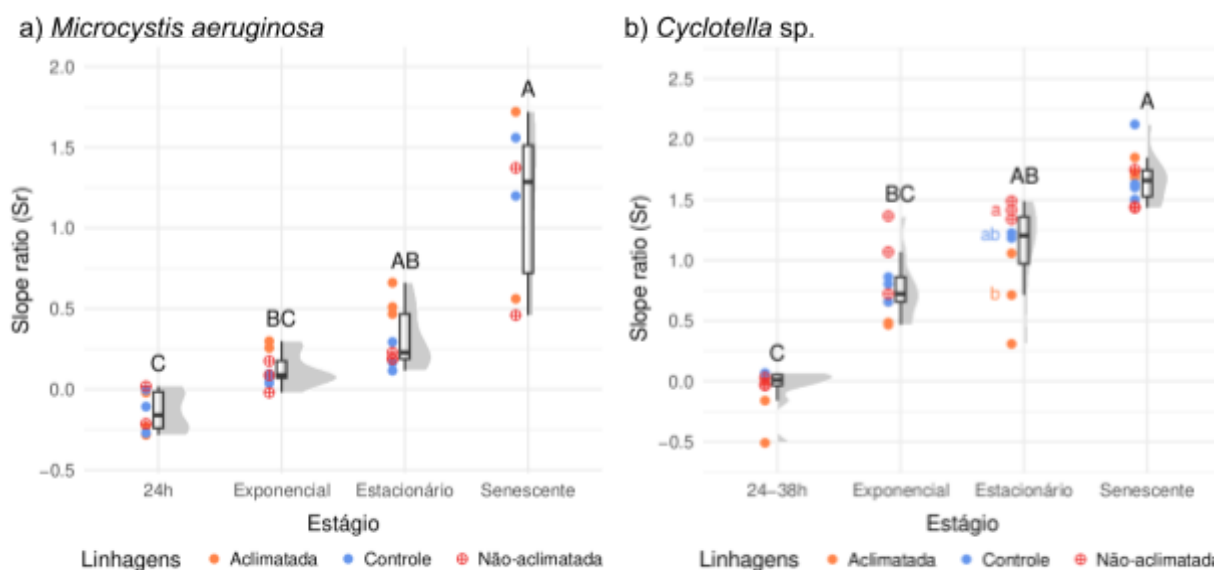


Figura 22 – Diferenças no *slope ratio* entre linhagens e estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença entre estágios, letras minúsculas denotam diferença entre linhagens, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Resultados de testes de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=8$ para *M. aeruginosa* em 24h, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais.

A absorvância ultravioleta específica a 254 nm ($SUVA_{254}$), obtida pela divisão do coeficiente de absorvância a 254 pela concentração de DOC em mg/L, está relacionada ao percentual de aromaticidade da DOM e é potencialmente indicativa de peso molecular (HANSEN et al., 2016; WEISHAAR et al., 2003). Não foram constatadas diferenças entre linhagens para *M. aeruginosa*, e para *Cyclotella* sp. somente no estágio senescente a linhagem não-aclimatada apresentou valor (2,80) mais alto que o da controle (2,62), mas ambos sem diferença em relação ao da aclimatada (2,72). Nas duas espécies observa-se um aumento significativo do estágio exponencial ao senescente (1,39, 3,61 e 5,80 para *M. aeruginosa* e 1,54, 2,06 e 2,71 para *Cyclotella* sp., em ordem de tempo crescente). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 2,32 e 2,11, respectivamente.

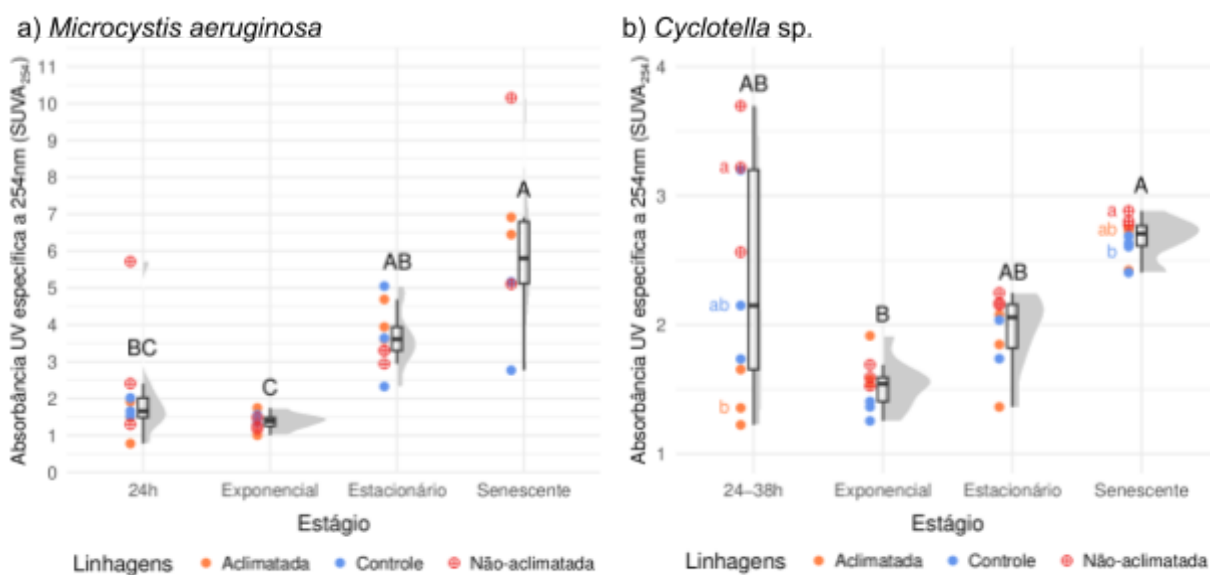


Figura 23 – Diferenças no SUVA₂₅₄ entre linhagens e estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença entre estágios, letras minúsculas denotam diferença entre linhagens, em ordem alfabética do maior para o menor valor. Resultados de testes de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais.

4.3.3 RAZÕES ESPECTRAIS

A razão A+C/T, calculada pela intensidade de fluorescência na região λ_{ex} 250-260 nm x λ_{em} 420-470 nm dividida pela intensidade de fluorescência na região λ_{ex} 270-290 nm x λ_{em} 338-346 nm, indica a proporção de fluorescência similar a substâncias húmicas (em geral consideradas recalcitrantes) *versus* DOM fresca (considerada lábil) (HANSEN et al., 2016). Nenhuma diferença foi identificada entre linhagens em nenhum estágio de crescimento, para ambas espécies. A razão é não-significativamente maior que 1 nos estágios exponencial e estacionário de *M. aeruginosa* (1,08 e 1,06, respectivamente), se reduzindo significativamente na senescência (0,48). Por outro lado, a razão é sempre significativamente menor que 0,5 nos estágios exponencial, estacionário e senescente de *Cyclotella* sp. As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp. foram 0,97 e 0,32, respectivamente. Assim como na subseção anterior, todos os valores mencionados nesta subseção também se referem à mediana dos dados.

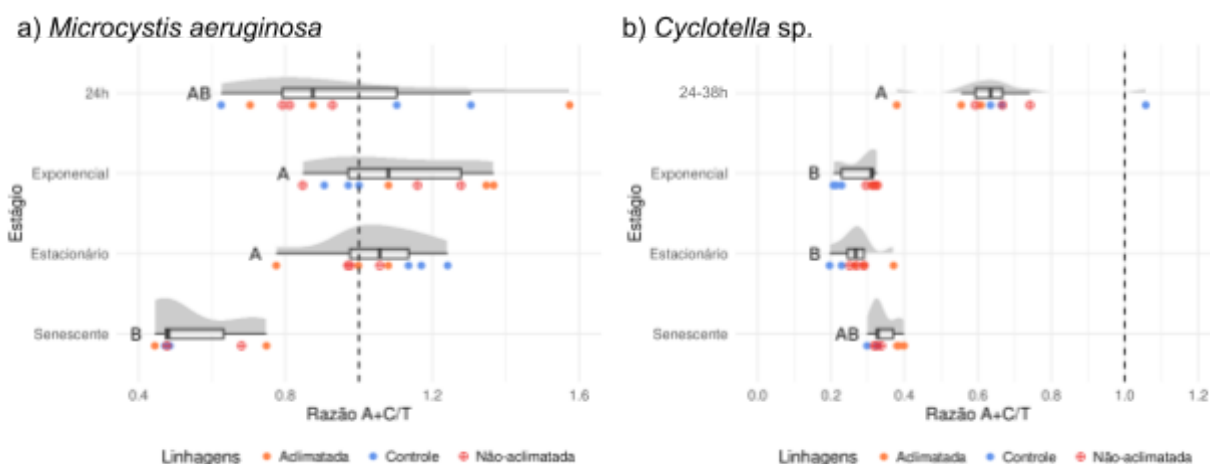


Figura 24 – Diferenças na razão A+C/T entre estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença significativa dada por testes de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella sp.* estacionária, $n=10$ para *Cyclotella sp.* senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais), em ordem alfabética do maior para o menor valor. A linha tracejada marca o valor de A+C/T=1.

A razão C/A, calculada intensidade de fluorescência na região λ_{ex} 320-360 nm x λ_{em} 420-460 nm dividida pela intensidade de fluorescência na faixa λ_{ex} 260 x λ_{em} 400-460 nm, indica a proporção de substâncias húmicas e fúlvicas na amostra (HANSEN *et al.*, 2016). Nenhuma diferença foi identificada entre linhagens em nenhum estágio de crescimento, para ambas espécies. A razão é sempre significativamente menor que 1 e decresce ao longo do tempo nas duas espécies (0,49, 0,48, 0,44 e 0,13 em *M. aeruginosa* e 0,44, 0,42, 0,37 e 0,21 em *Cyclotella sp.*). As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella sp.* foram 0,46 e 0,39, respectivamente.

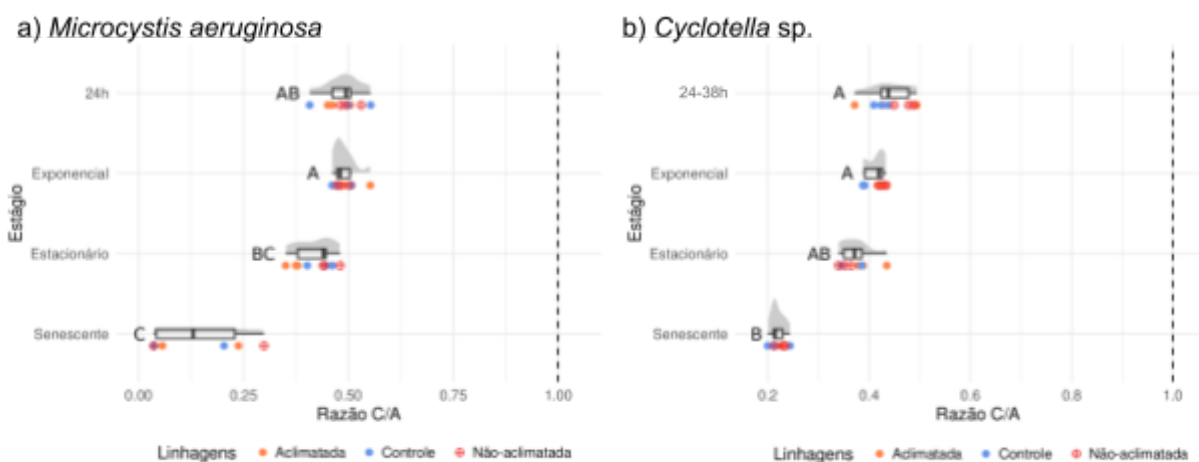


Figura 25 – Diferenças na razão C/A entre estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença significativa dada por testes de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella sp.* estacionária, $n=10$ para *Cyclotella sp.* senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais), em ordem alfabética do maior para o menor valor. A linha tracejada marca o valor de $C/A=1$.

A razão C/M, calculada pela intensidade de fluorescência na região λ_{ex} 320-360 nm x λ_{em} 420-460 nm dividida pela λ_{ex} 290-310 nm x λ_{em} 370-410 nm, é uma indicação do grau de deslocamento azul (*blue-shift*) na amostra, pela proporção dos picos de substâncias húmicas terrestres *versus* microbianas/marinhas (HANSEN et al., 2016). Somente nos estágios exponencial e estacionário de *Cyclotella sp.* os valores da linhagem não aclimatada (0,31 e 0,33) se revelaram inferiores aos da aclimatada (0,42 e 0,40), sem diferença com o controle (0,38 e 0,37). A razão é significativamente menor que 1 em todos os pontos da curva, mas se torna significativamente menor que 0,5 nos estágios exponencial e estacionário de *Cyclotella sp.* (0,38 e 0,37) e aumenta na senescência (0,48), se equiparando aos dados de 24-38h (0,49). Em *M. aeruginosa* a razão é também sempre significativamente menor que 1, aumentando apenas no estágio estacionário, se tornando significativamente maior que 0,5. As medianas globais para *M. aeruginosa* e *Cyclotella sp.* foram 0,55 e 0,46, respectivamente.

Todas as comparações apresentadas nesta subseção entre valores dos estágios e os valores fixados de 1 e 0,5 foram feitas por testes de Wilcoxon de uma amostra com alternativa unicaudal à direita ou à esquerda, sempre com o nível de significância $p < 0,05$.

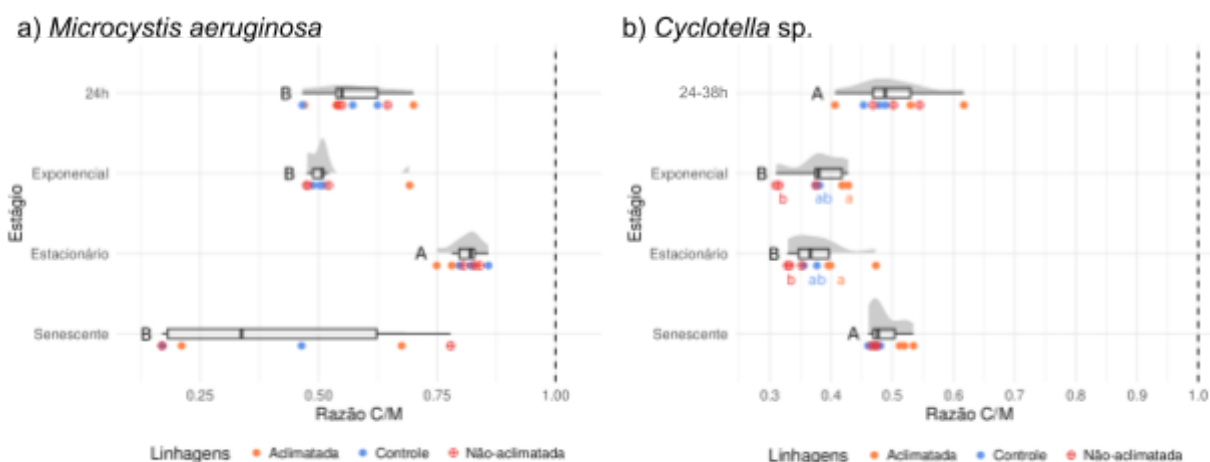


Figura 26 – Diferenças na razão C/M entre estágios da curva de crescimento. Letras maiúsculas denotam diferença significativa dada por testes de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$, $n=8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n=10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n=6$ para *M. aeruginosa* senescente e $n=9$ nos demais), em ordem alfabética do maior para o menor valor. A linha tracejada marca o valor de C/M=1.

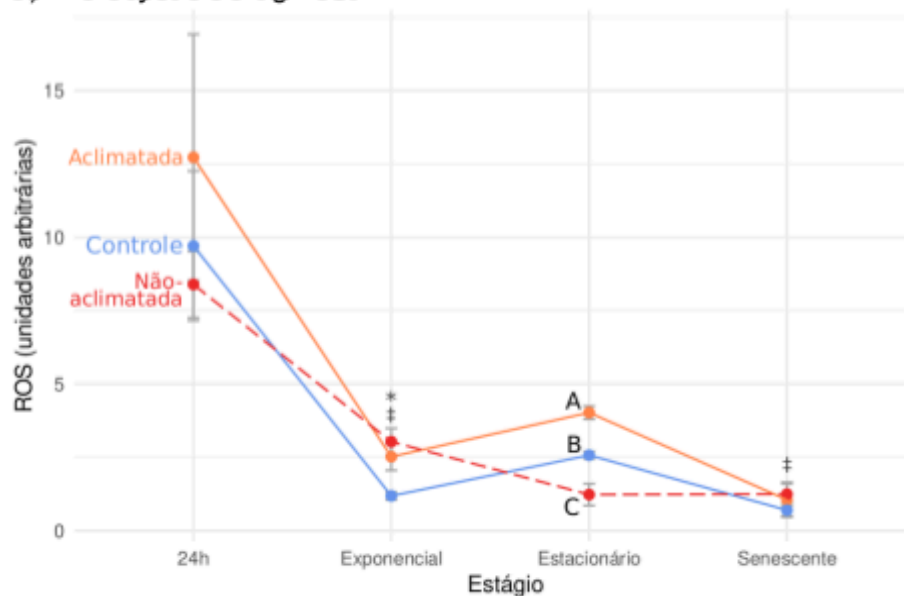
A presença de peptona residual nos cultivos aclimatados de *Cyclotella* sp. foi verificada comparando-se a intensidade de fluorescência nas regiões dos picos T (λ_{ex} 270-290 nm x λ_{em} 338-346 nm) e B (λ_{ex} 270-280 nm x λ_{em} 304-312 nm) entre as linhagens nas amostras de 24-38h. Nenhuma diferença foi encontrada para a fluorescência do pico B (teste de Kruskal-Wallis, $p \geq 0,05$, $n=9$), enquanto que para a fluorescência do pico T o valor médio dos cultivos aclimatados ($0,084 \pm 0,016$) é significativamente maior que o valor dos cultivos não-aclimatados ($0,053 \pm 0,005$), mas não é maior que o controle ($0,067 \pm 0,005$) ($p \geq 0,05$).

4.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Os níveis de ROS para *M. aeruginosa* sempre permaneceram significativamente abaixo de 5 (testes de Wilcoxon de uma amostra com alternativa unicaudal à direita, $p < 0,05$), com contrastes entre linhagens no estágio estacionário: a média dos cultivos aclimatados (4,03) se mostrou maior que a dos cultivos controle (2,57), e ambas maiores que a dos cultivos não-aclimatados (1,23). Além disso, quando comparamos os cultivos de acordo com a faixa de temperatura (ou seja, agrupando aclimatados e não-aclimatados e comparando-os aos controle) verifica-se que aqueles mantidos a 28°C apresentaram uma mediana em torno de 2 vezes maior (2,85) do que aqueles mantidos a 24°C (1,06). Já em *Cyclotella* sp. os níveis de ROS sofreram grande variação. Diferenças significativas foram encontradas entre linhagens após 24-38h, com os cultivos aclimatados exibindo médias maiores (97,97) que o controle

(38,97), mas sem diferença com os cultivos não-aclimatados (71,84). Os níveis de ROS também diferiram entre linhagens nos estágios exponencial e estacionário, sendo sempre muito menores os valores da linhagem aclimatada. Em adição, a mediana dos valores de ROS para *Cyclotella* sp. (110) foi mais de 40 vezes maior que a mediana de *M. aeruginosa* (2,57).

a) *Microcystis aeruginosa*



b) *Cyclotella* sp.

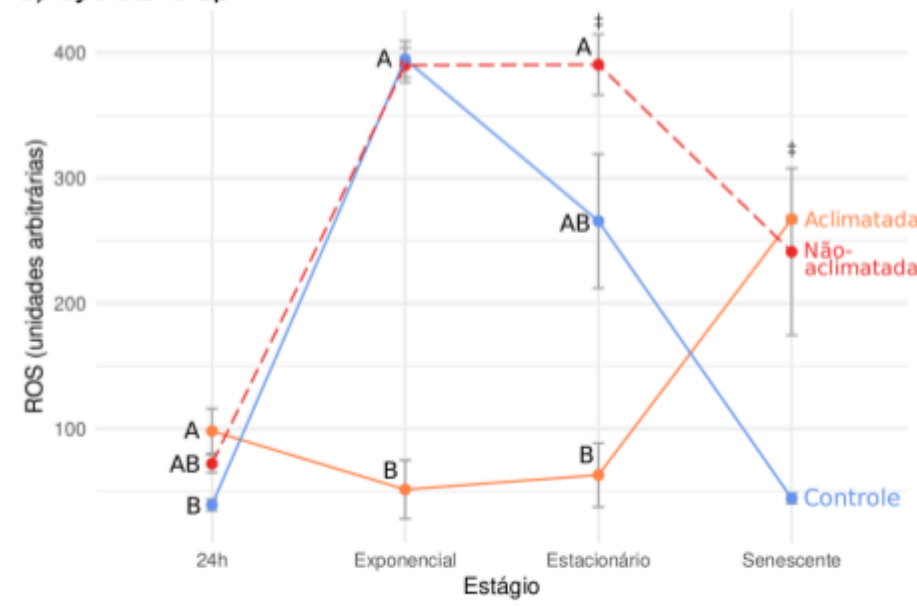


Figura 27 – Níveis de ROS em cada ponto da curva de crescimento. Comparações entre linhagens em cada estágio foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis quando indicado por ‡, e caso contrário, por ANOVA. Letras denotam diferença significativa ($p < 0,05$, $n = 8$ para *Cyclotella* sp. estacionária, $n = 10$ para *Cyclotella* sp. senescente, $n = 6$ para *M. aeruginosa* senescente, $n = 6$ para *M. aeruginosa* em 24h e $n = 9$ nos demais), em ordem alfabética do maior para o menor valor. Dados pouco confiáveis para as amostras de *M. aeruginosa* em 24h em virtude da incubação não ter ocorrido nas respectivas temperaturas dos tratamentos. Das 9 amostras de 24-38h de *Cyclotella* sp., 3 (uma de cada linhagem) contêm dados de ROS calculados a partir da média do valor das *beads*, pois nas análises no FlowJo não foi possível identificá-las. * Quando compara-se o grupo de 28°C (Aclimatada + Não-aclimatada) com o grupo de 24°C (Controle) por um teste de Mann-Whitney, há diferença significativa ($W = 0$, $p = 0,024$, $n = 9$).

5 DISCUSSÃO

5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E PLANO DE AMOSTRAGEM

É interessante notar que na curva de crescimento de *Cyclotella* sp. a 28°C da etapa piloto observa-se um período de 12 dias marcado por uma tímida ascensão e declínio da absorbância de clorofila. Inicialmente, pensou-se que esse fenômeno poderia ser atribuído como um artefato do método de inoculação (diluição de 10% do volume de uma cultura em estágio exponencial) ou simplesmente uma casualidade.

Completadas as curvas de crescimento da etapa experimental, ficou claro que *Cyclotella* sp. apresenta duas “ondas”: uma menor seguida de outra até 4 vezes maior (em termos de absorbância a 680 nm), especialmente a 28°C. Essa dinâmica de crescimento intercalado com aparentes declínios prejudicou a aplicabilidade do plano de amostragem, e dessa forma as coletas de réplicas para análises dos estágios exponencial e estacionário ficaram restritas aos primeiros 30 dias de cultivo, e o período de crescimento mais pronunciado não foi adequadamente amostrado.

Além disso, como o crescimento de *Cyclotella* sp. não ocorreu conforme o esperado, alguns valores foram alterados: ~0,050 para exponencial e ~0,100 para estacionária. Ainda assim, a linhagem aclimatada não atingiu o valor para amostragem estacionária e a coleta de réplicas foi feita em aproximadamente 0,050. Desse modo, é importante levar em consideração os desafios aqui apresentados ao se planejar e executar futuras pesquisas.

5.2 CARBONO ORGÂNICO DISSOLVIDO (DOC)

As diferenças entre as concentrações de carbono orgânico dissolvido nos cultivos de *Cyclotella* sp. nos estágios exponencial e estacionário podem ser atribuídas às diferenças nos tempos de amostragem. As amostras do estágio exponencial para a linhagem aclimatada foram recolhidas no 8º dia de incubação, enquanto que para as linhagens não-aclimatada e controle a coleta ocorreu nos dias 15 e 20, respectivamente. Já nas amostras do estágio estacionário a coleta dos cultivos aclimatados aconteceu no 11º dia, ao passo que para os cultivos não-aclimatados e controles ocorreu no 24º dia. Em ambos os casos nota-se que a concentração de DOC se duplica, no entanto a diferença entre os tempos de amostragem também corresponde aproximadamente ao dobro dos dias. Sendo assim, a análise da taxa de excreção de DOC (figura 13) por cada linhagem pode trazer informações mais esclarecedoras.

Observa-se um aumento aproximado de 165% na taxa de excreção de DOC por *M. aeruginosa* com o aumento de temperatura de 24°C para 28°C. É possível que isso represente uma transição metabólica para um novo estado (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2020; MORENO *et al.*, 2023) no qual uma quantidade maior de carbono é liberada pela população. A diferença significativa entre as linhagens aclimatada e não-aclimatada (-0,01 mgC L⁻¹ d⁻¹) pode ser encarada como a consolidação desse novo estado em um valor ligeiramente mais baixo após o procedimento de aclimação gradual.

Para *Cyclotella* sp. o mesmo aumento de temperatura provocou uma elevação de cerca de 185% nessa taxa, porém apenas para a linhagem não-aclimatada. Inclusive, a linhagem aclimatada apresenta um valor um pouco menor que a controle (-0,02 mgC/L.d). Essas observações parecem refletir uma dinâmica na qual o aumento de temperatura a princípio acarreta em um transbordamento fotossintético (*photosynthetic overflow*) (THORNTON, 2014), porém a longo prazo traz efeitos prejudiciais, especialmente se considerarmos o prolongado tempo de exposição ao aquecimento (23 dias a 26°C e 27 a 61 dias a 28°C).

Assim, em resumo, a quantificação de DOC demonstra que na cianobactéria a aclimação promoveu a elevação da taxa a um novo patamar, enquanto que na diatomácea a aclimação fez com que ela retornasse aos patamares típicos (ou potencialmente abaixo deles, indicando um efeito prejudicial do aquecimento prolongado).

Estes resultados estão em linha com o conhecimento acerca da preferência de diatomáceas por temperaturas menores, sendo particularmente mais abundantes em águas polares, e a preferência de cianobactérias por temperaturas maiores, bem como os efeitos opostos do aquecimento sobre a capacidade fotossintética de ambos grupos, favorecendo cianobactérias e desfavorecendo diatomáceas (CHEN, 2015; MIETTINEN, 2018; STAEHR & BIRKELAND, 2006; TAN, 2011). Assim, corrobora-se a ideia de que a taxa de excreção de DOC pelo fitoplâncton aumenta em função da temperatura (THORNTON, 2014 *apud* LØNBORG *et al.*, 2020), ao menos a curto prazo, e reitera-se a importância de se levar em consideração o fator e o tempo de aclimação do fitoplâncton em estudos que buscam avaliar essas e outras respostas à temperatura (STAEHR; SAND-JENSEN, 2006).

5.3 MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA FLUORESCENTE (FDOM)

Dos 4 componentes identificados, 3 são mais comumente reconhecidos como de origem microbiana (C1, C2 e C4), porém, de acordo com a comparação realizada com os

outros estudos, 1 componente raramente é atribuído a essa fonte (C3). Esse achado reforça um aspecto importante para interpretar a ocorrência de substâncias húmicas em águas naturais: diversos estudos indicam que tais compostos também são produzidos na ausência de fontes terrestres, e por isso deve haver cautela ao assumir que possuem origem alóctone (AMARAL *et al.*, 2021; VINES; TERRY, 2020). Outro exemplo é fornecido pelos compostos frequentemente descritos como “*marine humic-like*”, que aqui foram detectados em cultivos axênicos de fitoplâncton de água doce.

Curiosamente, cerca de um quarto de todas as correspondências se referem a estudos realizados em regiões polares, onde a matéria orgânica é conhecida por ser predominantemente autóctone e com uma baixa influência de fontes alóctones, uma vez que a ausência de plantas vasculares nessas regiões dá espaço para a MOD de origem algal (BERGGREN *et al.*, 2020; POINTING *et al.*, 2015).

Assim, é importante coletar dados sobre a ocorrência e abundância de diferentes espécies de fitoplâncton e outros microrganismos quando se pretende identificar as fontes de DOM em sistemas aquáticos. Nesse contexto, cabe aqui ressaltar que o presente estudo não permitiu avaliar se o fitoplâncton degrada a própria FDOM produzida, mas visto que a concentração de todos os componentes cresce ao longo do tempo, supõe-se que os processos de produção, liberação e transformação se sobrepujam aos de absorção e degradação.

A alteração simultânea dos valores de %C2 e %C3 nas amostras de *M. aeruginosa* estacionária fornecem pistas sobre a biodisponibilidade dos exsudatos produzidos com o aumento de 4°C. Isso porque considera-se que a mistura de compostos associada aos picos A+C é menos biodisponível, ao passo que os compostos associados ao pico T são tidos como altamente bioláveis, e assim um aumento da proporção de moléculas do pico T associada à redução da contribuição de moléculas dos picos A+C representa um aumento da biolabilidade da FDOMp. Esse achado também está em concordância com a variação observada nos valores de HIX entre linhagens no estágio estacionário, que se torna maior nos cultivos controles, intermediário nos cultivos não-aclimatados e menor nos cultivos aclimatados – exatamente a mesma relação encontrada para os valores de %C3. Em contrapartida, a quantidade de fluoróforos totais (soma da fluorescência dos 4 componentes identificados) sofreu um aumento expressivo nos cultivos aclimatados de *M. aeruginosa* estacionária, o que pode indicar um aumento da porção fluorescente da DOM dessa espécie quando se torna ambientada à temperatura maior. Sendo assim, propomos que a proporção de moléculas

fluorescentes na DOM esteja sujeita a alterações em função do aumento de temperatura, pelo menos para a cianobactéria.

Os valores de fluorescência absoluta e relativa da FDOM de *Cyclotella* sp. são mais difíceis de se comparar por conta das disparidades nos tempos de amostragem, portanto as inferências são limitadas. Em 24-38h detecta-se uma quantidade menor de C4 nos cultivos a 28°C do que no controle, o que também ocorre parcialmente na fluorescência relativa (%C4). Em adição, quando comparamos os valores de %C4 aos de ROS nas amostras de 24-38h, percebemos uma relação inversa: nos cultivos aclimatados os níveis de ROS são os maiores, enquanto a FDOM possui a menor proporção do componente 4; nos cultivos controle, os níveis de ROS são os menores, enquanto a FDOM possui a maior proporção do componente 4; e nos cultivos não-aclimatados, verifica-se uma condição intermediária, podendo ser interpretada como um estado de transição. Essa relação inversa é confirmada pelo índice de correlação de Spearman ($S=214$, $p=0,017$, $\rho=-0,7833$).

Uma das explicações possíveis para essa observação é a produção de dímeros de tirosina. A formação desses compostos está ligada à ação enzimática de peroxidases e oxiredutases na presença de ROS, e ajuda a explicar em partes porque microrganismos marinhos produzem FDOM similar a substâncias húmicas (PAERL *et al.*, 2020). EEMs de di-tirosina em solução revelam uma fluorescência proeminente na região dos picos A e M (PAERL *et al.*, 2020), a mesma região de fluorescência do componente 4 identificado no presente estudo.

É evidente que a fluorescência do C4 não pode ser explicada unicamente pela presença de dímeros de tirosina, no entanto parece razoável admitir que a presença dessas substâncias em diferentes concentrações pode modular a fluorescência do C4. Sendo assim, a diminuição desse componente nos cultivos aclimatados e não-aclimatados de *Cyclotella* sp. em 24-38h pode estar relacionada a um comprometimento da capacidade de lidar com as espécies reativas de oxigênio com o aumento de temperatura, sendo que a exposição prolongada ao aquecimento (neste caso, 23 dias a 26°C e 27 dias a 28°C) ocasiona um prejuízo maior.

No estágio exponencial, tanto %C4 quanto a fluorescência absoluta de C4 são maiores nas amostras da linhagem não-aclimatada em relação às linhagens controle e aclimatada. Todavia, atribuir essas mudanças somente à di-tirosina livre poderia implicar na ideia de que a composição da FDOMp não se altera ao longo do tempo. Ainda no estágio exponencial, verifica-se uma quantidade maior de C1 e C3 para os cultivos controle e não-aclimatados em

comparação com os cultivos aclimatados, porém essas divergências não se manifestam nos valores de %C1 e %C3. Já no estágio estacionário, a fluorescência absoluta de todos os quatro componentes é sempre pequena nos cultivos aclimatados e maior nos cultivos não-aclimatados. Com isso, podemos supor que essas diferenças se devem novamente às assimetrias nos tempos de amostragem, além de refletir o crescimento abaixo do esperado nos primeiros 25 dias para os cultivos aclimatados.

Desse modo, comparar a fluorescência dos componentes normalizada pelo número de células no cultivo pode ser mais promissor para desvendar potenciais diferenças entre linhagens nos estágios exponencial e estacionário. A distribuição dos valores de C1 entre linhagens de *Cyclotella* sp. no estágio exponencial aponta para uma provável redução de materiais proteináceos frescos na DOM conforme o tempo de exposição a 28°C aumenta. Esta suposição é confirmada quando agrupamos as amostras por temperatura (cultivos aclimatados + não-aclimatados contra cultivos controle) e realizamos um teste de Mann-Whitney unicaudal ($W=0$, $p= 0,018$, $n=7$). Já a distribuição de valores de C3 no estágio estacionário lembra a distribuição do *slope ratio*, e pode indicar maior acréscimo de compostos húmicos e fúlvicos de menor peso molecular na DOM com a exposição curta a 28°C, mas um aumento no peso molecular e uma redução na quantidade desses compostos com a exposição prolongada, mudança que altera a biodisponibilidade dos exsudatos.

Por fim, a %C2 maior no controle senescente pode ser atribuída à diferença de cerca de 2 semanas entre as amostragens, permitindo que mais células sofressem lise e liberassem proteínas intracelulares, pois a região de fluorescência do C2 (pico B) é geralmente associada a materiais peptídicos mais degradados (FELLMAN et al., 2010 *apud* LEI; YAN; ZHU, 2021; YAMASHITA; BOYER; JAFFÉ, 2013).

Também cabe aqui retomar a questão da presença residual de peptona nos cultivos aclimatados de *Cyclotella* sp. Em primeiro momento, a análise da intensidade de fluorescência na região do pico T parece sugerir que os cultivos aclimatados estariam contaminados por peptona, pois exibiram valores significativamente maiores que os cultivos não-aclimatados. Todavia, considerando que esses valores não são significativamente maiores que os dos cultivos controle, não se pode afirmar que o pequeno aumento na fluorescência do pico T é consequência da presença de peptona e não do processo de aclimação – ou ainda, que a redução da fluorescência do pico T nos cultivos não-aclimatados em relação aos aclimatados não seja resultado da curta e repentina exposição ao aquecimento em oposição à exposição prolongada. Ademais, não se encontraram diferenças significativas entre os valores

de C1, C2, %C1, %C2 e fluorescência do pico B nas amostras de 24-38h das três linhagens. Assim, consideramos que a peptona presente nas “culturas-mãe” de *Cyclotella* sp. (utilizadas para o processo de aclimação) foi diluída e consumida através da repicagem sequencial e não comprometeu os resultados deste estudo.

A interpretação dos índices ópticos complementa a descrição química e biológica da DOMp com informações acerca do peso molecular, biodisponibilidade, extensão de aromaticidade e suposta origem das moléculas. O índice de frescor (Fr) para ambas espécies é igual ou (geralmente) superior aos valores reportados para algas (~0,8) e distantes dos valores associados a solo (~0,5) (HANSEN *et al.*, 2016). O índice de fluorescência (FI) das amostras de *M. aeruginosa* é similar ao esperado para FDOM de origem microbiana ($\geq 1,8\sim 1,9$), mas para *Cyclotella* sp. fica abaixo e se aproxima de valores associados à DOM de origem terrestre ($\leq 1,2\sim 1,4$) (HANSEN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2015; MUSADJI *et al.*, 2020; MCKNIGHT *et al.*, 2001 apud MELO *et al.*, 2020). Com isso, atesta-se a eficiência do Fr para identificar FDOM de origem algal, mas sugere ponderação ao utilizar o FI para determinar as fontes da DOM.

Os valores de $SUVA_{254}$ das duas espécies correspondem aos medidos em águas superficiais (1-6), e os valores de Sr de *Cyclotella* sp. correspondem aos reportados para algas (~1,5), mas os de *M. aeruginosa* ficam abaixo (HANSEN *et al.*, 2016). Além disso, a tendência crescente nos valores destes dois índices indicam que, com o passar do tempo, compostos com maior peso molecular e conteúdo aromático se acumulam na FDOMp das duas espécies. Isso pode ser resultado da policondensação das substâncias húmicas e fúlvicas que se acumulam na FDOMp, fazendo com que moléculas menores reajam entre si formando moléculas maiores. As vias e mecanismos por trás desse processo são complexos ainda não são completamente compreendidos, mas pensa-se que possa ser um processo puramente químico ou mediado por atividade biológica, e que conta com a participação de biopolímeros derivados de algas e bactérias, lipídios ou ácidos graxos poli-insaturados, carboidratos, compostos nitrogenados, fenóis, fenilpropenos e quinonas (GERKE, 2018; ISHIWATARI, 1992; THENG, 1979).

A razão C/A para ambas espécies fica em torno de 0,4-0,5 e diminui em direção à senescência (~0,2), indicando que as substâncias fúlvicas podem ser as figuras principais resultantes desse processo de humificação. Em adição, o decréscimo na razão C/A ao longo do tempo poderia ser explicado por processos de fotodregadação por radiação UVA (HANSEN *et al.*, 2016), mas supõe-se que esse fenômeno tenha influência desprezível no

presente experimento, uma vez que a iluminação LED não emite raios UV em quantidades detectáveis. Ao invés disso, podemos considerar a possibilidade de fotodegradação pela luz visível. Experimentos de fotodegradação de exsudatos de cultivos não-axênicos de *Emiliania huxleyi* conduzidos por Brogi *et al.* (2020) revelaram que a degradação por radiação visível afeta menos os compostos do pico A que os compostos do pico C (redução de 14 e 34% na fluorescência, respectivamente). Assim, a diminuição da razão C/A poderia ser explicada pela fotodegradação diferencial de ambos picos.

Os valores de HIX para *M. aeruginosa* são em geral maiores que os de *Cyclotella* sp., indicando maior grau de humificação na FDOMp da cianobactéria. Além disso, o HIX de *Cyclotella* sp. se alinha com o reportado para DOM de origem algal ($\sim 0,9$), enquanto os valores para *M. aeruginosa* ficam acima, sobretudo nos estágios exponencial e estacionário (HANSEN *et al.*, 2016). Contudo, todos os valores correspondem àqueles associados a materiais derivados de atividade biológica (< 4) (WANG, *et al.*, 2020). Na senescência de *M. aeruginosa*, os valores de HIX se reduzem e a razão A+C/T se torna menor que 1, sugerindo um aumento da liberação de proteínas, provavelmente pela lise celular.

As razões $A+C/T > 1$ e $C/A \sim 0,5$ para *M. aeruginosa* exponencial e estacionária indicam predominância de substâncias fúlvicas, enquanto as razões $A+C/T \sim 0,5$ para *Cyclotella* sp. revelam a predominância de peptídeos, aminoácidos e similares sobre as substâncias fúlvicas ($C/A \sim 0,5$). Assim, levando em conta essas informações e as fornecidas pelo $SUVA_{254}$ e pelo HIX, os exsudatos de *Cyclotella* sp. parecem ser mais lábeis que os de *M. aeruginosa*. A razão C/M é maior nas amostras do estágio estacionário do que nas amostras do estágio exponencial de *M. aeruginosa*, provavelmente indicando uma quantidade maior de C3 (correspondente a A+C) nesse ponto da curva de crescimento em todas as linhagens, mas sem superar a quantidade de C4 (A+M), pois o valor é sempre menor que 1.

A faixa de valores de A+C/T e C/M encontrada para as duas espécies de algas contribui com a proposta de que $A+C/T < 4,5-5,0$ e $C/M > 0,8$ são indicativos de maior contribuição de DOM terrestre do que de fontes microbianas ou vegetais, ao contrário dos valores de C/A, que se sobrepõem aos associados a DOM derivada de solo ($< 0,6$) (HANSEN *et al.*, 2016).

De todas as análises sobre a composição e concentração da FDOMp, as informações fornecidas pelos coeficientes de variação são as mais simples e robustas para responder à primeira hipótese proposta: “espera-se que o aquecimento exerça efeito majoritário sobre a concentração de DOMp fluorescente, ao passo de que as mudanças na composição sejam

ocasionadas principalmente pelos diferentes estágios de crescimento”. As comparações indicam que, na verdade, as mudanças na concentração de FDOMp são invariavelmente governadas pela passagem do tempo, para todos os componentes em ambas espécies, e muito menos pela diferença de temperatura. Esse resultado é reflexo do acúmulo de fluoróforos no meio de cultivo ao longo do tempo, mais uma vez ilustrando que os processos de produção, liberação e transformação dos componentes se sobrepõem aos de absorção e degradação.

Efetivamente, uma predominância do fator “tempo” ao invés do fator “temperatura” sobre a concentração de FDOMp é esperado tendo em vista o desenho experimental adotado, pois a variação no tempo pode ser considerada maior que a variação na temperatura – os dados avaliados pelos coeficientes de variação cobrem um período de 28 dias para *M. aeruginosa* e de 72 dias para *Cyclotella* sp., e nessa escala de tempo maior o aumento de biomassa com o crescimento populacional é mais determinante para a quantidade de FDOMp liberada e acumulada do que a diferença de temperatura de 4°C. Talvez uma amostragem enfatizando um curto período de tempo poderia revelar uma maior influência da temperatura sobre a FDOMp. Por exemplo, se amostras de *M. aeruginosa* fossem tomadas diariamente para as três linhagens entre o 10º e 12º dia de cultivo (ou seja, durante o estágio exponencial), é possível que os efeitos da temperatura sobre a concentração dos componentes se destaquem, pois em escalas de tempo menores o aquecimento seria o principal responsável pelo aumento na produção de biomassa, e, conseqüentemente, pelo aumento na quantidade de FDOMp no meio. Esta ideia é em parte suportada pelos resultados da taxa de excreção de DOC, que aumenta com o aquecimento nos cultivos da cianobactéria.

Em contrapartida, a variação da composição da FDOMp foi influenciada pela ação conjunta do aumento de temperatura e da mudança entre estágios de crescimento, em ambas as espécies. Isso pode representar um efeito interativo das duas variáveis: a mudança de estágios de crescimento define o estado metabólico da população e por conseguinte o perfil da FDOMp exsudada, enquanto a temperatura modula as taxas de produção e liberação de diferentes fluoróforos, portanto a contribuição relativa de cada componente. Com isso, a primeira hipótese é parcialmente corroborada.

5.4 ROS

As variações nos níveis de ROS podem ser parcialmente explicadas por compostos na FDOMp, conforme explorado na seção 5.3, mas parecem ser uma função da atividade

metabólica e fotossintética do fitoplâncton e recebem influência das preferências de temperatura de cada espécie. Nota-se que os níveis de ROS em *Cyclotella* sp. são 1 ordem de magnitude maiores que os de *M. aeruginosa*, ilustrando o melhor *fitness* de cianobactérias em temperaturas mais quentes, ao contrário das diatomáceas.

Os níveis de ROS dos cultivos mantidos a 28°C são superiores aos dos cultivos controle, corroborando a previsão da terceira hipótese proposta, somente no estágio exponencial para *M. aeruginosa* e após 24-38h de incubação para *Cyclotella* sp. Em todas as outras amostras, essa relação não foi observada. De fato, as espécies reativas de oxigênio parecem ser bem explicadas pela atividade metabólica e fotossintética em *Cyclotella* sp.: a linhagem aclimatada, que teve um crescimento abaixo do esperado, mostrou valores muito menores, enquanto as duas outras linhagens exibiram um desempenho melhor e níveis de ROS mais elevados. Isso é corroborado pela correlação positiva entre absorvância a 680 nm e níveis de ROS nas culturas da diatomácea ($S=1571,7$, $p<0,001$, $\rho(\text{rho})=0,76$). Por outro lado, nenhuma das outras variáveis coletadas parecem nos ajudar a compreender as variações nos níveis de ROS da cianobactéria.

6 CONCLUSÕES

Ressalta-se que é fundamental interpretar os resultados aqui reportados considerando suas limitações antes de extrapolá-los aos ecossistemas naturais. Não avaliamos os efeitos sinérgicos de interações com bactérias e zooplâncton, que exercem grande influência sobre a FDOMp, e tampouco efeitos da combinação com outras variáveis compreendidas pela mudança climática, como a pressão parcial de CO₂ atmosférico e a disponibilidade de nutrientes. Também não se examinaram aspectos evolutivos ou de substituição genotípica intraespecífica (BERTHOLD; CAMPBELL, 2021), que ocorrem nos ambientes naturais em escalas de tempo superiores às aqui compreendidas.

Ademais, é essencial se atentar à limitação da janela analítica da espectroscopia de fluorescência (MURPHY *et al.* 2010 *apud* CATALÁN *et al.*, 2020) e o desafio persistente de progredir em direção a uma compreensão molecular da DOM (STUBBINS *et al.*, 2014). Nesse sentido, estudos que combinem a espectroscopia de fluorescência com outras técnicas de separação e caracterização química avançada como as técnicas de cromatografia líquida e à gás, fracionamento em campo de fluxo (FFF), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de massas por transformada de Fourier e

ressonância ciclotrônica de íons (FT-ICR-MS) ou a ressonância nuclear magnética (NMR), além de análises de biologia molecular, como transcriptômica e construção de genomas anotados, têm um grande potencial de contribuir com avanços significativos em direção a uma compreensão abrangente e detalhada da DOM.

Feitas estas considerações, ressaltam-se as variações encontradas na concentração e na composição da FDOMp produzida por *Microcystis aeruginosa* e *Cyclotella* sp., que podem ser atribuídas tanto às mudanças de temperatura como aos estágios de crescimento. Os coeficientes de variação obtidos demonstram que o aquecimento e a mudança de estágio de crescimento conjuntamente alteram a composição da FDOMp, enquanto que o aumento de biomassa com o passar do tempo é o principal determinante da concentração da FDOMp em escalas de tempo maiores (semanas a meses), refutando parte da primeira hipótese. A segunda hipótese se mostrou verdadeira apenas no estágio estacionário de *Microcystis aeruginosa*, com a diminuição do HIX indicando uma tendência à redução do número de anéis aromáticos e do tamanho dos fluoróforos com o aumento de temperatura, possivelmente pelo aumento de fluidez da membrana plasmática. Em geral, a excreção de DOC e a biodisponibilidade da DOMp aumentaram nos cultivos de *M. aeruginosa*, e o inverso foi observado para os cultivos de *Cyclotella* sp. Por outro lado, as variações nos níveis de ROS foram pouco explicadas pela temperatura e demais variáveis coletadas, o que refuta a terceira hipótese e demonstra que a produção de ROS é um fenômeno complexo.

Estes achados, apesar das restrições apresentadas no início desta seção, nos permitem definir algumas expectativas acerca da resposta dos microbiomas aquáticos às mudanças climáticas. As vantagens competitivas de táxons fitoplancônicos mais adaptados ao calor e as mudanças na quantidade e biodisponibilidade da DOMp podem alterar a estrutura da teia (osmo)trófica e a velocidade da ciclagem do carbono no chamado “loop microbiano”. Interações com outras mudanças ambientais (como o aumento da concentração de CO₂ atmosférico e a tendência à eutrofização dos corpos d’água) podem intensificar esses impactos, ao passo de que mecanismos genéticos e evolutivos podem, pelo menos parcialmente, tamponar essas alterações.

Em adição, as diferenças encontradas entre as linhagens aclimatada e não-aclimatada reiteram a importância do procedimento de aclimação à temperatura no estudo da fisiologia e ecologia do fitoplâncton. Já a possível correlação entre C4 e ROS ilustra a utilidade da análise da FDOM por sua particular sensibilidade de fluoróforos a interações químicas.

Por último, enfatiza-se a necessidade de se desvendar a composição dos picos A, C e M, que provavelmente abrangem uma complexidade de arranjos moleculares imensa e pouco explorada. Também lançam-se perguntas como: qual é a extensão da influência de dímeros de tirosina na fluorescência da DOM em cultivos e em ambientes naturais? Qual sua relação com mecanismos de detoxificação de ROS? A porcentagem de moléculas fluorescentes na DOM é constante ou se altera em função de fatores bióticos e abióticos? Como os efeitos do aquecimento sobre a FDOMp serão repercutidos nos demais níveis tróficos?

7 REFERÊNCIAS

AIKEN, G. Fluorescence and Dissolved Organic Matter: A Chemist's Perspective. In: COBLE, P. G.; LEAD, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M.; SPENCER, R. G. M. (Eds.). **Aquatic Organic Matter Fluorescence**. 1. ed. [s.l.] : Cambridge University Press, 2014. p. 35–74.

ALHO, L. de O. G.; GEBARA, R. C.; PAINA, K. de A.; SARMENTO, H.; MELÃO, M. da G. G. Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 169, p. 950–959, 2019.

ALLEN, J.; GROSS, E. M.; COURCOUL, C.; BOULETREAU, S.; COMPIN, A.; ELGER, A.; FERRIOL, J.; HILT, S.; JASSEY, V. E. J.; LAVIALE, M.; POLST, B. H.; SCHMITT-JANSEN, M.; STIBOR, H.; VIJAYARAJ, V.; LEFLAIVE, J. Disentangling the direct and indirect effects of agricultural runoff on freshwater ecosystems subject to global warming: A microcosm study. **Water Research**, [s. l.], v. 190, p. 116713, 2021.

AMANO, Y.; TAKAHASHI, K.; MACHIDA, M. Competition between the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the diatom *Cyclotella* sp. under nitrogen-limited condition caused by dilution in eutrophic lake. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 965–971, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10811-011-9718-8>>.

AMARAL, V.; ORTEGA, T.; ROMERA-CASTILLO, C.; FORJA, J. Linkages between greenhouse gases (CO₂, CH₄, and N₂O) and dissolved organic matter composition in a shallow estuary. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 788, p. 147863, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896972102934X>>.

AMIN, S. A.; HMELO, L. R.; VAN TOL, H. M.; DURHAM, B. P.; CARLSON, L. T.; HEAL, K. R.; MORALES, R. L.; BERTHIAUME, C. T.; PARKER, M. S.; DJUNAEDI, B.; INGALLS, A. E.; PARSEK, M. R.; MORAN, M. A.; ARMBRUST, E. V. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. **Nature**, [s. l.], v. 522, n. 7554, p. 98–101, 2015.

ANDERSON, T. R.; WILLIAMS, P. J. le B. Modelling the Seasonal Cycle of Dissolved Organic Carbon at Station E1 in the English Channel. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 93–109, 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272771497902572>>.

ARTIFON, V.; ZANARDI-LAMARDO, E.; FILLMANN, G. Aquatic organic matter: Classification and interaction with organic microcontaminants. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 649, p. 1620–1635, 2019.

AWAD, J.; VAN LEEUWEN, J.; CHOW, C.; DRIKAS, M.; SMERNIK, R. J.; CHITTLEBOROUGH, D. J.; BESTLAND, E. Characterization of dissolved organic matter for prediction of trihalomethane formation potential in surface and sub-surface waters. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 308, p. 430–439, 2016.

BAGATINI, I. L.; EILER, A.; BERTILSSON, S.; KLAVENESS, D.; TESSAROLLI, L. P.; VIEIRA, A. A. H. Host-Specificity and Dynamics in Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Phytoplankton. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e85950, 2014.

BAKER, A.; SPENCER, R. G. M. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 333, n. 1–3, p. 217–232, 2004.

BECKER, J. W.; BERUBE, P. M.; FOLLETT, C. L.; WATERBURY, J. B.; CHISHOLM, S. W.; DELONG, E. F.; REPETA, D. J. Closely related phytoplankton species produce similar suites of dissolved organic matter. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 5, 2014.

Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00111/abstract>>.

BEGUM, M. S.; PARK, J.-H.; YANG, L.; SHIN, K. H.; HUR, J. Optical and molecular indices of dissolved organic matter for estimating biodegradability and resulting carbon dioxide production in inland waters: A review. **Water Research**, [s. l.], v. 228, p. 119362, 2023.

BERGGREN, M.; GUDASZ, C.; GUILLEMETTE, F.; HENSGENS, G.; YE, L.; KARLSSON, J. Systematic microbial production of optically active dissolved organic matter in subarctic lake water. **Limnology and Oceanography**, v. 65, n. 5, p. 951–961, 2020.

BERTHOLD, M.; CAMPBELL, D. A. Restoration, conservation and phytoplankton hysteresis. **Conservation Physiology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. coab062, 2021. Disponível em: <<https://academic.oup.com/conphys/article/doi/10.1093/conphys/coab062/6350441>>.

BERTILSSON, S.; JONES, J. B. Supply of Dissolved Organic Matter to Aquatic Ecosystems. In: **Aquatic Ecosystems**. [s.l.] : Elsevier, 2003. p. 3–24.

BROGI, S. R.; CHARRIÈRE, B.; GONNELLI, M.; VAULTIER, F.; SEMPÉRÉ, R.; VESTRI, S.; SANTINELLI, C. Effect of UV and Visible Radiation on Optical Properties of Chromophoric Dissolved Organic Matter Released by *Emiliana huxleyi*. *Journal of Marine Science and Engineering*, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 888, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-1312/8/11/888>>.

CALFEE, B. C.; GLASGO, L. D.; ZINSER, E. R. Prochlorococcus Exudate Stimulates Heterotrophic Bacterial Competition with Rival Phytoplankton for Available Nitrogen. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. e02571-21, 2022.

CATALÁN, N.; PASTOR, A.; BORREGO, C. M.; CASAS-RUIZ, J. P.; HAWKES, J. A.; GUTIÉRREZ, C.; VON SCHILLER, D.; MARCÉ, R. The relevance of environment vs. composition on dissolved organic matter degradation in freshwaters. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 306–320, 2021. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lno.11606>>.

CAHYONUGROHO, O.; HARIYANTO, S.; SUPRIYANTO, G. Dissolved organic matter and its correlation with phytoplankton abundance for monitoring surface water quality. **Global Journal of Environmental Science and Management**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.22034/GJESM.2022.01.05>>.

CHEN, B. Patterns of thermal limits of phytoplankton. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 285–292, 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/plankt/article/37/2/285/1458783/Patterns-of-thermal-limits-of-phytoplankton>>.

CHEN, M.; KIM, S.-H.; JUNG, H.-J.; HYUN, J.-H.; CHOI, J. H.; LEE, H.-J.; HUH, I.-A.; HUR, J. Dynamics of dissolved organic matter in riverine sediments affected by weir impoundments: Production, benthic flux, and environmental implications. **Water Research**,

[s. l.], v. 121, p. 150–161, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417303810>>.

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

COBLE, P. G. Marine Optical Biogeochemistry: The Chemistry of Ocean Color. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 402–418, 2007.

COHEN. **Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for the Behavioral Sciences**. 3. ed. : Routledge, 2013. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9780203774441>>.

COLE, J. J.; HARARUK, O.; SOLOMON, C. T. The Carbon Cycle: With a Brief Introduction to Global Biogeochemistry. In: **Fundamentals of Ecosystem Science**. [s.l.] : Elsevier, 2021. p. 131–160.

CORY, R. M.; BOYER, E. W.; MCKNIGHT, D. M. Spectral Methods to Advance Understanding of Dissolved Organic Carbon Dynamics in Forested Catchments. In: LEVIA, D. F.; CARLYLE-MOSES, D.; TANAKA, T. (Eds.). **Forest Hydrology and Biogeochemistry**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. v. 216p. 117–135.

CORY, R. M.; MCKNIGHT, D. M. Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 39, n. 21, p. 8142–8149, 2005. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es0506962>>.

CUI, H.; ZHU, X.; ZHU, Y.; HUANG, Y.; CHEN, B. Ecotoxicological effects of DBPs on freshwater phytoplankton communities in co-culture systems. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 421, p. 126679, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389421016447>>.

DAINARD, P. G.; GUÉGUEN, C. Distribution of PARAFAC modeled CDOM components in the North Pacific Ocean, Bering, Chukchi and Beaufort Seas. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 157, p. 216–223, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304420313001813>>.

DALMAGRO, H.; LATHUILLIÈRE, M.; SALLO, F.; GUERREIRO, M.; PINTO, O.; DE ARRUDA, P.; COUTO, E.; JOHNSON, M. Streams with Riparian Forest Buffers versus Impoundments Differ in Discharge and DOM Characteristics for Pasture Catchments in Southern Amazonia. **Water**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 390, 2019.

D'ANDRILLI, J.; FOREMAN, C. M.; SIGL, M.; PRISCU, J. C.; MCCONNELL, J. R. A 21 000-year record of fluorescent organic matter markers in the WAIS Divide ice core. **Climate of the Past**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 533–544, 2017. Disponível em: <<https://cp.copernicus.org/articles/13/533/2017/>>.

D'ANDRILLI, J.; JUNKER, J. R.; SMITH, H. J.; SCHOLL, E. A.; FOREMAN, C. M. DOM composition alters ecosystem function during microbial processing of isolated sources. **Biogeochemistry**, [s. l.], v. 142, n. 2, p. 281–298, 2019.

DEMMIG-ADAMS, B.; DUMLAO, M. R.; HERZENACH, M. K.; ADAMS, W. W. Acclimation. In: **Encyclopedia of Ecology**. [s.l.] : Elsevier, 2008. p. 15–23.

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**, [s. l.], v. 694, p. 133714, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719336526>>.

DIANA, M.; FELIPE-SOTELO, M.; BOND, T. Disinfection byproducts potentially responsible for the association between chlorinated drinking water and bladder cancer: A review. **Water Research**, [s. l.], v. 162, p. 492–504, 2019.

DIEHL, S.; BERGER, S. A.; USZKO, W.; STIBOR, H. Stoichiometric mismatch causes a warming-induced regime shift in experimental plankton communities. **Ecology**, [s. l.], v. 103, n. 5, 2022.

EIGEMANN, F.; RAHAV, E.; GROSSART, H.; AHARONOVICH, D.; SHER, D.; VOGTS, A.; VOSS, M. Phytoplankton exudates provide full nutrition to a subset of accompanying heterotrophic bacteria via carbon, nitrogen and phosphorus allocation. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 2467–2483, 2022.

EPPLEY, R.W. Temperature and phytoplankton growth in the sea. **Fishery Bulletin**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 1063–1085, 1972.

FAUSTINO, S. B.; FONTANA, L.; BARTOZEK, E. C. R.; BICUDO, C. E. D. M.; BICUDO, D. D. C. Composition and distribution of diatom assemblages from core and surface sediments of a water supply reservoir in Southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032016000200203&lng=en&tlng=en>.

FELLMAN, J. B.; HOOD, E.; SPENCER, R. G. M. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 55, n. 6, p. 2452–2462, 2010.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C.; PÉREZ-LORENZO, M.; PRATT, N.; MOORE, C. M.; BIBBY, T. S.; MARAÑÓN, E. Effects of Temperature and Nutrient Supply on Resource Allocation, Photosynthetic Strategy, and Metabolic Rates of *Synechococcus* sp. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 818–829, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpy.12983>>.

FEUCHTMAYR, H.; POTTINGER, T. G.; MOORE, A.; DE VILLE, M. M.; CAILLOUET, L.; CARTER, H. T.; PEREIRA, M. G.; MABERLY, S. C. Effects of brownification and warming on algal blooms, metabolism and higher trophic levels in productive shallow lake mesocosms. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 678, p. 227–238, 2019.

GABOR, R. S.; BAKER, A.; MCKNIGHT, D. M.; MILLER, M. P. Fluorescence Indices and Their Interpretation. In: COBLE, P. G.; LEAD, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M.; SPENCER, R. G. M. (Eds.). **Aquatic Organic Matter Fluorescence**. 1. ed. [s.l.] : Cambridge University Press, 2014. p. 303–338.

GERKE, J. Concepts and Misconceptions of Humic Substances as the Stable Part of Soil Organic Matter: A Review. **Agronomy**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 76, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4395/8/5/76>>.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C. **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

HAN, Y.; QU, C.; HU, X.; WANG, P.; WAN, D.; CAI, P.; RONG, X.; CHEN, W.; HUANG, Q. Warming and humidification mediated changes of DOM composition in an Alfisol. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 805, p. 150198, 2022.

HANSEN, A. M.; KRAUS, T. E. C.; PELLERIN, B. A.; FLECK, J. A.; DOWNING, B. D.; BERGAMASCHI, B. A. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. **Limnology and Oceanography**, v. 61, n. 3, p. 1015–1032, 2016.

HILLEBRAND, H.; ACEVEDO-TREJOS, E.; MOORTHI, S. D.; RYABOV, A.; STRIEBEL, M.; THOMAS, P. K.; SCHNEIDER, M. Cell size as driver and sentinel of phytoplankton community structure and functioning. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 276–293, 2022.

HUANG, W.; MCDOWELL, W. H.; ZOU, X.; RUAN, H.; WANG, J.; MA, Z. Qualitative differences in headwater stream dissolved organic matter and riparian water-extractable soil organic matter under four different vegetation types along an altitudinal gradient in the Wuyi Mountains of China. **Applied Geochemistry**, [s. l.], v. 52, p. 67–75, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883292714002777>>.

IPCC. Summary for Policymakers. In: MASSON-DELMOTTE, V.; ZHAI, P.; PIRANI, A.; CONNORS, S.L.; PÉAN, C.; BERGER, S.; CAUD, N.; CHEN, Y.; GOLDFARB, L.; GOMIS, M.I.; HUANG, M.; LEITZELL, K.; LONNOY, E.; MATTHEWS, J.B.R.; MAYCOCK, T.K.; WATERFIELD, T.; YELEKÇI, O.; YU, R.; ZHOU, B. (Eds.). **Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, 2021, p. 3–32.

IPCC. Summary for Policymakers. In: PÖRTNER, H.-O.; ROBERTS, D.C.; TIGNOR, M.; POLOCZANSKA, E.S.; MINTENBECK, K.; ALEGRÍA, A.; CRAIG, M.; LANGSDORF, S.; LÖSCHKE, S.; MÖLLER, V.; OKEM, A.; RAMA, B. (Eds.). **Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, 2022, p. 3–33.

ISHIWATARI, R. Macromolecular material (humic substance) in the water column and sediments. **Marine Chemistry**, [s. l.], v. 39, n. 1–3, p. 151–166, 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/030442039290099V>>.

JIAO, N.; HERNDL, G. J.; HANSELL, D. A.; BENNER, R.; KATTNER, G.; WILHELM, S. W.; KIRCHMAN, D. L.; WEINBAUER, M. G.; LUO, T.; CHEN, F.; AZAM, F. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 593–599, 2010.

JOHANSSON, O. N.; PINDER, M. I. M.; OHLSSON, F.; EGARDT, J.; TÖPEL, M.; CLARKE, A. K. Friends With Benefits: Exploring the Phycosphere of the Marine Diatom *Skeletonema marinoi*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, p. 1828, 2019.

KANG, J.; LUO, Z.; MOHAMED, Hala. F.; LIN, Y.; HUANG, S.; WANG, Y.; LAN, W. Environmental Regulation of Photosynthetically Produced Dissolved Organic Carbon by Phytoplankton Along a Subtropical Estuarine Bay. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 9, p. 813401, 2022.

KELSO, J. E.; ROSI, E. J.; BAKER, M. A. Towards more realistic estimates of DOM decay in streams: Incubation methods, light, and non-additive effects. **Freshwater Science**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 559–575, 2020.

KIDA, M.; KOJIMA, T.; TANABE, Y.; HAYASHI, K.; KUDOH, S.; MAIE, N.; FUJITAKE, N. Origin, distributions, and environmental significance of ubiquitous humic-like fluorophores in Antarctic lakes and streams. **Water Research**, [s. l.], v. 163, p. 114901, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004313541930675X>>.

KOTHAWALA, D. N.; MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A.; WEYHENMEYER, G. A.; TRANVIK, L. J. Inner filter correction of dissolved organic matter fluorescence: Correction of inner filter effects. **Limnology and Oceanography: Methods**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 616–630, 2013.

LAMBERT, T.; BOUILLON, S.; DARCHAMBEAU, F.; MORANA, C.; ROLAND, F. A. E.; DESCY, J.-P.; BORGES, A. V. 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**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 191–211, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10533-017-0387-9>>.

LANDA, M.; BLAIN, S.; CHRISTAKI, U.; MONCHY, S.; OBERNOSTERER, I. Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 39–50, 2016.

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

LAPIERRE, J.-F.; DEL GIORGIO, P. A. Partial coupling and differential regulation of biologically and photochemically labile dissolved organic carbon across boreal aquatic networks. **Biogeosciences**, [s. l.], v. 11, n. 20, p. 5969–5985, 2014. Disponível em: <<https://bg.copernicus.org/articles/11/5969/2014/>>.

LEE, B. S.; LAJTHA, K.; JONES, J. A.; WHITE, A. E. Fluorescent DOC characteristics are related to streamflow and pasture cover in streams of a mixed landscape. **Biogeochemistry**, [s. l.], v. 140, n. 3, p. 317–340, 2018.

LEI, J.; YANG, L.; ZHU, Z. Testing the effects of coastal culture on particulate organic matter using absorption and fluorescence spectroscopy. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 325, p. 129203, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652621033898>>.

LI, W.; XU, X.; FUJIBAYASHI, M.; NIU, Q.; TANAKA, N.; NISHIMURA, O. Response of microalgae to elevated CO₂ and temperature: impact of climate change on freshwater ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 19, p. 19847–19860, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-7180-5>>.

LI, P.; HUR, J. Utilization of UV-Vis spectroscopy and related data analyses for dissolved organic matter (DOM) studies: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 131–154, 2017.

LØNBORG, C.; CARREIRA, C.; JICKELLS, T.; ÁLVAREZ-SALGADO, X. A. Impacts of Global Change on Ocean Dissolved Organic Carbon (DOC) Cycling. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 7, p. 466, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2020.00466/full>>.

MELO, M. L.; KOTHAWALA, D. N.; BERTILSSON, S.; AMARAL, J. H.; FORSBERG, B.; SARMENTO, H. Linking dissolved organic matter composition and bacterioplankton communities in an Amazon floodplain system. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 63–76, 2020.

MESQUITA, M. C. B.; PRESTES, A. C. C.; GOMES, A. M. A.; MARINHO, M. M. Direct Effects of Temperature on Growth of Different Tropical Phytoplankton Species. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-019-01384-w>>.

MIETTINEN, A. Diatoms in Arctic regions: Potential tools to decipher environmental changes. **Polar Science**, [s. l.], v. 18, p. 220–226, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873965217301391>>.

MONTEIRO, A.; SANTANA, M.; CHIELLE, R.; GARCIA, C.; ALVES, J. Characterization of Aquatic Organic Matter in a Natural Environment in Northeastern Brazil. **Química Nova**, [s. l.], 2020.

MORANA, C.; SARMENTO, H.; DESCY, J.-P.; GASOL, J. M.; BORGES, A. V.; BOUILLON, S.; DARCHAMBEAU, F. Production of dissolved organic matter by

phytoplankton and its uptake by heterotrophic prokaryotes in large tropical lakes. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 1364–1375, 2014.

MORENO, H. D.; ROKITTA, S.; TREMBLAY, N.; BOERSMA, M.; GROSS, E.; KLIP, H. C. L.; WILTSHIRE, K. H.; MEUNIER, C. L. Higher temperature, increased CO₂, and changing nutrient ratios alter the carbon metabolism and induce oxidative stress in a cosmopolitan diatom. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 121–139, 2024. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lno.12463>>.

MOUSING, E.; ELLEGAARD, M.; RICHARDSON, K. Global patterns in phytoplankton community size structure—evidence for a direct temperature effect. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 497, p. 25–38, 2014.

MÜHLENBRUCH, M.; GROSSART, H.; EIGEMANN, F.; VOSS, M. Mini-review: Phytoplankton-derived polysaccharides in the marine environment and their interactions with heterotrophic bacteria. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 2671–2685, 2018.

MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A.; WENIG, P.; BRO, R. OpenFluor— an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. **Anal. Methods**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 658–661, 2014.

MUSADJI, N. Y.; LEMÉE, L.; CANER, L.; POREL, G.; POINOT, P.; GEFFROY-RODIER, C. Spectral characteristics of soil dissolved organic matter: Long-term effects of exogenous organic matter on soil organic matter and spatial-temporal changes. **Chemosphere**, [s. l.], v. 240, p. 124808, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653519320478>>.

MYKLESTAD, S. M. Dissolved Organic Carbon from Phytoplankton. In: WANGERSKY, P. J. (Ed.). **Marine Chemistry**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. v. 5Dp. 111–148.

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.

O'CONNELL, D. W.; ANSEMS, N.; KUKKADAPU, R. K.; JAISI, D.; ORIHIL, D. M.; CADE-MENUN, B. J.; HU, Y.; WIKLUND, J.; HALL, R. I.; CHESSELL, H.; BEHRENDTS, T.; VAN CAPPELLEN, P. Changes in Sedimentary Phosphorus Burial Following Artificial Eutrophication of Lake 227, Experimental Lakes Area, Ontario, Canada. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, [s. l.], v. 125, n. 8, 2020.

OSBURN, C. L.; HANDSEL, L. T.; MIKAN, M. P.; PAERL, H. W.; MONTGOMERY, M. T. Fluorescence Tracking of Dissolved and Particulate Organic Matter Quality in a River-Dominated Estuary. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 46, n. 16, p. 8628–8636, 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es3007723>>.

PAERL, H. W.; FULTON, R. S.; MOISANDER, P. H.; DYBLE, J. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 1, p. 76–113, 2001. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2001/139109/abs/>>.

PAERL, R. W.; CLAUDIO, I. M.; SHIELDS, M. R.; BIANCHI, T. S.; OSBURN, C. L. Dityrosine formation via reactive oxygen consumption yields increasingly recalcitrant humic-like fluorescent organic matter in the ocean. **Limnology and Oceanography Letters**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 337–345, 2020. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lol2.10154>>.

Parmesan, C., M.D. Morecroft, Y. Trisurat, R. Adrian, G.Z. Anshari, A. Arneith, Q. Gao, P. Gonzalez, R. Harris, J. Price, N. Stevens, and G.H. Talukdar, 2022: Terrestrial and Freshwater Ecosystems and their Services. In: Climate Change 2022: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, M. Tignor, E.S. Poloczanska, K. Mintenbeck, A. Alegría, M. Craig, S. Langsdorf, S. Löschke, V. Möller, A. Okem, B. Rama (eds.)]. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK and New York, NY, USA, pp. 197-377, doi:10.1017/9781009325844.004.

PERELOMOV, L. V.; SARKAR, B.; SIZOVA, O. I.; CHILACHAVA, K. B.; SHVIKIN, A. Y.; PERELOMOVA, I. V.; ATROSHCHENKO, Y. M. Zinc and lead detoxifying abilities of humic substances relevant to environmental bacterial species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 151, p. 178–183, 2018.

PERERA, I. A.; ABINANDAN, S.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Combined inorganic nitrogen sources influence the release of extracellular compounds that drive mutualistic interactions in microalgal–bacterial co-cultures. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 1311–1322, 2022.

PETER, K. H.; SOMMER, U. Phytoplankton Cell Size: Intra- and Interspecific Effects of Warming and Grazing. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. e49632, 2012.

POINTING, S. B.; BÜDEL, B.; CONVEY, P.; GILLMAN, L. N.; KÖRNER, C.; LEUZINGER, S.; VINCENT, W. F. Biogeography of photoautotrophs in the high polar biome. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00692>>.

CASTILLO, C. R.; SARMENTO, H.; ÁLVAREZ-SALGADO, X. A.; GASOL, J. M.; MARRASÉA, C. Production of chromophoric dissolved organic matter by marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 446–454, 2010. Disponível em: <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.4319/lo.2010.55.1.0446>>.

ROMERA-CASTILLO, C.; SARMENTO, H.; ÁLVAREZ-SALGADO, X. A.; GASOL, J. M.; MARRASÉ, C. Net Production and Consumption of Fluorescent Colored Dissolved Organic Matter by Natural Bacterial Assemblages Growing on Marine Phytoplankton Exudates. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 21, p. 7490–7498, 2011.

R CORE TEAM (2023). **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.<<https://www.R-project.org/>>

SARMENTO, H.; GASOL, J. M. Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton: Use of phytoplankton-derived DOC by bacterioplankton. **Environmental Microbiology**, [s. l.], 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**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 2582–2592, 2016.

SARMENTO, H.; UNREIN, F.; ISUMBISHO, M.; STENUITE, S.; GASOL, J. M.; DESCY, J.-P. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 756–771, 2008.

SCISCENKO, I.; ARQUES, A.; MICÓ, P.; MORA, M.; GARCÍA-BALLESTEROS, S. Emerging applications of EEM-PARAFAC for water treatment: a concise review. **Chemical Engineering Journal Advances**, [s. l.], v. 10, p. 100286, 2022.

SHERMAN, E.; MOORE, J. K.; PRIMEAU, F.; TANOUYE, D. Temperature influence on phytoplankton community growth rates. **Global Biogeochemical Cycles**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 550–559, 2016.

SHIBL, A. A.; ISAAC, A.; OCHSENKÜHN, M. A.; CÁRDENAS, A.; FEI, C.; BEHRINGER, G.; ARNOUX, M.; DROU, N.; SANTOS, M. P.; GUNSALUS, K. C.;

VOOLSTRA, C. R.; AMIN, S. A. Diatom modulation of select bacteria through use of two unique secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 44, p. 27445–27455, 2020.

SMUTNA, M.; VECERKOVA, J.; PRIEBOJOVA, J.; PIPAL, M.; KRAUSS, M.; HILSCHEROVA, K. Variability in retinoid-like activity of extracellular compound mixtures produced by wide spectra of phytoplankton species and contributing metabolites. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 414, p. 125412, 2021.

SRIBOONNAK, S.; INDUVESA, P.; WATTANACHIRA, S.; RAKRUAM, P.; SIYASUKH, A.; PUMAS, C.; WONGRUENG, A.; KHAN, E. Trihalomethanes in Water Supply System and Water Distribution Networks. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 17, p. 9066, 2021.

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

STAEHR, P. A.; BIRKELAND, M. J. Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. **Phycologia**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 648–656, 2006.

STAEHR, P. A.; SAND-JENSEN, K. Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 249–262, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2427.2005.01490.x>>.

STUBBINS, A.; LAPIERRE, J.-F.; BERGGREN, M.; PRAIRIE, Y. T.; DITTMAR, T.; DEL GIORGIO, P. A. What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 48, n. 18, p. 10598–10606, 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es502086e>>.

SUTTLE, C. A. Marine viruses — major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 801–812, 2007.

SØNDERGAARD, M.; STEDMON, C. A.; BORCH, N. H. Fate of terrigenous dissolved organic matter (DOM) in estuaries: Aggregation and bioavailability. **Ophelia**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 161–176, 2003. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00785236.2003.10409512>>.

TADA, Y.; NAKAYA, R.; GOTO, S.; YAMASHITA, Y.; SUZUKI, K. Distinct bacterial community and diversity shifts after phytoplankton-derived dissolved organic matter addition in a coastal environment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s. l.], v. 495, p. 119–128, 2017.

TAN. Effects of temperature on recruitment and phytoplankton community composition. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 5, n. 32, 2011.

THENG, B.K.G. Humic Substances. In: **Developments in Soil Science**. [s.l.] : Elsevier, 1979. v. 9p. 283–326. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70123-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70123-5)>

THORNTON, D. C. O. Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean. **European Journal of Phycology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 20–46, 2014.

TISSERAND, L.; DADAGLIO, L.; INTERTAGLIA, L.; CATALA, P.; PANAGIOTOPOULOS, C.; OBERNOSTERER, I.; JOUX, F. Use of organic exudates from two polar diatoms by bacterial isolates from the Arctic Ocean. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s. l.], v. 378, n. 2181, p. 20190356, 2020.

TOSELAND, A.; DAINES, S. J.; CLARK, J. R.; KIRKHAM, A.; STRAUSS, J.; UHLIG, C.; LENTON, T. M.; VALENTIN, K.; PEARSON, G. A.; MOULTON, V.; MOCK, T. The impact of temperature on marine phytoplankton resource allocation and metabolism. **Nature Climate Change**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 979–984, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nclimate1989>>.

TROMBETTA, T.; VIDUSSI, F.; MAS, S.; PARIN, D.; SIMIER, M.; MOSTAJIR, B. Water temperature drives phytoplankton blooms in coastal waters. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. e0214933, 2019. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0214933>>.

URRUTIA-CORDERO, P.; ZHANG, H.; CHAGUACEDA, F.; GENG, H.; HANSSON, L. Climate warming and heat waves alter harmful cyanobacterial blooms along the benthic–pelagic interface. **Ecology**, [s. l.], v. 101, n. 7, 2020.

VIJAYARAJ, V.; KIPFERLER, N.; STIBOR, H.; ALLEN, J.; HÖLKER, F.; LAVIALE, M.; LEFLAIVE, J.; LÓPEZ MOREIRA MAZACOTTE, G. A.; POLST, B. H.; SCHMITT-JANSEN, M.; HILT, S.; GROSS, E. M. Evaluating Multiple Stressor Effects on Benthic–Pelagic Freshwater Communities in Systems of Different Complexities: Challenges in Upscaling. **Water**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 581, 2022.

VILLACORTE, L. O.; EKOWATI, Y.; NEU, T. R.; KLEIJN, J. M.; WINTERS, H.; AMY, G.; SCHIPPERS, J. C.; KENNEDY, M. D. Characterisation of algal organic matter produced by bloom-forming marine and freshwater algae. **Water Research**, [s. l.], v. 73, p. 216–230, 2015.

VINES, M.; TERRY, L. G. Evaluation of the biodegradability of fluorescent dissolved organic matter via biological filtration. **AWWA Water Science**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. e1201, 2020. Disponível em: <<https://awwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aws2.1201>>.

WANG, L.; ZI, J.; XU, R.; HILT, S.; HOU, X.; CHANG, X. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: Evidence from exudates addition and co-culturing. **Harmful Algae**, [s. l.], v. 61, p. 56–62, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156898831630141X>>.

WANG, S.; WANG, W.; CHEN, J.; ZHANG, B.; ZHAO, L.; JIANG, X. Characteristics of Dissolved Organic Matter and Its Role in Lake Eutrophication at the Early Stage of Algal Blooms—A Case Study of Lake Taihu, China. **Water**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 2278, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/12/8/2278>>.

WILLIAMS, C. J.; FROST, P. C.; XENOPOULOS, M. A. Beyond best management practices: pelagic biogeochemical dynamics in urban stormwater ponds. **Ecological Applications**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1384–1395, 2013. Disponível em: <<https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1890/12-0825.1>>.

WONG, K.; MASON, E.; BRUNE, S.; EAST, M.; EDMONDS, M.; ZAHIROVIC, S. Deep Carbon Cycling Over the Past 200 Million Years: A Review of Fluxes in Different Tectonic Settings. **Frontiers in Earth Science**, [s. l.], v. 7, p. 263, 2019.

WÜNSCH, U. J.; MURPHY, K. R.; STEDMON, C. A. Fluorescence Quantum Yields of Natural Organic Matter and Organic Compounds: Implications for the Fluorescence-based Interpretation of Organic Matter Composition. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 2, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmars.2015.00098/abstract>>.

XIAO, X.; GUO, W.; LI, X.; WANG, C.; CHEN, X.; LIN, X.; WEINBAUER, M. G.; ZENG, Q.; JIAO, N.; ZHANG, R. Viral Lysis Alters the Optical Properties and Biological Availability of Dissolved Organic Matter Derived from *Prochlorococcus* Picocyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. e02271-20, 2021.

YAMASHITA, Youhei; JAFFÉ, Rudolf; MAIE, Nagamitsu; et al. Assessing the dynamics of dissolved organic matter (DOM) in coastal environments by excitation emission

matrix fluorescence and parallel factor analysis (EEM-PARAFAC). **Limnology and Oceanography**, v. 53, n. 5, p. 1900–1908, 2008.

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**, [s. l.], v. 66, p. 136–144, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278434313002112>>.

YANG, X.; YUAN, J.; YUE, F.-J.; LI, S.-L.; WANG, B.; MOHINUZZAMAN, M.; LIU, Y.; SENESI, N.; LAO, X.; LI, L.; LIU, C.-Q.; ELLAM, R. M.; VIONE, D.; MOSTOFA, K. M. G. New insights into mechanisms of sunlight- and dark-mediated high-temperature accelerated diurnal production-degradation of fluorescent DOM in lake waters. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 760, p. 143377, 2021.

YANG, X.; ZHENG, X.; WU, L.; CAO, X.; LI, Y.; NIU, J.; MENG, F. Interactions between algal (AOM) and natural organic matter (NOM): Impacts on their photodegradation in surface waters. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 242, p. 1185–1197, 2018.

YATES, C. A.; JOHNES, P. J.; OWEN, A. T.; BRAILSFORD, F. L.; GLANVILLE, H. C.; EVANS, C. D.; MARSHALL, M. R.; JONES, D. L.; LLOYD, C. E. M.; JICKELLS, T.; EVERSLED, R. P. Variation in dissolved organic matter (DOM) stoichiometry in U.K. freshwaters: Assessing the influence of land cover and soil C:N ratio on DOM composition. **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 2328–2340, 2019.

YOUSIF, H. A.; AL-MUSAWI, N. O. A. Impact of Ozone Used-Alone and Coagulation Aid Treatment on The Reduction of Trihalomethanes Components. **E3S Web of Conferences**, [s. l.], v. 318, p. 04008, 2021.

YVON-DUROCHER, G.; MONTOYA, J. M.; TRIMMER, M.; WOODWARD, G. Warming alters the size spectrum and shifts the distribution of biomass in freshwater ecosystems: WARMING ALTERS COMMUNITY SIZE STRUCTURE. **Global Change Biology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 1681–1694, 2011.

YVON-DUROCHER, G.; SCHAUM, C.-E.; TRIMMER, M. The Temperature Dependence of Phytoplankton Stoichiometry: Investigating the Roles of Species Sorting and Local Adaptation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 2003, 2017.

ZOHARY, T.; FLAIM, G.; SOMMER, U. Temperature and the size of freshwater phytoplankton. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 848, n. 1, p. 143–155, 2021.

APÊNDICE 1 – Série de 4 anos de dados de temperatura das águas superficiais do Reservatório do Lobo (Itirapina-SP)

Mês	Ano 1 (03/2018 a 02/2019)	Ano 2 (03/2019 a 02/2020)	Ano 3 (03/2020 a 02/2021)	Ano 4 (03/2021 a 02/2022)
Mar.	27,61	27,26	27,22	26,68
Abr.	23,69	24,95	24,63	23,33
Mai.	23,17	22,48	21,40	21,37
Jun.	20,56	20,32	21,53	20,43
Jul.	18,97	18,78	21,65	19,10
Ago.	20,00	21,28	21,33	20,36
Set.	22,37	22,68	22,51	24,01
Out.	25,60	26,50	25,27	23,74
Nov.	23,99	25,51	26,10	26,38
Dez.	26,37	27,70	28,80	26,38
Jan.	28,34	28,45	27,19	27,90
Fev.	25,38	28,92	28,20	28,64

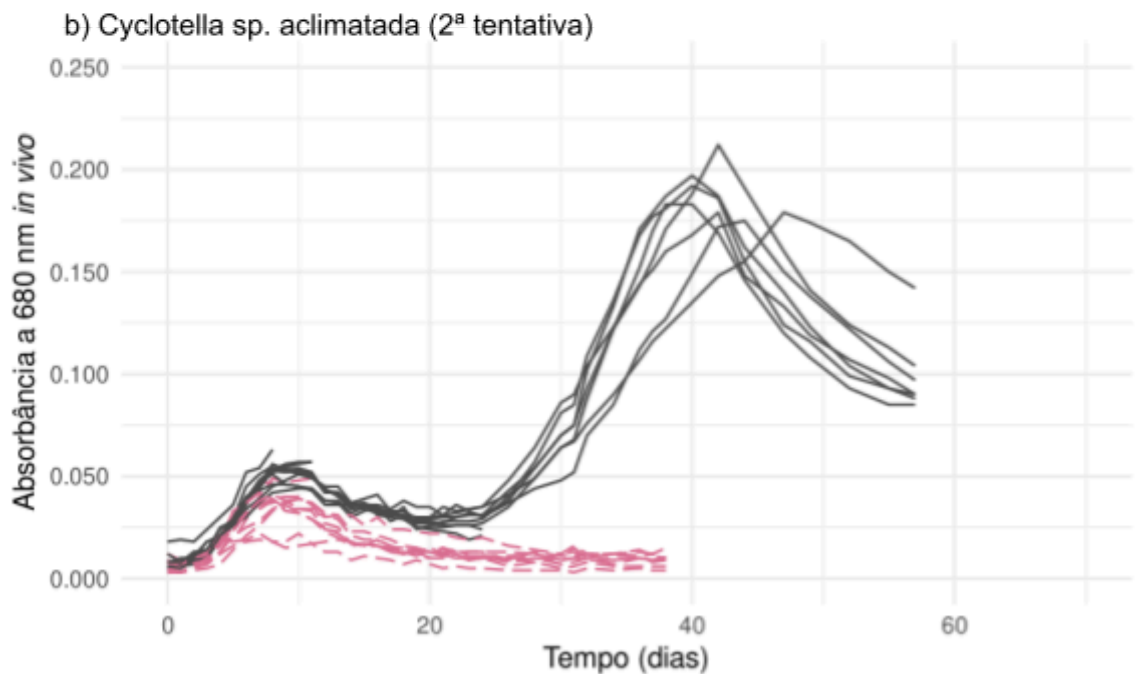
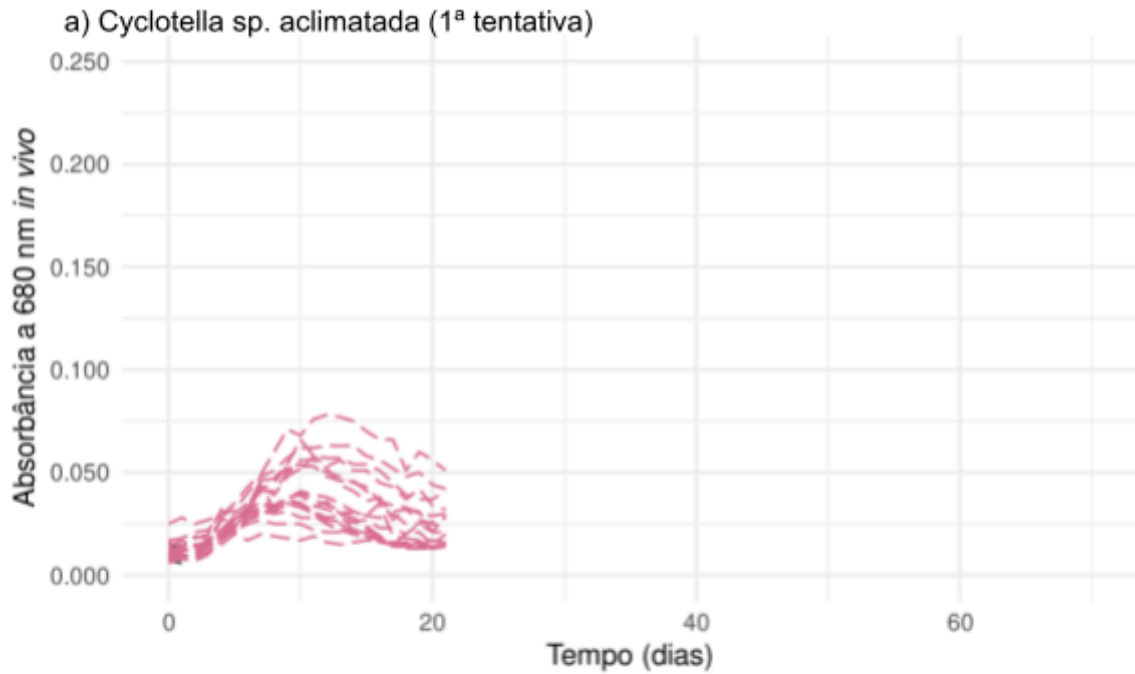
Média geral: 24,27; Desvio-padrão geral: 3,00

APÊNDICE 2 – Tempos de amostragem para cada estágio de crescimento e linhagem

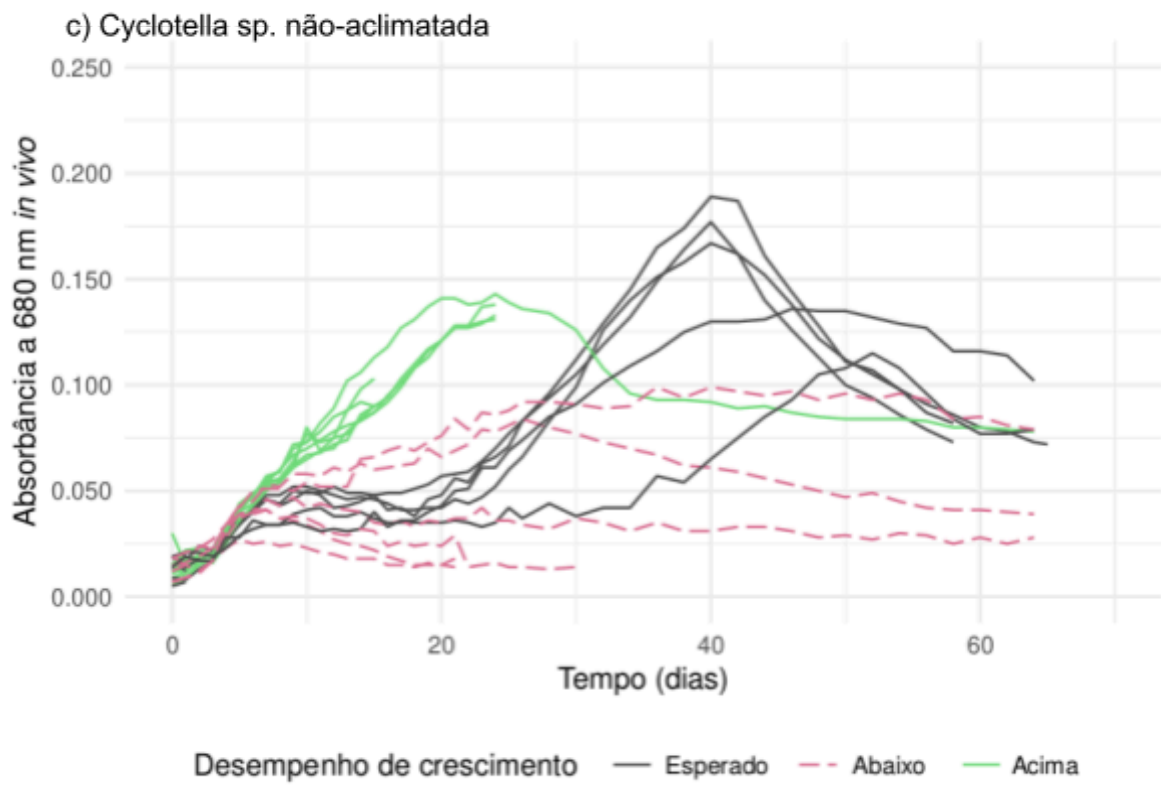
Espécie e linhagem	Inicial	Exponencial	Estacionário	Senescente
<i>M. aeruginosa</i> aclimatada	24h	10	22	61 e 78
<i>M. aeruginosa</i> controle	24h	14	28	126 e 159
<i>M. aeruginosa</i> não-aclimatada	24h	10	19	102 e 113
<i>Cyclotella</i> sp. aclimatada	24-38h	8	11	57
<i>Cyclotella</i> sp. controle	24-38h	20	24	72
<i>Cyclotella</i> sp. não-aclimatada	24-38h	15	24	58 e 65

Todos os valores estão expressos em dias, exceto para as amostras do estágio inicial.

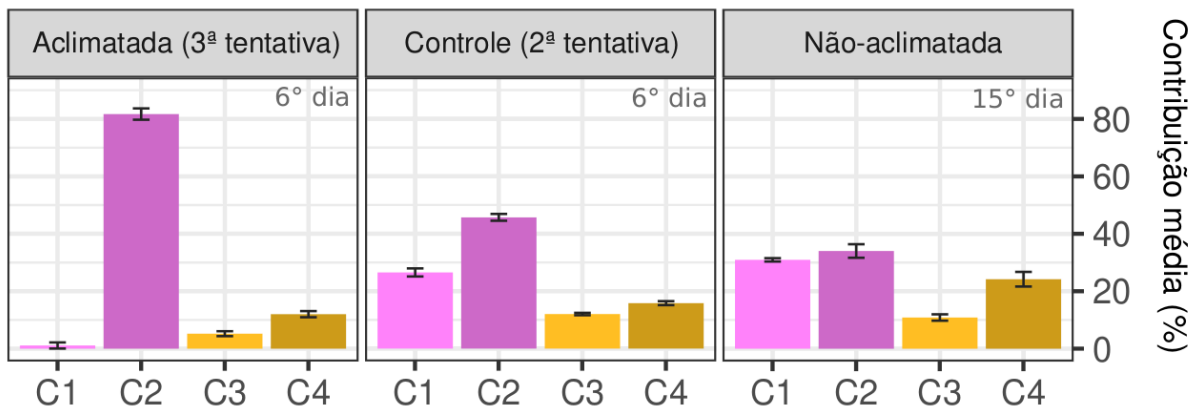
APÊNDICE 3 – Curvas de crescimento de *Cyclotella* sp. aclimatada e não-aclimatada, classificadas de acordo com o desempenho de crescimento.



Desempenho de crescimento — Esperado - - - Abaixo — Acima



APÊNDICE 4 – Comparação entre o perfil de fluorescência relativa das amostras de *Cyclotella* sp. exponencial de diferentes linhagens.



Há um aumento evidente da %C2, especialmente na linhagem aclimatada, provavelmente porque os cultivos-estoque utilizados para diluição e preparação dos experimentos já estavam em senescência há algum tempo, liberando grande quantidade de materiais proteínáceos degradados.

APÊNDICE 5 – Coeficientes de variação na composição e concentração da FDOMp de *M. aeruginosa* e *Cyclotella* sp.

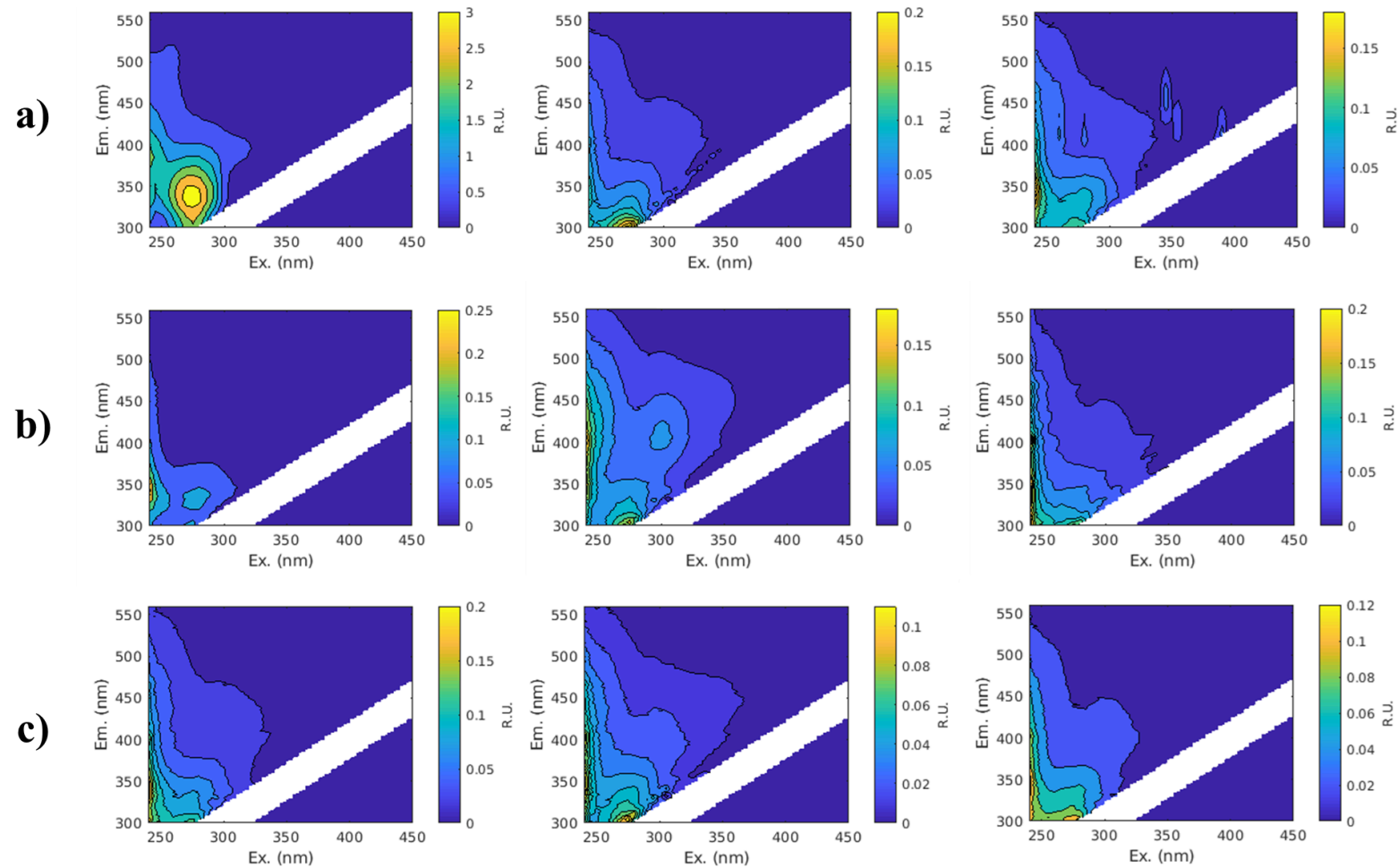
Tabela 1 – coeficientes de variação para cada componente, calculados em função das diferentes linhagens e dos diferentes estágios de crescimento de *Microcystis aeruginosa*.

	Concentração de FDOMp				Composição da FDOMp			
	C1	C2	C3	C4	%C1	%C2	%C3	%C4
Varição entre linhagens (temperatura) em cada estágio de crescimento								
24h	56,39%	15,98%	34,07%	34,67%	33,00%	19,57%	23,44%	9,62%
Exponencial	33,82%	67,90%	20,90%	11,22%	32,99%	44,11%	12,26%	17,82%
Estacionário	38,99%	45,44%	25,15%	30,70%	8,59%	15,07%	10,48%	9,26%
Varição através dos estágios de crescimento para cada linhagem								
Aclimatada	126,53%	120,29%	111,99%	89,64%	30,28%	28,72%	22,14%	30,89%
Controle	100,73%	89,55%	108,12%	74,05%	31,82%	26,58%	31,13%	22,39%
Não-aclimatada	94,92%	108,99%	103,07%	70,34%	22,16%	34,63%	25,56%	33,25%

Tabela 2 – coeficientes de variação para cada componente, calculados em função das diferentes linhagens e dos diferentes estágios de crescimento de *Cyclotella* sp.

	Concentração de FDOMp				Composição da FDOMp			
	C1	C2	C3	C4	%C1	%C2	%C3	%C4
Varição entre linhagens (temperatura) em cada estágio de crescimento								
24h	33,84%	18,57%	28,67%	21,00%	28,03%	14,49%	19,65%	10,72%
Exponencial	81,88%	56,34%	32,76%	46,63%	71,64%	40,13%	34,55%	32,23%
Estacionário	68,29%	63,11%	61,93%	75,74%	9,63%	8,69%	17,26%	22,70%
Senescente	10,64%	16,06%	14,65%	14,08%	5,19%	4,49%	10,66%	8,73%
Varição através dos estágios de crescimento para cada linhagem								
Aclimatada	168,43%	140,92%	162,74%	109,19%	65,22%	35,83%	35,33%	58,12%
Controle	127,69%	133,78%	130,19%	101,44%	34,55%	15,27%	18,30%	73,84%
Não-aclimatada	121,44%	136,80%	129,15%	70,42%	32,92%	16,08%	12,28%	50,98%

APÊNDICE 6 – EEMs das amostras do estágio “inicial” (24-38h) de *Cyclotella* sp.



EEMs da FDOMp de *Cyclotella* sp. aclimatada (a), controle (b) e não-aclimatada (c). Os dados representados foram submetidos às correções devidas, à subtração da fluorescência da água ultrapura e a região da dispersão de Raman foi cortada.