

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

Degradação bacteriana da MOD excretada por Microcystis aeruginosa (Cyanobacteria) em culturas, fracionada e submetida à radiação UV

INGRITT CAROLINE MOREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS

2009

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

M838db

Moreira, Ingritt Caroline.

Degradação bacteriana da MOD excretada por *Microcystis aeruginosa* (Cyanobacteria) em culturas, fracionada e submetida à radiação UV / Ingritt Caroline Moreira. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
59 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Ecologia aquática. 2. Matéria orgânica dissolvida. 3. Radiação ultravioleta. 4. *Microcystis aeruginosa*. 5. Bactérias. 6. Degradação. I. Título.

CDD: 574.5263 (20^a)

Ingritt Caroline Moreira

**Degradação bacteriana da MOD excretada por *Microcystis aeruginosa*
(Cyanobactéria) em culturas, fracionada e submetida à radiação UV**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 31 de julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

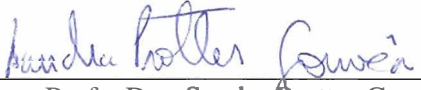
Presidente


Prof. Dr. Armando Augusto Henriques **Vieira**
(Orientador)

1º Examinador


Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
PPGERN/UFSCar

2º Examinador


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

ORIENTADOR

ARMANDO AUGUSTO HENRIQUES VIEIRA

“Um homem de gênio é produzido por um conjunto complexo de circunstâncias, começando pelas hereditárias, passando pelas do ambiente e acabando em episódios mínimos de sorte.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Soneto do amigo

*Enfim, depois de tanto erro passado
Tantas retaliações, tanto perigo
Eis que ressurge noutra o velho amigo
Nunca perdido, sempre reencontrado.*

*É bom sentá-lo novamente ao lado
Com olhos que contêm o olhar antigo
Sempre comigo um pouco atribulado
E como sempre singular comigo.*

*Um bicho igual a mim, simples e humano
Sabendo se mover e comover
E a disfarçar com o meu próprio engano.*

*O amigo: um ser que a vida não explica
Que só se vai ao ver outro nascer
E o espelho de minha alma multiplica...*

Vinicius de Moraes

*Agradeço a Deus pela vida de oportunidades, pela sólida família que tenho (apoio certo e verdadeiro) e pela saúde de que gozo, imprescindível na busca de meus ideais e sonhos.

- * Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira pela oportunidade, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo e paciência que fizeram desses anos do Mestrado os mais enriquecedores de minha vida acadêmica.
- * Ao PPGERN e UFSCar pela infra-estrutura oferecida.
- * À Profa.Dra. Mirna Helena Regali Seleglim por ter me auxiliado solucionando dúvidas em diversos momentos de minha pesquisa, pelas preciosas correções do artigo submetido à qualificação e, especialmente, pelos momentos tão agradáveis de conversa amiga e sincera!...
- * Ao Prof. Irineu Bianchini Jr. pelo auxílio com as análises de modelagem matemática dos dados de COD e também pelas correções do artigo submetido para o exame de qualificação.
- * À banca examinadora da defesa de mestrado, Profa. Dra. Sandra Protter Gouvêa, Profa. Dra Mirna Helena Regali Seleglim (mais uma vez!!) Prof. Dr. Armando A.H. Vieira pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho.
- * À amiga Carolina Andrade pela verdadeira amizade e cumplicidade em todos os momentos de sucesso e dificuldades nos últimos anos!! E pela ajuda na tradução do artigo!!!
- * Ao colega e companheiro de laboratório Antônio Luiz Sartori pela ajuda tão necessária em sanar as mais diversas dúvidas.
- * Ao Luizinho, técnico de campo, companheiro nas coletas, dono de uma disposição contagiante e que se revelou um amigo de boas conversas.
- * À amiga e colega Inessa, por ter me ensinado várias etapas da análise de bactérias e muitas outras dicas e comentários tão valiosos que me ajudaram a pensar melhor!!
- * Aos amigos e colegas do Laboratório de Ficologia Alessandra, Inessa, Letícia, Fabrício, Vanessa, Zezé, Patrícia, Helena, Guilherme, Rodrigo e Thais, pelas conversas enriquecedoras e muita troca de experiências, momentos de descontração, boas risadas, cafezinhos e desabafos...
- * Às amigas Cristina, Inês e Bernadete pelas boas conversas muito descontraídas!
- * Aos meus pais queridos, pela confiança, dedicação e amor incondicional. Mas principalmente por nunca me deixarem desistir, sequer desanimar. Amo vocês!!
- * Aos meus irmãos Hiltton e Yeda, amigos sinceros e verdadeiros que, apesar da distância, sempre estiveram presentes nos momentos mais delicados que passei. Amo vocês também!!!
- * Ao meu querido namorado e companheiro Fabrizio, por ser meu confessor, pelo seu abraço amigo e acolhedor e pelas palavras de estímulo que sempre levantavam meu ânimo. Te amo!

* Aos amigos amados Luciana, André, Érika, Ciça e Giordano, pelas conversas descontraídas e animadoras, churrasquinhos de fim de semana, passeios bucólicos ou simplesmente por um abraço acolhedor!...

* A toda minha família e amigos que contribuíram de alguma forma para que esta fase de minha vida tomasse forma e, enfim, se concretizasse!!!

LISTA DE ABREVIATURAS

MOD – Matéria orgânica dissolvida

COD – Carbono orgânico dissolvido

PP – Produção primária

CFC – Clorofluorcarbonos

UV – Radiação ultravioleta

UV-A – Radiação ultravioleta A

UV-B – Radiação ultravioleta B

CO – Monóxido de carbono

CO₂ – Dióxido de carbono

CID – Carbono inorgânico dissolvido

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio (água)

WDCM – World Data Centre of Microorganisms

HCl – Ácido Clorídrico

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindol

R – Fator de forma

P – Nível de significância

n – Número de réplicas

DP – Desvio-padrão

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reservatório de Barra Bonita; o símbolo ★ representa o ponto de coleta de coordenadas 22° 32' 34,5" S, 48° 29' 26,4" O, situado a cerca de 3 km a montante da barragem, (Embrapa, 2002). **10**
- Figura 2.** Sistema utilizado para coleta integrada do inóculo bacteriano (previamente autoclavado). A entrada de água **C** (com um peso em sua ponta) é posicionada na profundidade desejada, permaneceu fechada com papel alumínio e apenas foi aberta depois de submersa no reservatório. O tubo de vidro com algodão **A**, autoclavado juntamente com o sistema, é conectado à mangueira ligada à bomba de vácuo **D** a fim de evitar contaminação por bactérias aéreas. Um respirador **B** foi adicionado para controle do vácuo e manter as trocas gasosas após a coleta. **15**
- Figura 3.** Diagrama que relata o destino da MOD produzida por *M. aeruginosa*, desde a cultura algal produtora da MOD à composição das culturas bacterianas. **16**
- Figura 4.** Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo (dias) da cultura de *Microcystis aeruginosa*. **20**
- Figura 5.** Densidade de células de *Microcystis aeruginosa* (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) da cultura. **21**
- Figura 6.** Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) nos controles. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha. **22**
- Figura 7.** Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas controle. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$. **23**
- Figura 8.** Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas controles. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$. **24**

Figura 9. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração de MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

25

Figura 10. Densidade celular (10^6 céls. mL^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

26

Figura 11. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

29

Figura 12. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

30

Figura 13. Densidade celular (10^6 céls. mL^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

31

Figura 14. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

33

Figura 15. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

34

Figura 16. Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com n = 2. **35**

Figura 17. Fotomicrografias da comunidade bacteriana nos momentos de maiores valores de densidade e biomassa bacterianas nas culturas com MOD>30 kDa irradiada. **A** corresponde a 48 horas e **B** corresponde a 15 dias de incubação. **36**

Figura 18. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com n = 2. **38**

Figura 19. Fotomicrografias da comunidade bacteriana nos momentos de máxima densidade celular. **A** representa o controle, **B** e **C** representam as culturas com MOD<3 kDa, **D** e **E** correspondem à 30>MOD>3 kDa, **F** e **G** representam as culturas com MOD>30 kDa, irradiadas e não irradiadas, respectivamente, para todas as frações. **39**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Medidas das variáveis físico-químicas verificadas para a água do reservatório de Barra Bonita no ponto de coleta (junho/2008). 14
- Tabela 2.** Concentração média de COD inicial (mg C.L^{-1}) nos cultivos enriquecidos com as diferentes frações de MOD, irradiadas e não irradiadas, bem como o controle. O desvio padrão é indicado entre parênteses, com $n = 2$. Valores de P comparam as culturas com mesmas frações de MOD, irradiada e não irradiada. 21
- Tabela 3.** Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas controle ao longo dos 27 dias de cultivo. 23
- Tabela 4.** Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana ($10^6 \text{ céls.mL}^{-1}$) nas culturas enriquecidas com a fração de MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com $n = 2$. 27
- Tabela 5.** Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de MOD<3 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo. 28
- Tabela 6.** Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana ($10^6 \text{ céls.mL}^{-1}$) nas culturas enriquecidas com a fração de 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com $n = 2$. 31
- Tabela 7.** Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de 30>MOD>3 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo. 32
- Tabela 8.** Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana ($10^6 \text{ céls.mL}^{-1}$) nas culturas enriquecidas com a fração de MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com $n = 2$. 35

Tabela 9. Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de MOD>30 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo. **37**

Tabela 10. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com as frações irradiadas de MOD, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2. **40**

Tabela 11. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com as frações não irradiadas de MOD, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2. **41**

RESUMO

A radiação solar pode alterar a MOD em um ambiente aquático tornando os compostos mais lábeis ou recalcitrantes à biodegradação. Desta forma, a radiação solar, principalmente a radiação UV, interfere indiretamente na comunidade microbiana de forma a incrementar ou diminuir seu crescimento. O objetivo deste trabalho foi verificar a interferência da radiação UV-A+B na biodisponibilidade da MOD separada em diferentes frações (massa molecular), oriundas da liberação de células na fase estacionária de *Microcystis aeruginosa*. A MOD liberada pela cianobactéria foi separada por ultra-filtração tangencial e a estas foram inoculadas a comunidade bacteriana do reservatório de Barra Bonita. A dinâmica da comunidade bacteriana foi acompanhada por medidas de densidade e biomassa bacteriana e o consumo de carbono das frações de MOD por medidas de COD. Também foram calculadas as frequências dos morfotipos bacterianos. Todas as três frações de MOD investigadas apresentaram-se altamente disponíveis à comunidade bacteriana. As culturas com fração de MOD < 3 kDa e MOD > 30 kDa revelaram-se mais vulneráveis à radiação UV, fato corroborado pelas numerosas diferenças estatísticas encontradas para as densidades bacterianas durante os 27 dias de incubação. Aos 15 dias de incubação, as culturas com fração de MOD > 30 kDa irradiada apresentaram um segundo pico na densidade e biomassa bacteriana que pode ser interpretado como um evento de sucessão na comunidade bacteriana. As mudanças na frequência relativa dos morfotipos bacterianos ao longo do período de incubação sugerem um episódio de sucessão durante as distintas fases de degradação da MOD. Sugeriu-se que a maior parte do COD liberado por um *bloom* desta cianobactéria é mineralizado rapidamente. Além disso, com os constantes *blooms*, ou a sempre alta biomassa de *M. aeruginosa* ao longo do ano, inferem que tais consórcios bacterianos estejam sempre disponíveis.

ABSTRACT

Solar radiation can change DOM in aquatic environments making compounds more labile or recalcitrant to biodegradation. Thus, solar radiation, especially UV, indirectly interfere in the microbial community in order to increase or decrease their growth. The objective was to verify the interference of UV-A + B on the bioavailability of DOM separated into different fractions (molecular weight), from release of cells in stationary phase of *M. aeruginosa*. DOM released from cyanobacteria was separated by tangential ultra-filtration and these were inoculated bacterial community of Barra Bonita reservoir. Bacterial community dynamic was monitored by measures of density and biomass and bacterial consumption of carbon from DOM by measures of DOC. Frequency of bacterial morphotypes were also calculated. All three fractions of DOM investigated were highly available to the bacterial community. The fraction of cultures with DOM<3 kDa and DOM>30 kDa demonstrated to be more vulnerable to UV radiation, corroborated by many statistical differences found for bacterial density during 27 days of incubation. At 15 days of incubation, the cultures with irradiated DOM>30 kDa showed a second peak in bacterial density and biomass that can be understood as an event of succession in bacterial community. Changes in relative frequency of bacterial morphotypes over incubation period suggest an episode of succession during the different stages of degradation of DOM. It was suggested that the majority of DOC released from a bloom of cyanobacteria is rapidly mineralized. Furthermore, the constant blooms, or ever high biomass of *M. aeruginosa* during the year, mean that such bacterial consortia are always available.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	I
Lista de Figuras.....	II
Lista de Tabelas.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
1. Introdução.....	1
1.1 Matéria Orgânica Dissolvida e sua biodisponibilidade à comunidade bacteriana..	1
1.2 A radiação UV e a MOD em ambientes aquáticos.....	3
1.3 Caracterização da MOD liberada por <i>Microcystis aeruginosa</i> e disponibilidade às bactérias livres associadas.....	5
2. Objetivos.....	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3. Materiais e Métodos.....	9
3.1 Local de Estudo.....	9
3.2 Cultura da cianobactéria.....	11
3.3 Experimentação.....	12
3.3.1 Obtenção da MOD excretada e/ou liberada passivamente.....	12
3.3.2 Fracionamento da MOD.....	13
3.3.3 Irradiação das frações de MOD.....	13
3.3.4 Biodisponibilidade da MOD.....	14
3.3.4.1 Obtenção do inóculo bacteriano.....	14
3.3.4.2 Consumo da MOD pelo bacterioplâncton.....	15
3.3.4.3 Caracterização da comunidade bacteriana: morfologia, biovolume e biomassa bacteriana.....	17
3.5 Análises estatísticas.....	19
4. Resultados.....	20
4.1 Crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i>	20
4.2. Experimento da biodisponibilidade de MOD à comunidade bacteriana.....	21
4.2.1 Consumo do COD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas controle.....	22
4.2.2 Consumo do COD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e	

biomassa bacteriana nas culturas com MOD<3 kDa irradiada e não irradiada.....	24
4.2.3 Consumo da MOD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas com 30>MOD>3 kDa irradiada e não irradiada....	29
4.2.4 Consumo da MOD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas com MOD>30 kDa irradiada e não irradiada.....	33
4.2.5 Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey-Kramer – Comparação entre culturas com diferentes frações de MOD.....	40
5. Discussão.....	43
5.1. Obtenção da MOD da fase estacionária.....	43
5.2 Biodisponibilidade da MOD à comunidade bacteriana.....	43
5.3 Frequência relativa dos morfotipos celulares bacterianos e sucessão bacteriana.	48
5.4 Diferenças entre as frações de MOD.....	50
6. Conclusão.....	51
7. Referências Bibliográficas.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Matéria Orgânica Dissolvida e sua biodisponibilidade à comunidade bacteriana

Há tempos, acreditava-se que a matéria orgânica dissolvida (MOD) liberada pelo fitoplâncton era simplesmente perdida no meio aquático ou decomposta por microrganismos especializados. Excretada ativamente ou liberada passivamente, a MOD só poderia retornar às cadeias tróficas após ser mineralizada por bactérias heterotróficas e assim, disponibilizada para o consumo dos produtores primários na forma de carbono inorgânico (Wetzel, 2001; Tortora *et al.*, 2003).

Porém, nos últimos 30 anos, estudos revelaram que esta MOD constitui uma das principais fontes de carbono para bactérias heterotróficas em ambientes aquáticos tanto marinhos (Amon & Benner, 1994) quanto de água doce (Wetzel, 1972; Carlson *et al.*, 1994; Lampert & Sommer, 1997; Wetzel, 2001; Tortora *et al.*, 2003). Esta capacidade das bactérias heterotróficas da coluna d'água em utilizarem a MOD de origem fitoplanctônica como fonte de energia foi descrita por Azam e colaboradores (1983) sob o modelo do “elo microbiano” - *microbial loop* - que seria a via paralela de reintrodução de carbono orgânico dissolvido (COD) na cadeia trófica, passando pelas bactérias, protozoários e zooplâncton até chegar aos peixes.

Assim, como principais responsáveis pela degradação da produção primária (PP) fitoplanctônica, a comunidade bacteriana desempenha um importante papel na ciclagem de carbono orgânico e de nutrientes nos ambientes aquáticos (Azam *et al.*, 1983; Azam & Cho, 1987; Ducklow & Carlson, 1992), principalmente em ambientes eutrofizados nos quais é comum a descarga de grande quantidade de MOD em decorrência de florações algais (*blooms*). Sabe-se que cerca de 30 a 40% de toda a PP do fitoplâncton é liberada como MOD (Baines & Pace, 1991). Contudo, o carbono desta fração da MOD

da PP aproveitada pelas bactérias é assimilado com uma baixa eficiência: apenas 50% de todo carbono assimilado é incorporado como biomassa bacteriana (Furham & Azam, 1982).

A MOD liberada pelo fitoplâncton é constituída por diversos tipos de substâncias as quais se apresentam sob diferentes tamanhos e massas moleculares (Ogawa & Ogura, 1992). A maior parte desta MOD, 65 a 80% (Ogawa & Ogura, 1992), é composta por moléculas de baixa massa (Kaplan & Bott, 1983; Lancelot, 1984), enquanto cerca de 20 a 30% desta MOD configura-se na forma de moléculas de alta massa (Meyer *et al.*, 1987; Benner *et al.*, 1992). O tamanho das moléculas comumente mensurado pela sua massa molecular constitui um fator que influencia diretamente a utilização microbiana desta MOD. Para Saunders (1976), a MOD com baixa massa molecular, constituída por moléculas mais simples e menores, é prontamente consumida (em horas) ao contrário da MOD com alta massa molecular, cuja degradação bacteriana demoraria dias ou semanas. Este modelo conceitual também foi apresentado por Münster & Chróst (1990), relatando que as moléculas da MOD menores que 1 kDa são prontamente degradadas pelo bacterioplâncton e que a biodisponibilidade apresenta uma relação inversamente proporcional com o aumento da massa molecular.

Embora esta idéia da pronta degradação da MOD de baixa massa molecular seja aceita por muitos pesquisadores, alguns estudos evidenciam que muitos compostos de alta massa molecular são consumidos tão logo sejam disponibilizados (Arnosti *et al.*, 1994). Esta constatação pode ser fundamentada no conceito do *modelo do contínuo tamanho-reatividade*, descrito por Amon & Benner (1996), o qual sugere que as moléculas de alta massa molecular (>1kDa) são mais bioreativas que as moléculas de baixa massa molecular (<1kDa). O modelo do contínuo tamanho-reatividade postula que as moléculas de alta massa são diageneticamente mais jovens ou recém produzidas

pelo fitoplâncton e estas são mais facilmente degradadas originando moléculas menores e biologicamente menos reativas (recalcitrantes).

1.2 A radiação UV e a MOD em ambientes aquáticos

A questão da destruição da camada de ozônio, principalmente em decorrência de ações antrópicas, já não constitui novidade nas discussões acadêmicas. Este fenômeno é conferido principalmente pela atuação dos clorofluorcarbonos (CFCs) e, com as moléculas de ozônio aniquiladas, há um aumento do buraco desta camada protetora e mantenedora da vida na superfície da Terra (WMO, 1995). Como uma consequência deste evento, houve um acréscimo nos níveis de radiação solar, em especial da radiação UV, incidentes na superfície terrestre (Madronich, 1992). Este excesso de radiação UV proporciona alterações diretas tanto sobre as comunidades biológicas (Wetzel *et al.*, 1995; Tranvik & Bertilsson, 2001), quanto sobre as características geoquímicas (Suhett *et al.*, 2006) dos ecossistemas aquáticos continentais.

Recentemente, os efeitos diretos e indiretos da radiação solar sobre o *pool* de MOD têm recebido uma atenção considerável. É sabido que a MOD apresenta propriedades fotorreativas e é especialmente sensível à radiação UV-A, que corresponde aos comprimentos de onda que variam entre 320 a 400 nm e à radiação UV-B, com comprimentos de onda entre 280 e 320 nm. Tais alterações fotoquímicas podem significar a produção de substratos tanto lábeis quanto recalcitrantes à biodegradação (Harvey *et al.*, 1983; Naganuma *et al.*, 1996; Gobler *et al.*, 1997).

Alguns estudos indicam que a exposição da MOD à radiação solar (UV) resulta no aumento da biodisponibilidade de seus compostos (Lindell *et al.*, 1995; Tranvik, 1998). Neste caso, a menor disponibilidade inicial da MOD devido à presença de macromoléculas pouco disponíveis à comunidade bacteriana (Azam & Cho, 1987; Søndergaard & Middelboe, 1995) é compensada por reações fotoquímicas de clivagem

das moléculas diminuindo a massa molecular média da MOD (Strome & Miller, 1978; Zepp *et al.*, 1995; Moran & Zepp, 1997; Bertilsson & Tranvik, 2000).

No entanto, outros produtos formados via fotodegradação da MOD (ação da radiação solar) podem comprometer e até inibir a atividade e o crescimento do bacterioplâncton. Neste caso pode configura-se a mineralização completa de compostos orgânicos pela fotooxidação. Variando conforme a fonte de MOD, alguns destes produtos formados são compostos inorgânicos como o monóxido de carbono (CO) (Mopper *et al.*, 1991; Valentine & Zepp, 1993), o dióxido de carbono (CO₂) (Granéli *et al.*, 1996) e outras formas de carbono inorgânico dissolvido (DIC), bem como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Cooper *et al.*, 1994; Scully *et al.*, 1996), que representam a mineralização fotoquímica direta da MOD. Além desta via de inibição da atividade bacteriana, outras pesquisas revelam que a menor biodisponibilidade da MOD após sua irradiação pode ser dada pela produção de substratos mais resistentes à biodegradação (Naganuma *et al.*, 1996; Benner & Biddanda, 1998; Tranvik & Kokalj, 1998; Tranvik & Bertilsson, 2001; Choi *et al.*, 2004), e isso faz com que haja uma inibição de 15 a 20 % da atividade microbiana (Tranvik & Kokalj, 1998; Pausz & Herndl, 1999). Estas reações químicas iniciadas pela radiação UV que levam à produção de moléculas mais recalcitrantes à biodegradação são conhecidas como reações de condensação e *cross link*, em que radicais livres autooxidativos de moléculas insaturadas da MOD reagem produzindo moléculas maiores e mais complexas como os ácidos húmicos (Kieber *et al.*, 1997). Tais reações desencadeadas pela radiação UV causam o aumento da massa molecular média da MOD (Vähätalo *et al.*, 1999; Opsahl & Zepp, 2001).

Sendo assim, Tranvik & Bertilsson (2001) demonstraram que o efeito líquido da radiação UV sobre a biodisponibilidade da MOD pode ser prevista conforme as

características da fonte. Estes autores propõem que, enquanto a MOD de origem algal é predominantemente convertida em compostos refratários e de menor qualidade para o uso microbiano após exposições à radiação UV, e substâncias mais antigas como é o caso da matéria húmica tendem a se tornar lábeis, demonstrando que o papel da radiação solar, em especial da radiação UV, em controlar a interação entre a MOD e a comunidade bacteriana em ambientes aquáticos poderia ser mais complexo do que se concebia.

1.3 Caracterização da MOD liberada por Microcystis aeruginosa e disponibilidade às bactérias livres associadas

Sabe-se que grande parte da MOD presente em ambientes aquáticos é proveniente da excreção ativa ou liberação passiva do fitoplâncton (Mykkestad, 1995; Biddanda & Benner, 1997). Sendo assim, é essencial uma avaliação dos resultados da radiação UV sobre a biodisponibilidade MOD produzida por espécies fitoplantônicas.

No reservatório de Barra Bonita (rios Tietê e Piracicaba – SP), área de estudo do presente trabalho, a espécie *Microcystis aeruginosa* Kützing (Cyanobacteria) representa uma considerável quantidade de biomassa e freqüentemente forma enormes *blooms* ao longo do ano (Matsumura-Tundisi & Tundisi, 2005; Calijuri & Dos Santos, 2001; Dellamano-Oliveira *et al.*, 2007). Assim, é possível prever que a radiação UV incidente na superfície do reservatório influencia a MOD disponibilizada às bactérias, como também influi profundamente a dinâmica da comunidade aquática local, em especial as bactérias heterotróficas (Choi *et al.*, 2004). Obviamente, a radiação UV não interfere somente na qualidade da MOD liberada por *M. aeruginosa*, mas também nas taxas de liberação dessa MOD por processos de excreção ou por morte celular quando suas células, geralmente em colônias, que tendo aerótopos, flutuam na superfície e ficam expostas à irradiação UV, tema que está sendo abordado em trabalho de doutoramento

(Bittar, em preparação).

Levando em conta a baixa quantidade de estudos acerca dos efeitos da radiação solar sobre a biodisponibilidade de MOD no Brasil (Amado *et al.*, 2006), o estudo deste tema realizado com culturas axênicas de espécies abundantes nos corpos d'água brasileiros é extremamente importante para uma maior compreensão do processo de decomposição e do fluxo de carbono em ambientes aquáticos.

Na maioria dos gêneros de cianobactérias, entre eles *Microcystis*, são encontradas eubactérias associadas às células e à MOD liberada por esses organismos (Worm *et al.*, 2001; Eiler & Bertilsson, 2004; Kapustina, 2006; Bagatini, 2008). Estudos revelam que, em ambientes eutróficos, 7 a 55% de todo carbono orgânico utilizado pelas bactérias livres associadas à *M. aeruginosa* é oriundo da MOD excretada pela cianobactéria (Worm & Sondergaard, 1998). Nesta MOD são encontradas moléculas de alta massa molecular, como polissacarídeos maiores do que 30 kDa até moléculas menores do que 3 kDa (Bittar, 2005; Huang *et al.*, 2007). Devido a essa heterogeneidade da composição da MOD, sua degradação envolve combinadas ações de diversos grupos de bactérias o que deve determinar diferentes linhagens de bactérias com grande variedade metabólica. Além disso, a heterogeneidade da MOD leva a que as condições de crescimento não sejam uniformes para os diferentes grupos de bactérias e fatores bióticos e abióticos podem promover sucessões de comunidades (Pernthaler *et al.*, 1998). A ocorrência de *blooms*, portanto, faz com que novos nichos sejam criados levando à seleção de especialistas que poderão atuar em consórcio (Worm *et al.*, 2001). No entanto, devido a estes freqüentes *blooms* de *M. aeruginosa* ao longo do ano no reservatório de Barra Bonita o que hipoteticamente mantém um contínuo suprimento do mesmo substrato, tal diversidade nas comunidades bacterianas associadas à MOD de *M.*

aeruginosa poderá ser possivelmente considerada como uma característica permanente ao longo de quase todo o ano.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito da radiação UV-A+B sobre a biodisponibilidade dos compostos de alta, média e baixa massa molecular presentes na MOD excretada por células na fase estacionária do crescimento de *Microcystis aeruginosa*, em culturas axênicas.

Tese: A constante permanência de grande biomassa de *Microcystis aeruginosa* no reservatório de Barra Bonita permitiria a ocorrência de constantes e especializados consórcios bacterianos capazes de mineralizar a MOD liberada pela cianobactéria em tempos inferiores ao menor tempo de residência das águas. A ação desses consórcios pode ser incrementada pela radiação UV.

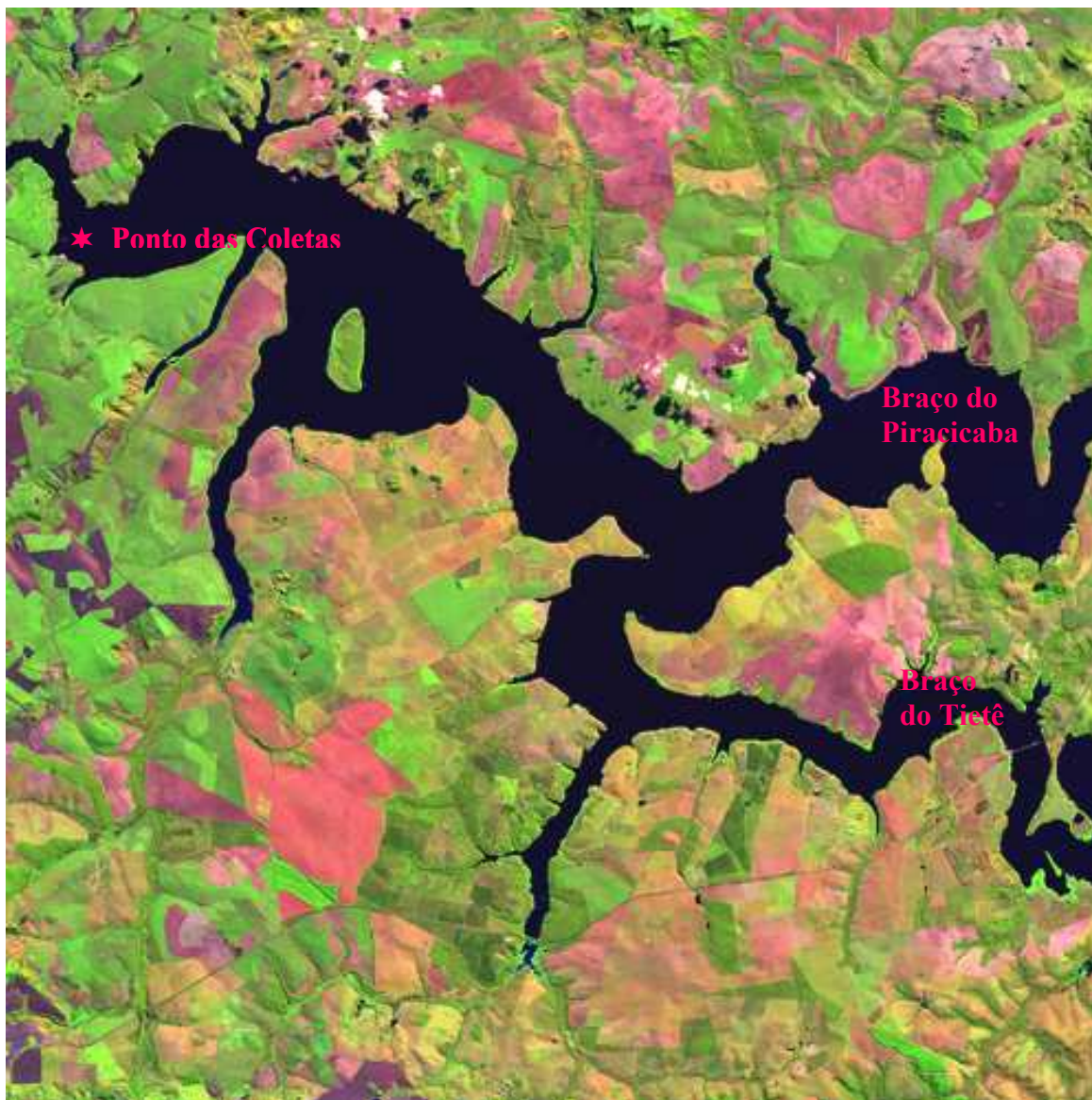
2.2 *Objetivos Específicos*

- ★ (1) Separar a MOD excretada por *M. aeruginosa* em três frações a) MOD<3kDa; b) 30>MOD>3 kDa; c) MOD>30 kDa. A escolha destas massas moleculares representou um ponto de partida, considerando-se que a maior parte de MOD excretada conhecida concentra-se abaixo de 30 kDa (Bittar, 2005).
- ★ (2) Quantificar o efeito da radiação UV-A+B na transferência de carbono dissolvido de cada fração para as comunidades bacterianas;
- ★ (3) Identificar a distribuição morfológica das espécies bacterianas que se associam a cada uma das frações testadas, e que possam assimilar carbono orgânico oriundo das diferentes frações da MOD irradiada com UV-A+B
- ★ (4) Verificar a ocorrência de fenômenos de sucessão bacteriana estabelecidos em função da variedade na composição da MOD liberada pela cianobactéria.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Estudo

O reservatório de Barra Bonita é o primeiro de um complexo de seis reservatórios em cascata ao longo do médio e baixo rio Tietê. É formado pelos rios Tietê e Piracicaba (SP), ambos hipereutróficos e poluídos por atividades agrícolas e industriais (Figura 1). Foi construído a fim de gerar energia elétrica; no entanto, este reservatório possui como adicionais atividades o abastecimento de água, a pesca, a navegação, a recreação, bem como a irrigação. Encontra-se em uma região de transição entre os climas tropical e subtropical, com uma estação seca (inverno) e outra chuvosa (verão). Trata-se de um reservatório polimítico, porém com freqüentes momentos de estratificações (química e térmica) de curta duração. Durante o verão (estação chuvosa) a taxa de descarga é cerca de 1500 m³/s; já para a estação seca (inverno), a taxa de descarga é de aproximadamente 200 m³/s. A profundidade máxima é cerca de 25 m, com uma profundidade média de 10 m. O tempo de retenção no verão é de 37 dias, no inverno é de 137 dias. Vários estudos caracterizam-no como hipereutrífico, sendo que o aporte de nutrientes ocorre por meio de fontes difusas, já que seu entorno sofre grandes impactos ambientais ocasionados pela monocultura de cana-de-açúcar e criação de gado, ao longo dos rios principais e seus tributários (Calijuri & Tundisi, 1990; Tundisi & Matsumura-Tundisi, 1990). Predominam os solos tipo latossolo vermelho distroférico e latossolo vermelho-amarelo distrófico e argissolo vermelho-amarelo distrófico (EMBRAPA, 1999).



Escala 1:50.000

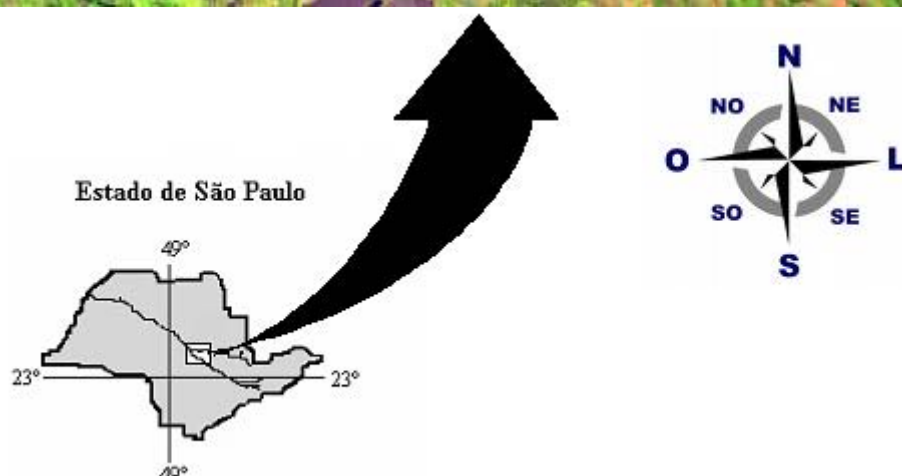


Figura 1. Reservatório de Barra Bonita; o símbolo ★ representa o ponto de coleta de coordenadas 22° 32' 34,5" S, 48° 29' 26,4" O, situado a cerca de 3 km a montante da barragem, (Embrapa, 2002).

3.2 Cultura da cianobactéria

A espécie *Microcystis aeruginosa* (Kützing) foi isolada do reservatório de Barra Bonita e é atualmente mantida como linhagem axênica (BB05) na coleção de culturas de microalgas de água doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM: UFSCar CC 835). Quando livre no ambiente, populações desta espécie de cianobactéria formam colônias com distintas formas e tamanhos. Estudos com o gênero *Microcystis* em lagos temperados definiram características estruturais comuns entre populações desse gênero, agrupando-as em diversas formas coloniais, encontradas em diferentes fases de seu ciclo anual de crescimento (Reynolds *et al.*, 1981). Já no cultivo axênico em laboratório, a *M. aeruginosa* apresenta um comportamento atípico em seu crescimento, suas células permaneceram livres, isto é, individualizadas, o que possibilitou o monitoramento do crescimento das culturas por contagem.

As culturas axênicas foram obtidas por repetidos isolamentos e lavagens por centrifugação. Culturas experimentais cresceram em erlenmeyers de 4.0 L de capacidade, em 2.0 L de meio de cultura ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), em pH 7,0, previamente autoclavado. Culturas foram mantidas sob as seguintes condições laboratoriais: 100 - 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância (Quantameter QSL-100, Biospherical Instruments); temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$; fotoperíodo de 12:12 horas e gentilmente agitadas duas vezes ao dia. A axenidade destas culturas foi checada periodicamente por inoculação de uma alíquota das culturas em meio ASM-1 mais peptona, glicose e extrato de levedura (150 mg.L^{-1} cada).

Para acompanhar o crescimento da cultura ao longo do tempo, foram feitas amostragens para contagem de células em câmara Fuchs-Rosenthal, na qual foram contadas em tréplicas todas as células dos dois campos inteiros da câmara. O

crescimento algal também foi acompanhado por obtenção da concentração de clorofila *a*, extraída com etanol 90% a quente (Nusch 1980), segundo recomendações de Marker *et al.* (1980) e quantificada segundo Lorenzen (1967). O volume coletado variou entre 57 e 90 mL de acordo com o dia de amostragem. Foram utilizados filtros de fibra de vidro de 1,2 µm de poro, em duplicata. Os filtros foram armazenados a -5°C no escuro. Para a extração propriamente dita, os filtros foram postos em tubos plásticos aos quais foram acrescidos aproximadamente 5 mL de etanol 90% a 80°C e macerados com um bastão de vidro. Este macerado foi conservado em geladeira durante 24 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas para a separação da fibra de vidro e o volume de sobrenadante utilizado para a leitura em espectrofotômetro (Hewlett Packard, Diode Array Spectrophotometer 8452A) nos comprimentos de onda de 665 e 750 nm. Posterior a esta primeira leitura, as amostras foram acidificadas com HCl 1 M (100 µL para cada 5 mL de amostra), mantidas em descanso por 15 minutos, e lidas novamente nos mesmos comprimentos de onda para se obter os valores de feofitina (subproduto da degradação da clorofila *a*) usados no cálculo da concentração de clorofila *a*.

A fase na qual as amostras de MOD foram coletadas foi caracterizada pela estabilidade ou decréscimo da concentração de células, em concomitância com o decréscimo da concentração de clorofila *a*.

3.3 Experimentação

3.3.1 Obtenção da MOD excretada e/ou liberada passivamente

A MOD liberada pela *M. aeruginosa* foi obtida na fase estacionária do crescimento, portanto há a possibilidade da ocorrência de MOD oriunda de células mortas. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, células algais foram separadas dos meios de cultura por filtração tangencial em cartucho de fibra oca (Xampler™, A/G

Technology Corporation/GE) com poros de 0,65 μm (UFP-6-E-4A), previamente autoclavado.

3.3.2 Fracionamento da MOD

Para o fracionamento da MOD produzida pela *M. aeruginosa*, a separação das três frações de interesse, MOD<3 kDa, 30>MO>3 kDa e MO>30 kDa foi inicialmente realizada por ultra-filtração tangencial em cartuchos de fibra oca de 3 kDa (UFP-3-E-4A) e de 30 kDa (UFP-30-E-4A), também previamente autoclavados. Após o fracionamento, foi acertado o volume inicial do filtrado com água ultrapura autoclavada a fim de manter as concentrações iniciais das frações de MOD no meio de cultivo da cianobactéria. Estas sub-amostras foram novamente filtradas em membranas de policarbonato com poros de 0,22 μm (Millipore) para retirar possíveis bactérias contaminantes.

3.3.3 Irradiação das frações de MOD

Após filtração em membranas de poro 0,22 μm , as frações de MOD obtidas a partir da cultura experimental da cianobactéria foram submetidas à simultânea radiação UV-A + UV-B, proveniente de lâmpadas TL 40W 05 (ricas em UV-A) e TL 40W/12RS (ricas em UV-B) (Phillips), por um período de 12 horas, buscando simular o período de insolação que ocorre no reservatório de Barra Bonita. Para isso, foram utilizados frascos de quartzo que permitem a passagem total da radiação UV. A irradiação das amostras foi realizada mantendo os frascos sob as lâmpadas, a uma distância em que a energia incidente nos frascos foi similar àquela encontrada incidente à superfície do reservatório de Barra Bonita no mês de junho (inverno), quando foi realizada a coleta do inóculo bacteriano. O valor total de irradiância utilizado neste experimento foi de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As medidas de intensidade de radiação UV foram realizadas por meio de um espectrorradiômetro (EPP 2000, StellarNet).

3.3.4 Biodisponibilidade da MOD

Após serem submetidas à radiação ultravioleta, as três frações de MOD, irradiadas e não irradiadas, foram utilizadas para composição dos experimentos de degradação bacteriana. Separadamente, cada uma das frações de MOD serviu de substrato para as bactérias provenientes da comunidade do reservatório de Barra Bonita.

3.3.4.1 Obtenção do inóculo bacteriano

A coleta do inóculo bacteriano foi efetuada em um único ponto de coordenadas 22° 32' 34,5" S, 48° 29' 26,4" O, situado a cerca de 3 km a montante da barragem (Figura 1). A coleta foi feita no mês de junho de 2008, na estação seca (inverno). A Tabela 1 caracteriza o ambiente no momento da coleta segundo algumas variáveis físico-químicas.

Tabela 1. Medidas das variáveis físico-químicas verificadas para a água do reservatório de Barra Bonita no ponto de coleta (junho/2008).

<i>Variáveis Físico-Químicas</i>		<i>Valor</i>
pH		5,60
Temperatura	°C	19,6
Oxigênio Dissolvido	mg.L ⁻¹	5,31
Condutividade	µS.cm ⁻¹	0,20
Disco de Secchi (profundidade)	m	2,30

Este inóculo foi obtido a partir de coleta integrada da coluna d'água (superfície, 1, 5, 10 e 18 metros). As amostras das várias profundidades foram integradas em sistema previamente autoclavado (Figura 2). 2 L do volume coletado foram filtrados sob condições estéreis, em filtros de fibra de vidro com poros de 1,2 µm (GF/C, Whatman) previamente calcinados (500°C por 3 horas), para retirar algas, protozoários e detritos presentes na amostra.



Figura 2. Sistema utilizado para coleta integrada do inóculo bacteriano (previamente autoclavado). A entrada de água **C** (com um peso em sua ponta) é posicionada na profundidade desejada, permaneceu fechada com papel alumínio e apenas foi aberta depois de submersa no reservatório. O tubo de vidro com algodão **A**, autoclavado juntamente com o sistema, é conectado à mangueira ligada à bomba de vácuo **D** a fim de evitar contaminação por bactérias aéreas. Um respirador **B** foi adicionado para controle do vácuo e manter as trocas gasosas após a coleta.

3.3.4.2 Consumo da MOD pelo bacterioplâncton

Foram feitas duas réplicas das culturas de bactérias para cada tipo de substrato disponibilizado à comunidade bacteriana, isto é, duas culturas de cada uma das frações: MOD<3 kDa, 30>MOD>3 kDa e MOD>30 kDa; e para ambos os tratamentos: frações irradiadas e frações não irradiadas. As culturas continham 500 mL das frações de MOD, 500 mL de água do reservatório filtrada em membranas de polycarbonato com poros de 0,22 μm coletada no mesmo local do inóculo bacteriano sob condições assépticas, 100 mL de meio ASM-1 autoclavado e 50 mL do inóculo bacteriano (Figura 3). O meio ASM-1 foi adicionado para proporcionar os nutrientes inorgânicos necessários ao

metabolismo bacteriano, para fazer do carbono o único nutriente limitante do crescimento das bactérias. Também foram feitas duas réplicas para o controle, o qual foi constituído de 1 L de água do reservatório filtrada em membranas de policarbonato com poros de 0,22 μm , 100 mL de meio ASM-1 autoclavado e 50 mL de inóculo bacteriano. É importante salientar que as culturas controle não foram submetidas à radiação UV-A+UV-B. Culturas bacterianas cresceram em frascos de vidro de 2L com tampa tipo *vent-cap* os quais foram mantidos no escuro e sob temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e foram gentilmente agitadas uma vez ao dia.

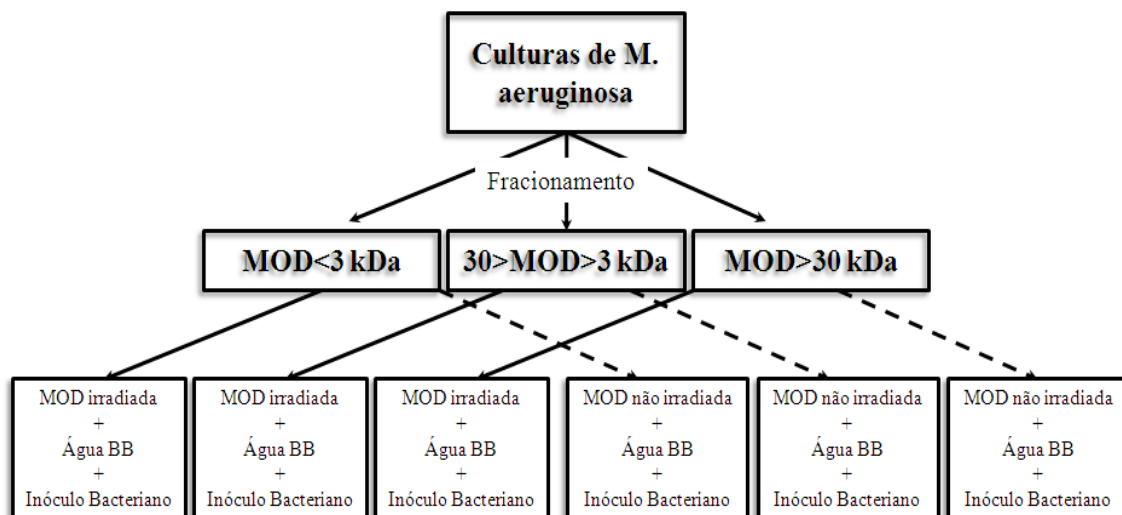


Figura 3. Diagrama que relata o destino da MOD produzida por *M. aeruginosa*, desde a cultura algal produtora da MOD à composição das culturas bacterianas.

A temperatura de cultivo aplicada ao experimento em questão correspondeu à média das temperaturas verificadas no período do ano em que foi coletado o inóculo bacteriano (inverno). Assim, buscou-se reproduzir as mesmas condições ambientais locais a fim de se obter dados que melhor reproduzissem os eventos que sucedem um *bloom* de *M. aeruginosa* no que se refere à resposta da comunidade bacteriana do reservatório de Barra Bonita.

A dinâmica da densidade bacteriana foi acompanhada durante 27 dias através da contagem das células. Aliquotas de 50 mL das culturas foram amostradas nos seguintes momentos: 0 horas, 12 horas, 1, 2, 5, 8, 12, 15, 19, 23 e 27 dias, sob condições assépticas. Estas foram fixadas com formol (4 %) e coradas com DAPI (Porter & Feig, 1980), em filtros pretos de policarbonato com 0,22 µm de diâmetro de poro (Millipore), utilizando a técnica de microscopia de epifluorescência (microscópio Zeiss Axioplan 2, Jena, Germany).

O consumo da MOD nas culturas bacterianas foi monitorado por quantificação do carbono orgânico dissolvido (COD), filtrando uma alíquota de 25 mL da cultura em membranas de policarbonato com poro 0,22 µm e utilizando-se para as leituras de COD um analisador de carbono TOC-Vcph (Shimadzu). Foram realizadas 11 amostragens ao longo do período de incubação (mesmos momentos das análises bacterianas descritas acima).

3.3.4.3 Caracterização da comunidade bacteriana: morfologia, biovolume e biomassa bacteriana

Além da densidade, a morfologia das células bacterianas foi obtida também por microscopia de epifluorescência. Das amostras fixadas obtidas para densidade bacteriana, foram retiradas pequenas alíquotas (de 0,5 a 4,5 mL) e seus volumes foram ajustados com água ultrapura autoclavada para um volume final de 4,5 mL. Estas foram sonificadas em banho de ultrassom (Bransonic 1210) por 30 minutos a fim de dissolver possíveis agregados bacterianos formados durante o consumo da MOD. A sonificação aplicada neste trabalho não é capaz de alterar a quantidade, o biovolume e nem a morfologia das bactérias (Bagatini, 2008). Após a sonificação, estas alíquotas foram coradas com DAPI (concentração final de 1 µg.mL⁻¹) e filtradas em membranas de policarbonato com poros de 0,22 µm, previamente coradas com Sudan Black. Foram

montadas lâminas das quais se obteve fotomicrografias (imagens) para posteriores análises.

Por meio da técnica de microscopia de epifluorescência, estas fotomicrografias foram capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc acoplada a um microscópio Zeiss Axioplan 2 (Jena, Germany). As imagens foram tratadas com ajuda do software Axiovision release 4.5 (Zeiss). Os morfotipos foram identificados pela razão comprimento/largura (fator de forma “R”) (Zaritsky 1975 *apud* Racy 2004), e assim classificados em cocos – de 1,0 a 1,25; cocobacilos – de 1,26 a 1,75; bacilos – de 1,76 até 5. As bactérias com R superior a 5 foram classificadas como filamentos, víbrios foram identificados pela sua forma falciforme e espirilos foram identificados pela sua forma em “S”.

Para o cálculo do biovolume de cada célula bacteriana, foram aplicadas fórmulas descritas por Sun & Liu (2003) assumindo-se que:

<p>COCO</p> $V = \frac{\pi \times a^3}{6}$ <p>ESFERA</p>	<p>$V = \frac{\pi \times b^2 \times a}{6}$</p> <p>ESFERÓIDE PROLATADO</p>	<p>BACILO, ESPIRILLO E FILAMENTO</p> $V = \pi \times b^2 \left(\frac{a}{4} - \frac{b}{12} \right)$ <p>CILINDRO COM DUAS CAPAS HEMI-ESFÉRICAS</p>
<p>VÍBRIO</p> $V \approx \frac{\pi \times a \times b \times c}{4}$ <p>PRISMA FALCIFORME</p>	<p>COCOBACILO</p> $V = \frac{\pi \times a \times b \times c}{6}$ <p>ELIPSÓIDE</p>	

Em que: **a** = comprimento ou diâmetro da célula; **b** = largura e **c** = espessura.

O software utilizado para medir as células bacterianas opera em um sistema bidimensional. Uma vez que células bacterianas possuem uma configuração tridimensional, considerou-se sempre **b** = **c**. O comprimento (**a**) de víbrios e espirilos

corresponde à distância entre as duas extremidades da figura e foi determinado manualmente, com o auxílio de recursos disponíveis no software. As medidas de cocos, cocobacilos e bacilos foram efetuadas automaticamente pelo sistema, corrigindo manualmente quando necessário.

A biomassa bacteriana foi calculada multiplicando-se o número de células em cada amostragem pelo biovolume médio e pelo fator de conversão de 0,12 pg C. μm^3 (Nagata & Watanabe, 1990). Este fator foi escolhido devido à sua aplicabilidade para avaliação de comunidades de bactérias obtidas a partir de culturas enriquecidas.

3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos valores obtidos para densidade bacteriana (testes T Student, ANOVA e comparações múltiplas de Tukey-Kramer (Zar, 1999)) foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad InStat® 3.0 (1997).

Os limites de significância para o teste de Tukey-Kramer para $n=3$ foram de $q = 5,910$ e $P < 0,05$

Foram adotados os seguintes limites para os níveis de significância:

<i>Valor de P</i>	<i>Significado</i>
<0,001	Extremamente significativa
0,001 a 0,01	Muito significativa
0,01 a 0,05	Significante
> 0,05	Não significativa

4. RESULTADOS

4.1 Crescimento de *Microcystis aeruginosa*

A cianobactéria foi monitorada durante todo seu crescimento a fim de se obter um filtrado de MOD excretada ativamente ou liberada passivamente na fase estacionária. O 53º dia de cultivo correspondeu ao período de estabilização no início da fase estacionária.

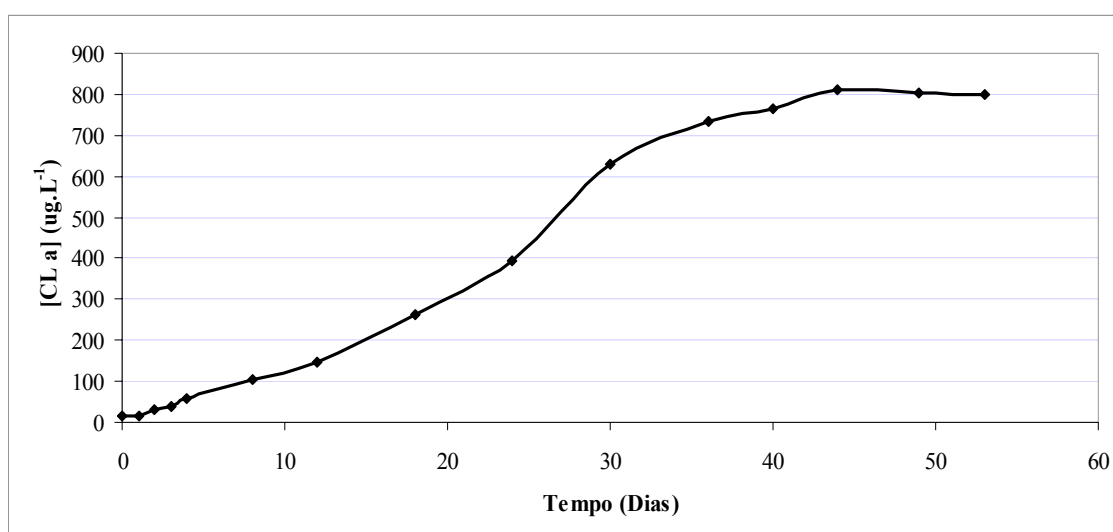


Figura 4. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo (dias) da cultura de *Microcystis aeruginosa*.

Além da concentração de clorofila *a* (Figura 4), o crescimento algal foi acompanhado por contagem celular. As medidas de densidade celular também indicam que a cultura estava, no 53º dia de cultivo, na fase estacionária do crescimento (Figura 5).

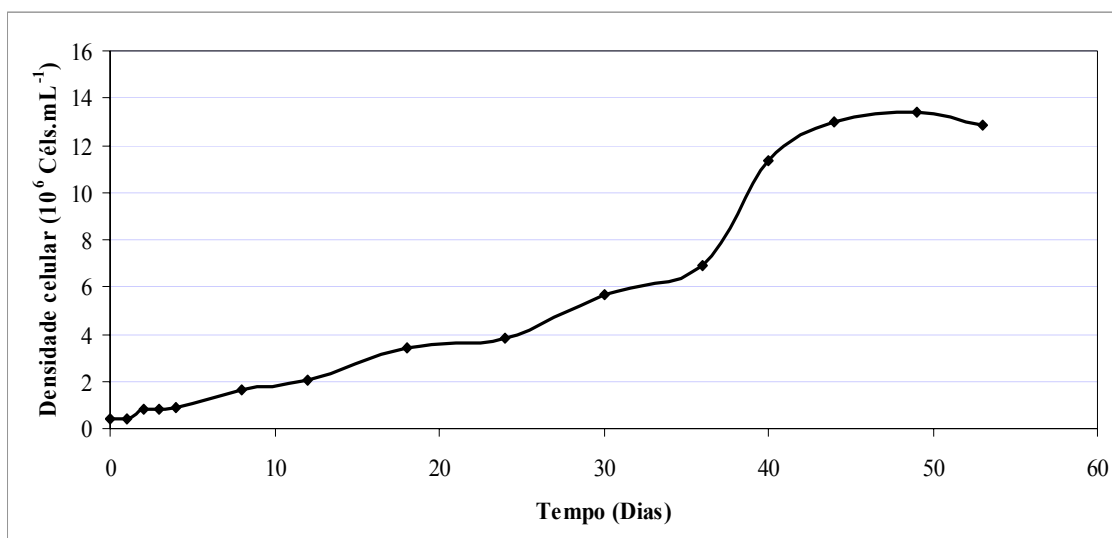


Figura 5. Densidade de células de *Microcystis aeruginosa* (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) da cultura.

4.2. Experimento da biodisponibilidade de MOD à comunidade bacteriana

A Tabela 1 mostra as concentrações iniciais de COD nos diferentes tratamentos. As culturas enriquecidas com MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada, apresentaram valores iniciais de carbono orgânico dissolvido bem superiores às demais frações, seguidas daquelas com MOD>30 kDa e 30>MO>3 kDa. Porém, comparando-se estatisticamente as concentrações entre as culturas irradiadas e não irradiadas de mesma fração, não houve diferenças significativas o que permite comparações entre as mesmas.

Tabela 2. Concentração de COD inicial (mg C.L⁻¹) nas réplicas dos cultivos enriquecidos com as diferentes frações de MOD, irradiadas e não irradiadas, bem como o controle. Valores de P comparam as culturas com mesmas frações de MOD, irradiada e não irradiada.

<i>Carbono Orgânico Dissolvido Inicial [COD]_i (mg C.L⁻¹)</i>				
	MOD<3 kDa	30>MOD>3 kDa	MOD>30 kDa	Controle (Ñ irradiado)
Irradiada	17,61/18,12	7,01/8,81	8,50/8,67	
Não irradiada	15,58/16,48	7,21/8,05	8,31/9,03	4,81/4,67
Teste <i>t</i> de Student (P)	0,0719	0,8039	0,8307	

4.2.1 Consumo do COD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas controle

A dinâmica de utilização do COD contido nas culturas controle pelas bactérias é apresentada na Figura 6. Os controles apresentaram uma baixa concentração inicial de COD. Estes foram compostos do dobro do volume de água do reservatório utilizado nas culturas com MOD liberada pela *M. aeruginosa*, além dos 100 mL de meio ASM-1 adicionados em todos os tratamentos.

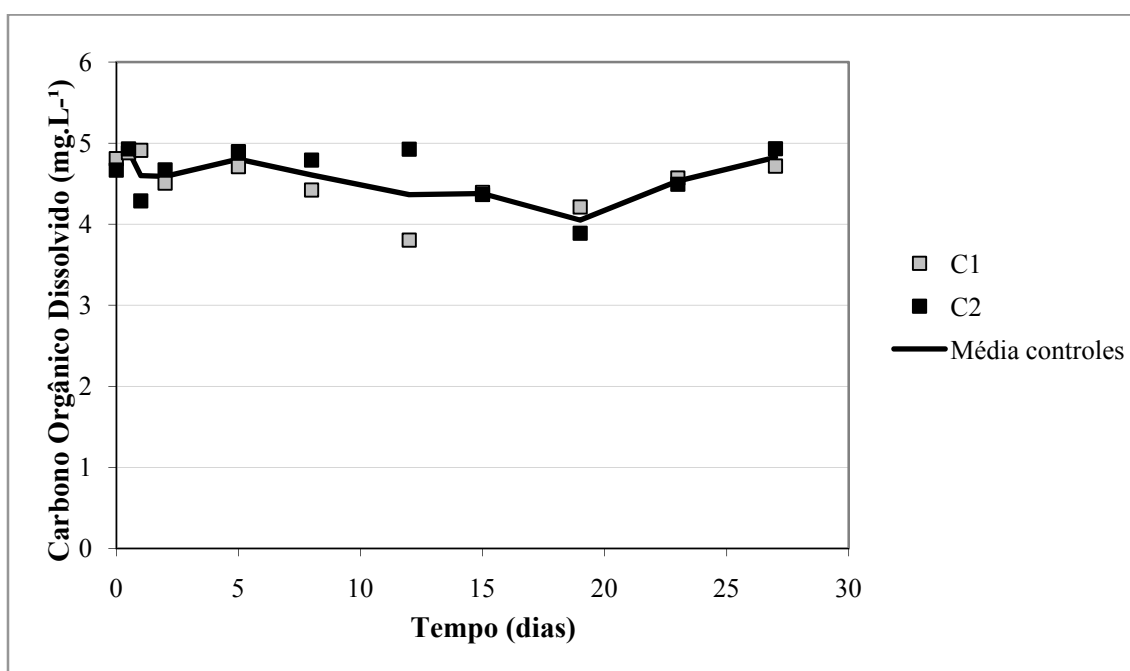


Figura 6. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) nos controles. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha.

Na Figura 7 é mostrado o comportamento da densidade das bactérias presentes nos controles. Observa-se que o crescimento é exponencial nas primeiras 48 horas de cultivo, declinando acentuadamente após o 2º dia e praticamente se estabiliza do 12º dia até o final do período de incubação.

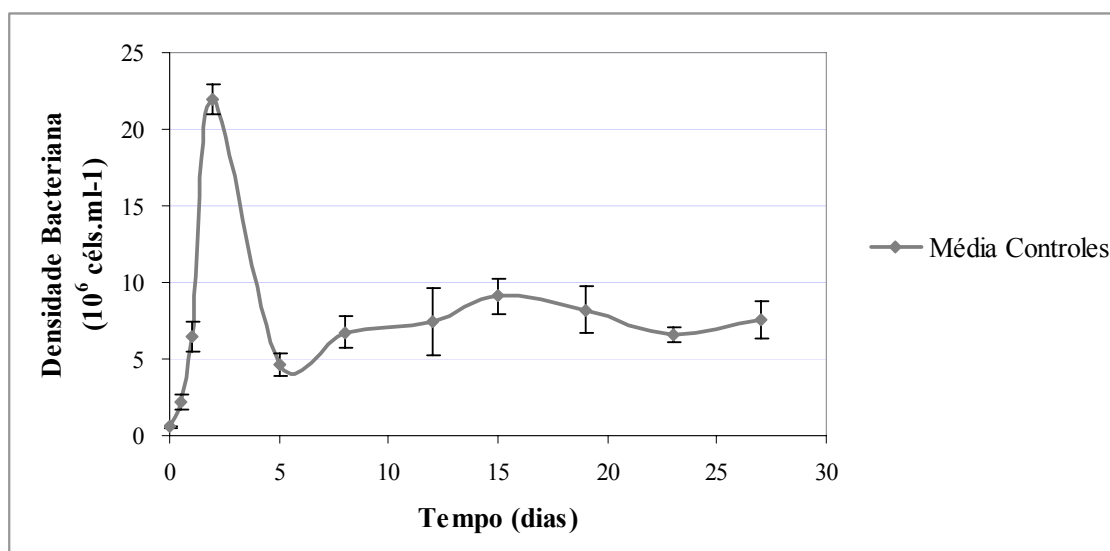


Figura 7. Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas controle. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

Foram analisadas também as freqüências dos morfotipos celulares bacterianos durante o período de incubação. Houve uma variação muito discreta na freqüência relativa dos morfotipos bacterianos das culturas controle nas primeiras 24 horas de incubação (Tabela 3). Após o 5º dia, houve uma estabilização na freqüência dos tipos bacterianos. Os morfotipos filamento e espirilo não apresentaram muito sucesso em suas adaptações às condições de cultivos nas culturas controle, sendo que espirilo apresentou freqüência nula em 8 das 11 amostragens.

Tabela 3. Freqüência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas controle ao longo dos 27 dias de cultivo.

% MORFOTIPOS BACTERIANOS						
Dias	Coco	Cocobacilo	Bacilo	Víbrio	Espirilo	Filamento
0	15,03	40,48	31,49	12,60	0,40	0
0,5	19,57	38,34	33,11	8,38	0,29	0,31
1	8,05	33,58	42,82	14,55	0	0
2	10,43	29,80	42,56	16,50	0	0,71
5	15,23	30,39	46,75	7,63	0	0
8	15,38	26,84	49,17	6,25	0	2,36
12	15,41	32,01	42,35	8,50	0	1,73
15	14,74	29,90	47,07	7,74	0	0,54
19	12,72	37,10	40,60	8,44	0,33	0,81
23	16,49	31,78	41,40	8,70	0	1,63
27	12,90	35,92	43,57	6,15	0	1,45

A dinâmica da biomassa bacteriana nas culturas controle é mostrada na Figura 8. Foi constatado um rápido aumento da biomassa bacteriana no início do período de incubação (primeiras 48 horas), com um valor máximo atingido no segundo dia (438,92 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$). Este valor cai após o 2º dia e do 5º ao 27º dia houve uma fase de pequenas flutuações, com um valor médio de 141,47 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$.

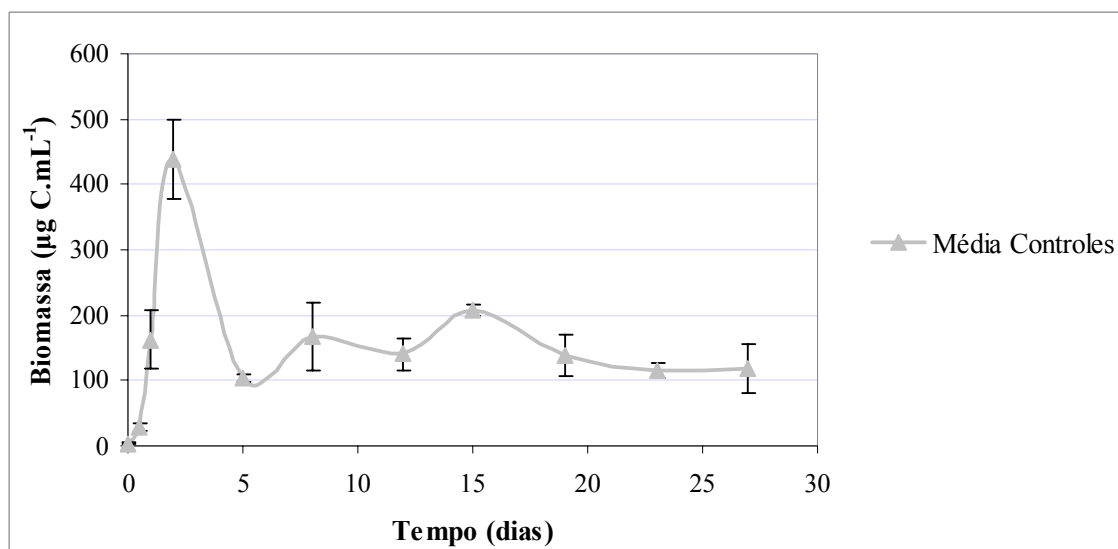


Figura 8. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas controles. O valor médio entre as réplicas é representado pela linha. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

4.2.2 Consumo do COD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas com MOD<3 kDa irradiada e não irradiada

A dinâmica de consumo da MOD<3 kDa dos tratamentos irradiado e não irradiado é semelhante durante praticamente todo o tempo de incubação, mas é possível observar que a fração não irradiada foi mais prontamente degradada nas primeiras 48 horas de incubação. A partir do 27º dia o carbono da fração irradiada sofre uma redução de cerca de 30% enquanto na fração não irradiada, os valores de COD permanecem praticamente constantes nestas amostragens finais (Figura 9).

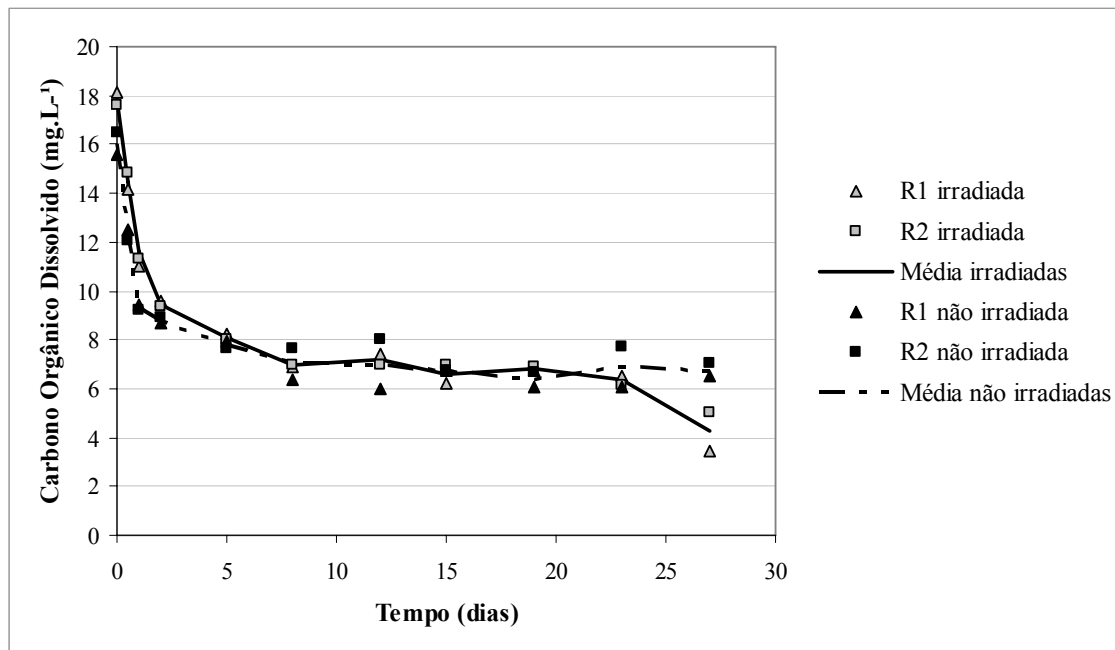


Figura 9. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração de MOD < 3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

Os resultados obtidos para as culturas com a fração de MOD < 3 kDa demonstraram um rápido aumento da densidade bacteriana no início do período de incubação. Porém, as culturas com MOD não irradiada atingiram valores máximos em 24 horas de incubação (média = $32,81 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹, DP = $2,50 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹) e as culturas com MOD irradiada atingiram valores máximos em 48 horas de incubação (média = $36,73 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹, DP = $1,08 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹). Ocorreu um rápido declínio nos valores de densidade bacteriana após este período inicial, e do 5° ao 27° dia houve uma fase aparentemente estável, com valores médios de $9,18 \cdot 10^6$ (DP = $0,59 \cdot 10^6$) células.mL⁻¹ para as culturas com MOD irradiada e $7,31 \cdot 10^6$ (DP = $0,66 \cdot 10^6$) células.mL⁻¹ para aquelas com MOD não irradiada (Figura 10)

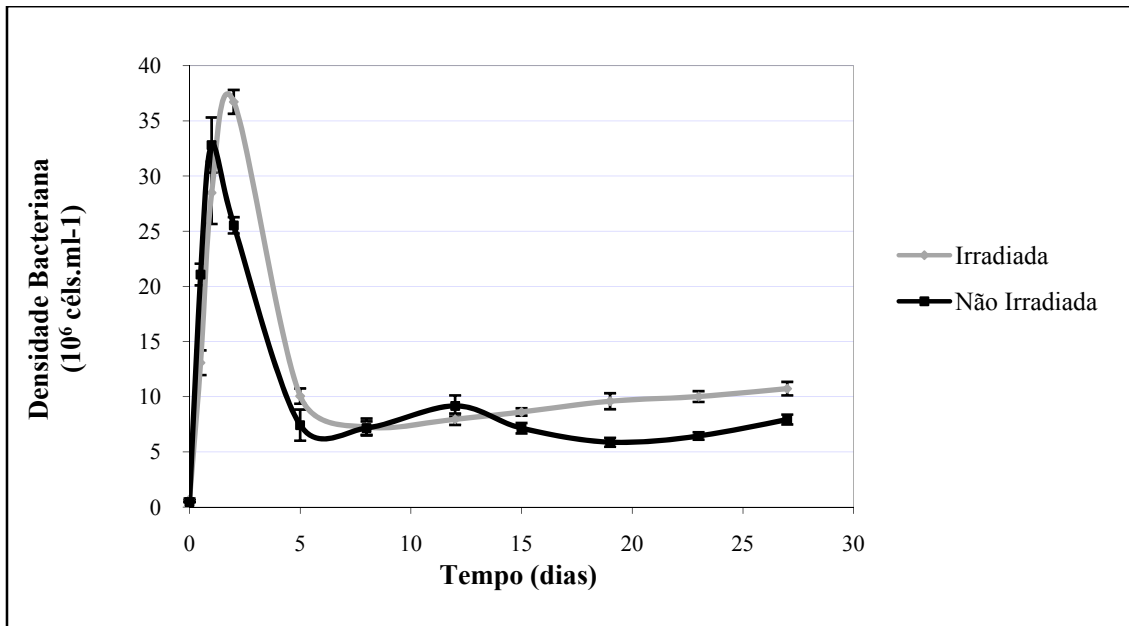


Figura 10. Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

Optou-se por analisar estatisticamente os valores de densidade bacteriana buscando avaliar a eficiência da reprodução desta comunidade. Este evento de multiplicação celular ocorre intensamente em momentos de abundância dos recursos energéticos e boas condições ambientais, o que simula uma ocasião de *bloom*.

A Tabela 4 mostra os valores obtidos no teste *t* de Student comparando os dois tratamentos (irradiado e não irradiado) da fração de MOD<3 kDa.

Tabela 4. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com a fração de MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2.

<i>Densidade Bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹)</i>					Teste <i>t</i> de Student
Tempo	Irradiadas		Não-Irradiadas		
Dia	Média	DP	Média	DP	P
0	0,705	0,083	0,469	0,036	0,0627
0,5	13,091	1,121	21,080	0,981	0,0169*
1	28,487	2,825	32,812	2,449	0,2467
2	36,725	1,081	25,538	0,735	0,0067 **
5	10,065	0,692	7,434	1,408	0,1410
8	7,266	0,770	7,166	0,605	0,8984
12	7,968	0,513	9,173	0,958	0,2569
15	8,624	0,334	7,152	0,472	0,0687
19	9,598	0,726	5,877	0,406	0,0243*
23	10,022	0,488	6,451	0,337	0,0136*
27	10,740	0,613	7,940	0,447	0,0346*

* significativo

** muito significativo

Os resultados demonstraram que das 11 amostragens, as diferenças foram significativas em 4 momentos (12 horas, P = 0,0169; 19 dias, P = 0,0243; 23 dias, P = 0,0136; 27 dias, P = 0,0346) e em 1 foi muito significativa (48 horas, P = 0,0067) (Tabela 4).

Quanto aos morfotipos celulares, as culturas com a fração irradiada de MOD<3 kDa apresentaram freqüências médias de bacilos um pouco maiores que as com MOD não irradiada nas primeiras 48 horas de incubação. Já na fase de estabilização (5° ao 27° dia), as freqüências relativas dos morfotipos mantiveram-se praticamente constantes, com predominância de bacilos, cocobacilos e cocos, respectivamente, para ambos os tratamentos. Espirilos e filamentos possuem as menores freqüências relativas, porém é necessário notar que as freqüências dos filamentos são mais altas nas culturas com a fração irradiada (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de MOD < 3 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo.

% MORFOTIPOS BACTERIANOS												
Dias	Coco		Cocobacilo		Bacilo		Víbrio		Espirilo		Filamento	
	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.
0	8,15	16,13	61,55	58,99	23,76	17,78	6,55	7,11	0	0	0	0
0,5	0,50	5,46	11,45	25,74	86,06	66,01	1,64	2,03	0	0	0,34	0,76
1	4,02	2,30	25,44	24,21	60,37	57,55	7,93	14,86	1,34	0	0,89	1,08
2	3,46	5,25	18,36	23,91	61,01	58,61	14,77	11,59	1,14	0	1,26	0,64
5	3,53	17,12	21,19	29,96	63,97	40,57	9,90	12,10	0,18	0,24	1,23	0
8	14,84	9,46	29,04	25,89	42,66	47,55	10,77	15,9	0	0,59	2,68	0,62
12	18,48	13,32	29,91	31,88	43,19	42,52	7,50	11,26	0	0,65	0,92	0,33
15	14,32	15,29	36,33	31,62	41,84	47,12	6,77	5,48	0,16	0	0,58	0,46
19	22,81	18,36	33,56	36,98	35,27	36,72	7,32	6,83	0,48	1,08	0,56	0
23	17,46	18,86	37,40	33,19	37,73	40,08	5,95	7,64	0,21	0	1,25	0,22
27	13,38	19,10	33,19	36,13	48,82	38,10	3,83	6,03	0	0,64	0,77	0

Para a fração de MOD de baixo peso molecular, foi constatado um rápido aumento da biomassa bacteriana no início do período de incubação, porém as culturas com MOD irradiada atingiram valores máximos com 48 horas de incubação (média = $1.793,45 \mu\text{g C.mL}^{-1}$, desvio-padrão (DP) = $141,57 \mu\text{g C.mL}^{-1}$) enquanto que as culturas com MOD não irradiada atingiram valores máximos com 24 horas de incubação (média = $1.674,92 \mu\text{g C.mL}^{-1}$, DP = $184,13 \mu\text{g C.mL}^{-1}$). Ocorreu um rápido declínio nos valores de biomassa após o 2° e 1° dias, respectivamente, e do 5° ao 27° dia houve uma fase estável, com um valor médio de $185,75 \mu\text{g C.mL}^{-1}$ e DP de $85,91 \mu\text{g C.mL}^{-1}$ para as culturas com MOD irradiada e média de $143,16 \mu\text{g C.mL}^{-1}$ e DP de $32,69 \mu\text{g C.mL}^{-1}$ para aquelas com MOD não irradiada (Figura 11).

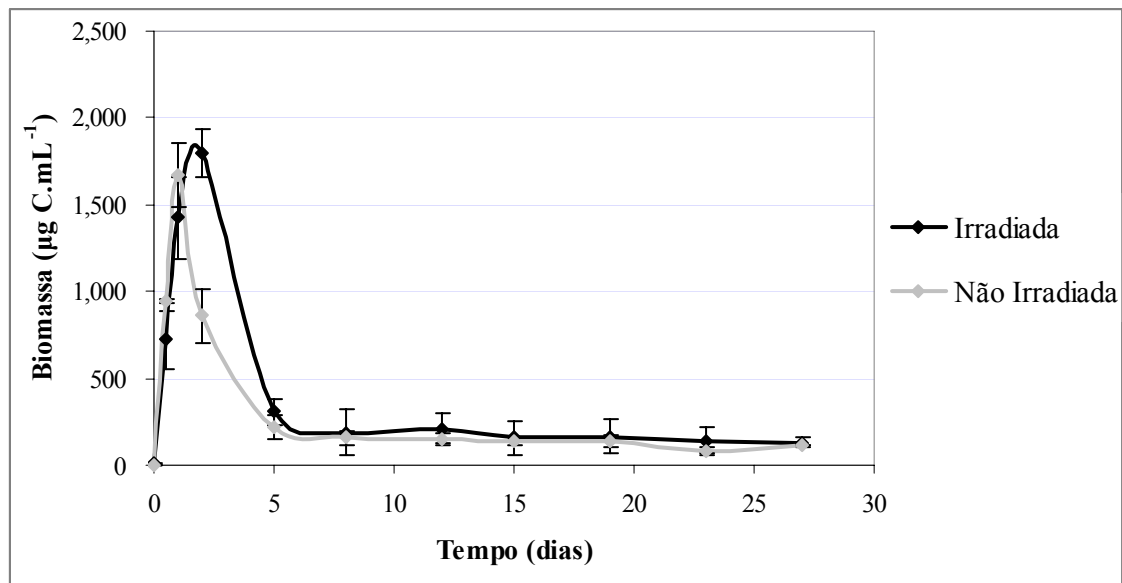


Figura 11. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD<3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

4.2.3 Consumo da MOD, densidade bacteriana, freqüência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas com 30>MOD>3 kDa irradiada e não irradiada

A figura 12 apresenta os resultados do consumo de COD para a fração de 30>MOD>3 kDa. A MOD irradiada foi consumida com maior eficiência pelas bactérias até 12° dia. Após esse período, os valores de COD dos dois tratamentos tornam-se mais similares.

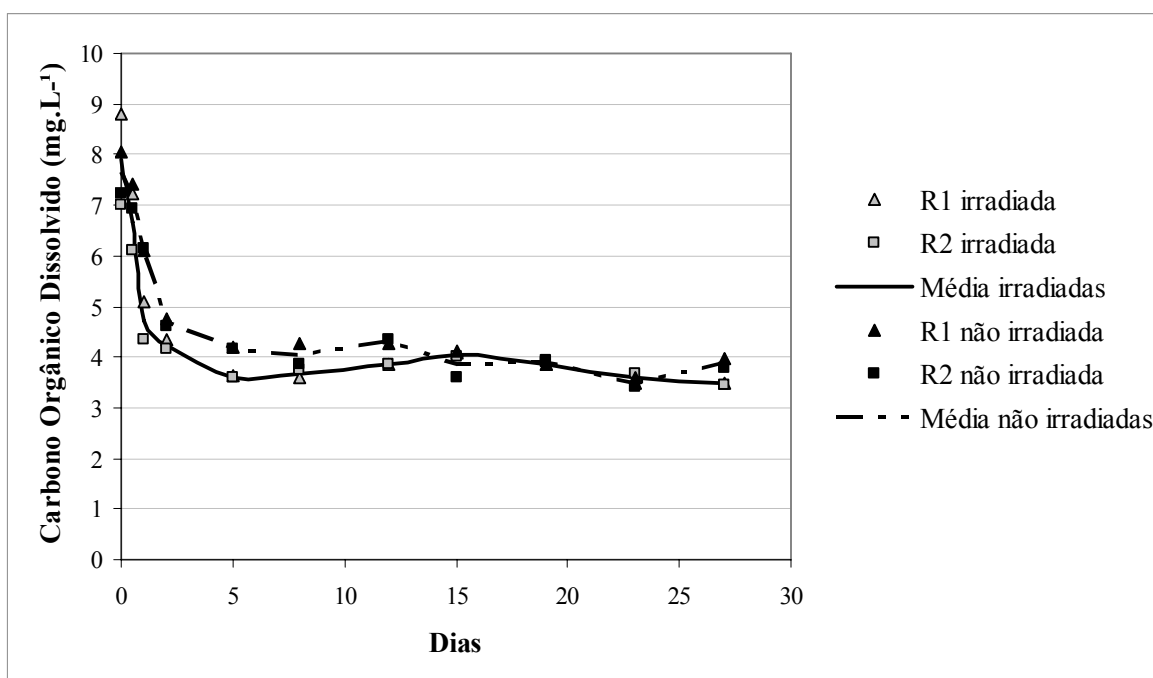


Figura 12. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

Quanto ao crescimento da comunidade bacteriana, os resultados (Figura 13) demonstraram que as culturas com 30>MOD>3 kDa irradiada apresentaram valores máximos de densidade bacteriana maiores que as culturas não irradiadas ($40,41 \cdot 10^6$ céls. mL^{-1} e $32,44 \cdot 10^6$ céls. mL^{-1} , respectivamente), e ambos no 2º dia de incubação. Também foi observado um rápido declínio nos valores de densidade bacteriana entre o 2º e 5º dia, e do dia 5 em diante houve uma fase aparentemente estável, com valores médios de $7,64 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} e DP $1,34 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} para as culturas com MOD irradiada e $6,73 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} e DP $1,39 \cdot 10^6$ células. mL^{-1} para aquelas com MOD não irradiada.

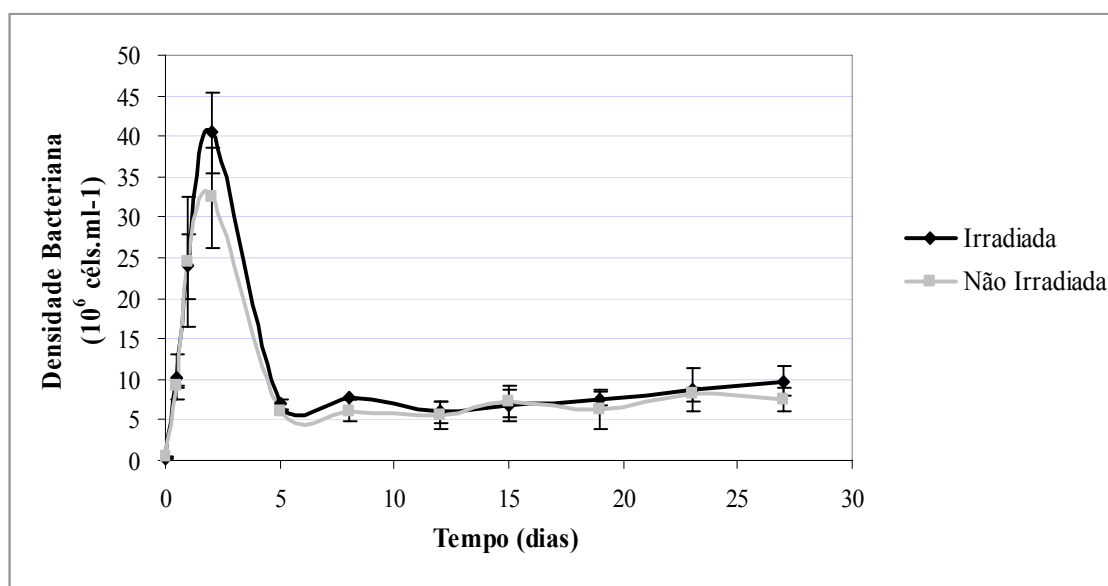


Figura 13. Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com n = 2.

Nas análises estatísticas envolvendo as culturas com fração de 30>MOD>3 kDa irradiada e não irradiada (Tabela 6), os resultados demonstraram que apenas em 1 momento do cultivo os valores médios da densidade bacteriana encontrados para estes tratamentos foram significativamente distintos (48 horas, P = 0,0442).

Tabela 6. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com a fração de 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2.

Tempo Dias	<i>Densidade Bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹)</i>				Teste t de Student P
	Irradiadas		Não-Irradiadas		
	Média	DP	Média	DP	
0	0,327	0,078	0,391	0,062	0,4596
0,5	10,278	2,778	9,144	0,142	0,6225
1	23,985	3,991	24,533	8,012	0,9389
2	40,413	2,145	32,442	1,187	0,0442*
5	6,958	0,565	6,011	0,083	0,1437
8	7,694	0,151	6,188	1,277	0,2395
12	5,969	1,278	5,527	1,704	0,7968
15	6,768	2,020	7,287	1,827	0,8128
19	7,619	0,830	6,351	2,415	0,5553
23	8,640	2,679	8,139	0,936	0,8261
27	9,794	1,888	7,601	1,472	0,3245

* significativo

Ao que se refere à frequência morfológica das células bacterianas nas culturas com fração 30>MOD>3 kDa, a Tabela 7 apresenta valores muito próximos para as diferentes culturas durante praticamente todo o período de incubação. Em 12 horas, ocorreram as maiores frequências relativas de bacilos. Para a fase de estabilização, foi possível observar que as frequências relativas dos morfotipos permaneceram constantes, com predominância de bacilos e cocobacilos, respectivamente. Quanto aos vibrios, esta fração de MOD favoreceu ligeiramente o crescimento deste morfotipo em relação às demais frações de MOD, principalmente em 24 e 48 horas, tanto no *pool* irradiado com no *pool* não irradiado.

Tabela 7. Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de 30>MOD>3 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo.

% MORFOTIPOS BACTERIANOS												
Dias	Coco		Cocobacilo		Bacilo		Víbrio		Espirilo		Filamento	
	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.
0	14,00	13,84	30,60	41,87	35,37	30,2	16,70	14,09	2,50	0	0,83	0
0,5	3,61	4,23	25,87	23,35	66,31	66,05	2,66	5,84	0	0	1,55	0,53
1	4,26	3,43	19,71	22,13	50,51	52,87	24,85	20,93	0,21	0	0,46	0,64
2	7,36	4,76	25,38	24,70	45,04	49,91	21,71	19,20	0	0,54	0,51	0,90
5	7,76	6,63	20,60	20,90	58,17	58,43	11,32	12,06	0	0	2,15	1,99
8	11,96	8,92	21,49	23,29	48,61	53,18	14,04	12,48	0,61	0,44	3,28	1,70
12	14,95	10,55	28,38	23,58	43,69	50,06	11,03	14,62	0,34	0,4	1,62	0,80
15	11,47	12,18	26,56	21,82	49,30	44,72	9,84	10,09	0,32	0	2,50	1,19
19	11,29	16,24	30,87	36,26	50,55	36,90	6,33	10,31	0,34	0,29	0,62	0
23	14,38	13,60	31,26	41,25	44,56	37,34	8,95	6,78	0	0,25	0,85	0,77
27	14,29	15,32	27,86	34,23	48,31	43,39	9,27	4,69	0	0,29	0,27	2,08

Para ambos os tratamentos desta fração, verificou-se um rápido aumento da biomassa bacteriana no início do período de incubação (Figura 14). Além disso, as diferentes culturas atingiram valores máximos com 24 horas de incubação (irradiadas média = 937,80 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$, DP = 150,98 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$, não irradiadas média = 833,11 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$, DP = 100,86 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$). Após o 1º dia de incubação, houve um rápido declínio nos valores de biomassa e uma fase de aparente estabilidade do 5º em diante pôde ser observada, com um valor médio de 177,33 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$ e DP de 18,43 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$ para as

culturas com MOD irradiada e, para aquelas com MOD não irradiada, valor médio de $140,62 \mu\text{g C.mL}^{-1}$ e DP de $18,42 \mu\text{g C.mL}^{-1}$.

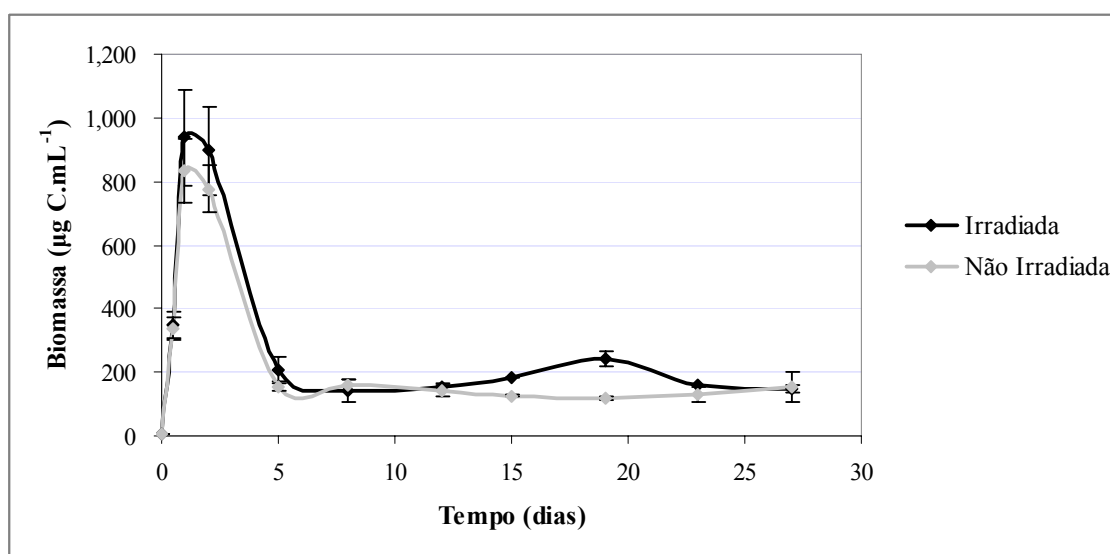


Figura 14. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração 30>MOD>3 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

4.2.4 Consumo da MOD, densidade bacteriana, frequência dos morfotipos e biomassa bacteriana nas culturas com MOD>30 kDa irradiada e não irradiada

Para a fração de MOD>30 kDa, o consumo de COD foi um pouco mais intenso nos primeiros 12 dias nas culturas com MOD irradiada. É importante notar que no 15º dia a fração não irradiada mostra uma súbita redução de aproximadamente 22,40% nas concentrações de COD e permanece praticamente constante até o final da incubação. Já a fração irradiada apresentou um pequeno acréscimo em sua concentração de COD, caiu cerca de 19,60% no 19º dia e, posteriormente, permaneceu constante (Figura 15).

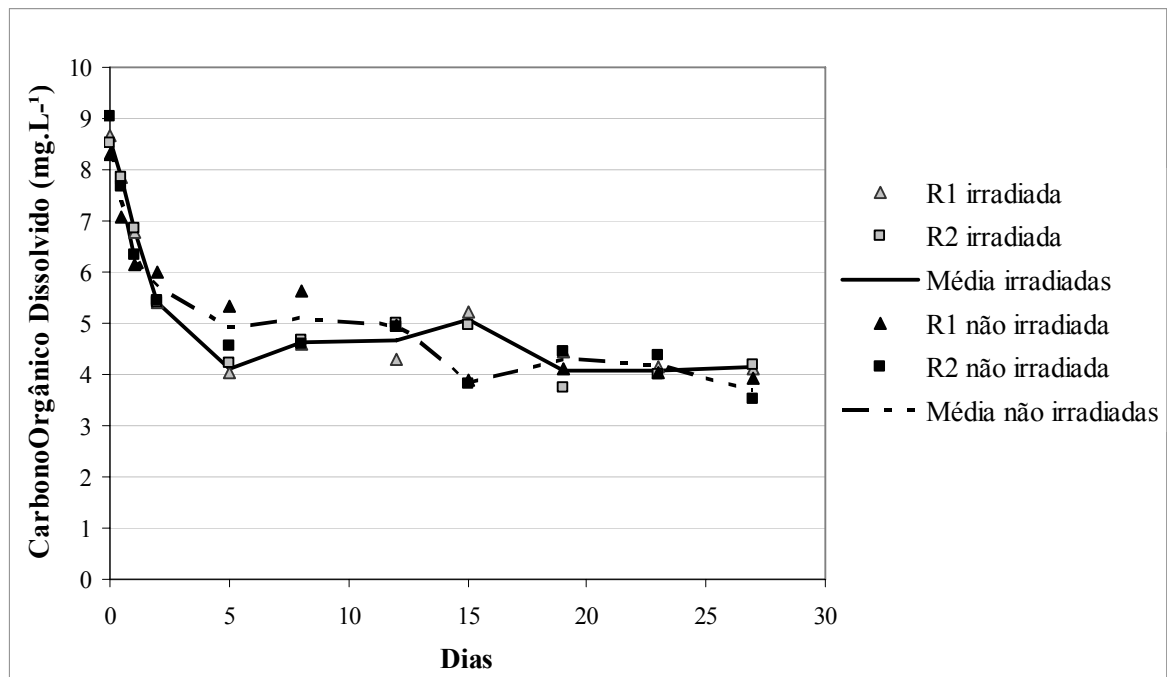


Figura 15. Concentração de COD (mg.L^{-1}) em função do tempo (dias) para as culturas enriquecidas com a fração MOD > 30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas.

A Figura 16 revela que ocorreu uma considerável diferença no crescimento bacteriano inicial entre as culturas com MOD > 30 kDa irradiada e não irradiada. A média das densidades máximas observadas nas culturas com MOD irradiada foi 45% maior que a média das densidades obtidas para as culturas com MOD não irradiada ($38,60 \cdot 10^6$ e $26,58 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente). Os resultados também apontaram um rápido declínio nos valores de densidade bacteriana após o 2º dia, em ambos os tratamentos. Nas culturas com MOD não irradiada, houve uma fase de estabilidade aparente do 5º ao 27º dia de incubação (média = $7,34 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹, DP = $0,42 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹). E nas culturas com MOD irradiada ocorreu uma quebra na estabilidade da densidade bacteriana aos 15º dias de incubação ($17,27 \cdot 10^6$ células.mL⁻¹).

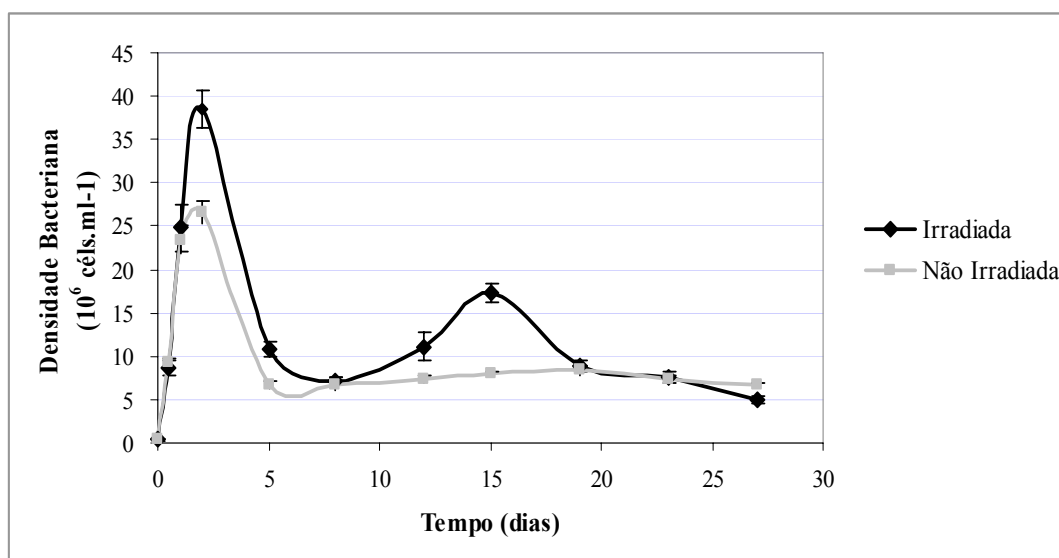


Figura 16. Densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

Foi constatado que as médias das densidades bacterianas de 4 momentos de amostragem foram significativamente diferentes (48 horas, $P = 0,0213$; 5 dias, $P = 0,0241$; 12 dias, $P = 0,0415$; 27 dias, $P = 0,0363$) e em 1 foi muito significativo (15 dias, $P = 0,0065$) (Tabela 8).

Tabela 8. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com a fração de MOD>30 kDa, irradiada e não irradiada, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com $n = 2$.

Tempo	Densidade Bacteriana (10^6 céls.mL ⁻¹)				Teste <i>t</i> de Student
	Irradiadas		Não-Irradiadas		
Dia	Média	DP	Média	DP	P
0	0,341	0,036	0,328	0,047	0,7855
0,5	8,660	0,829	9,331	0,433	0,4171
1	24,790	2,791	23,412	1,591	0,6058
2	38,596	2,179	26,581	1,262	0,0213*
5	10,824	0,783	6,791	0,447	0,0241*
8	7,164	0,516	6,783	0,692	0,5962
12	11,084	1,043	7,360	0,372	0,0415*
15	17,267	1,042	8,046	0,174	0,0065**
19	8,868	0,652	8,419	0,536	0,5304
23	7,574	0,610	7,267	0,457	0,6264
27	4,978	0,401	6,727	0,272	0,0363*

* significativo

** muito significativo

A Figura 17 exibe fotomicrografias da comunidade bacteriana nos dois momentos em que ocorrem os picos (maiores valores – 48 horas e 15 dias) de densidade e biomassa bacterianas nas culturas com MOD>30 kDa irradiada. É evidente a diferença na quantidade dos morfotipos bacterianos.

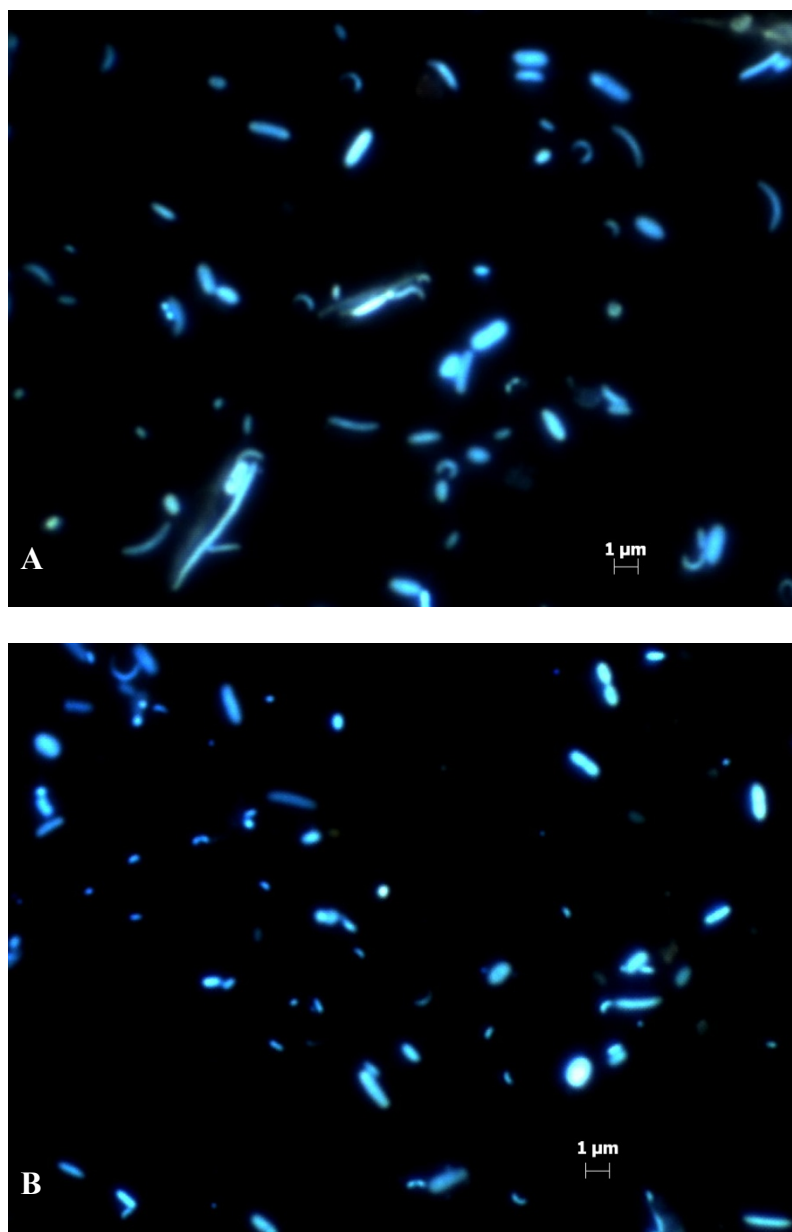


Figura 17. Fotomicrografias da comunidade bacteriana nos momentos de maiores valores de densidade e biomassa bacterianas nas culturas com MOD>30 kDa irradiada. **A** corresponde a 48 horas e **B** corresponde a 15 dias de incubação.

A Tabela 9 apresenta as frequências relativas de cada morfotipo para as culturas com a fração de MOD>30 kDa. Nas primeiras 48 horas, a MOD irradiada favoreceu o crescimento de bacilos, seguidos de cocobacilos e vibrios. No que se refere à fase de estabilização, as frequências relativas dos morfotipos também se mantiveram praticamente constantes, com predominância de bacilos e cocobacilos, para ambos os tratamentos. A maior frequência encontrada para filamentos foi observada nas culturas com fração de MOD>30 kDa não-irradiada (média de 6,69%).

Tabela 9. Frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas enriquecidas com a fração de MOD>30 kDa, irradiada (**Ir.**) e não irradiada (**Ñ Ir.**), ao longo dos 27 dias de cultivo.

% MORFOTIPOS BACTERIANOS												
Dias	Coco		Cocobacilo		Bacilo		Víbrio		Espirilo		Filamento	
	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.	Ir.	Ñ Ir.
0	13,53	20,78	54,02	32,44	24,47	33,74	7,23	11,49	0	0	0,76	1,56
0,5	0,78	4,66	29,29	17,47	58,78	68,28	8,72	9,03	0	0	0,81	0,56
1	4,44	3,07	29,53	19,86	54,55	56,06	10,00	18,61	0	1,03	1,48	1,37
2	2,62	4,59	20,24	27,17	59,37	48,09	17,05	17,59	0,37	1,52	0,35	1,04
5	7,62	5,58	22,44	27,38	58,71	54,10	8,89	11,05	0,69	0	1,64	1,88
8	10,76	7,49	26,88	28,73	53,76	52,40	8,06	10,12	0,54	0	0	1,26
12	13,01	15,83	31,59	34,21	44,83	43,48	10,28	4,91	0	0,52	0,29	1,04
15	8,95	13,04	37,77	34,22	42,65	43,75	9,67	7,01	0,60	0	0,35	1,98
19	11,89	13,93	41,37	26,08	39,36	51,68	6,19	5,72	0,39	0	0,80	2,59
23	12,65	14,01	41,27	36,27	38,56	37,57	4,18	4,98	0,37	0,48	2,98	6,69
27	10,88	9,72	31,89	31,65	48,65	51,71	5,49	3,94	1,19	0	1,91	2,98

A Figura 18 revela que em ambos os tratamentos, as culturas com a fração de MOD>30 kDa proporcionaram um acelerado aumento da biomassa bacteriana no início do período de incubação. Ainda, nas culturas com MOD irradiada foram encontrados valores máximos em 48 horas de incubação (média = 1.138,96 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$, DP = 174,61 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$) e nas culturas com MOD não irradiada valores máximos foram obtidos em 24 horas de incubação (média = 832,90 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$, DP = 83,16 $\mu\text{g C.mL}^{-1}$). Da mesma maneira como ocorreu nas demais frações, um rápido declínio nos valores de biomassa foram observados após o 2° e 1° dia, respectivamente. Além disso, do 5° ao 27° dia verificou-se uma fase de aparente estabilidade, com valores médios de 195,32 μg

C.mL⁻¹ e 204,72 µg C.mL⁻¹, e DP 18,34 µg C.mL⁻¹ e 16,90 µg C.mL⁻¹, para as culturas com MOD irradiada e não irradiada, respectivamente.

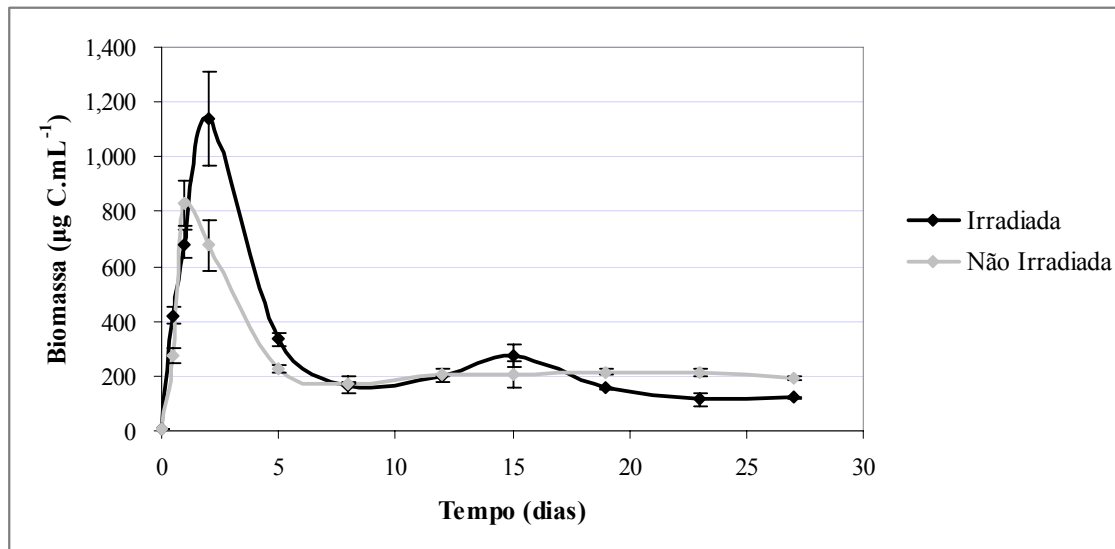


Figura 18. Biomassa bacteriana ($\mu\text{g C.mL}^{-1}$) em função do tempo (dias) para as culturas bacterianas enriquecidas com a fração MOD >30 kDa, irradiada e não irradiada. O valor médio entre as réplicas é representado pelas linhas. O desvio padrão é representado pelas barras verticais, com $n = 2$.

A Figura 19 apresenta fotomicrografias da comunidade bacteriana de cada uma das culturas bacterianas em seus respectivos momentos de máxima densidade celular. A composição morfológica e o tamanho médio das bactérias se mostraram bastante semelhantes.

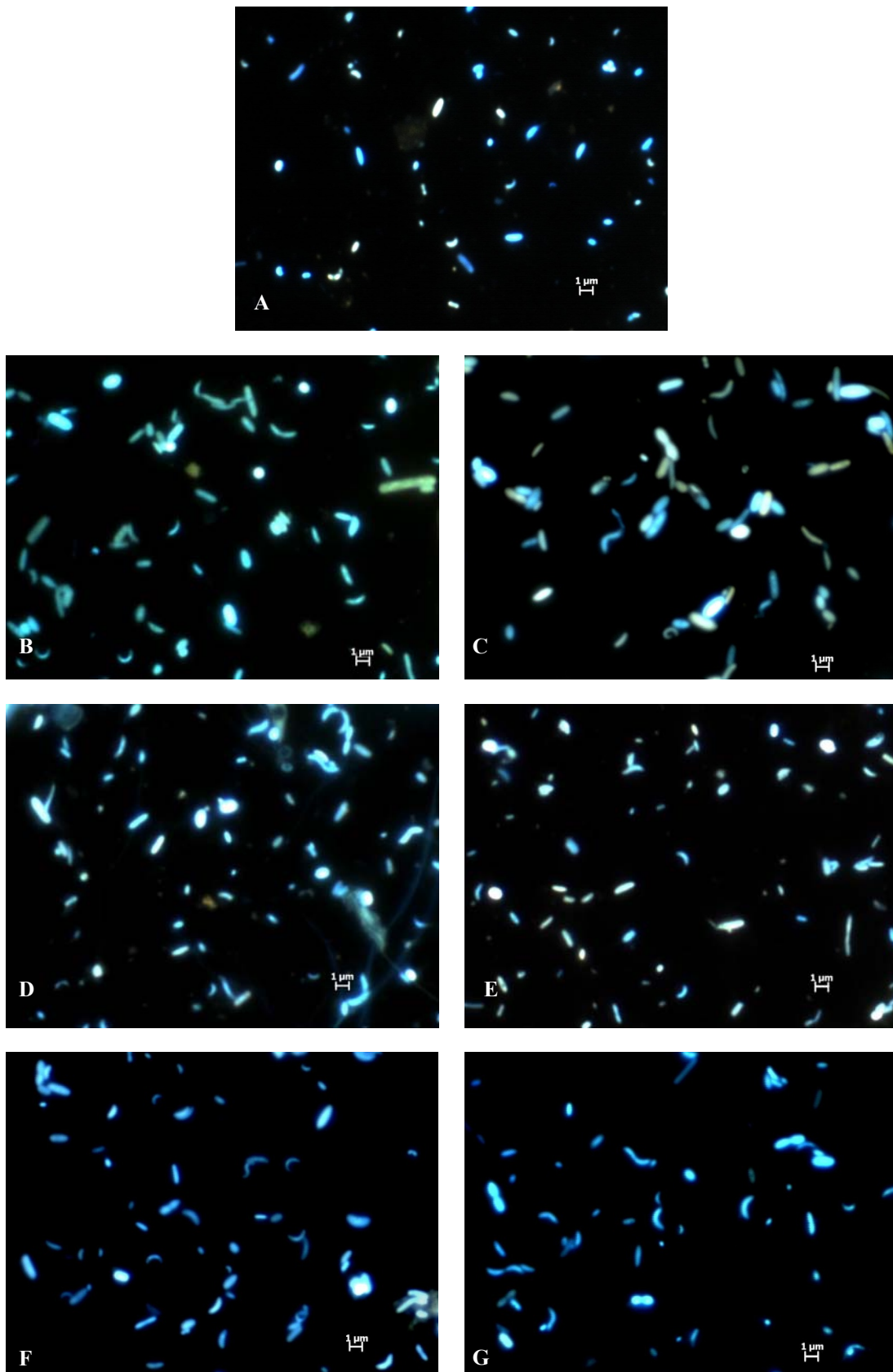


Figura 19. Fotomicrografias da comunidade bacteriana nos momentos de máxima densidade celular. **A** representa o controle, **B** e **C** representam as culturas com $MOD < 3$ kDa, **D** e **E** correspondem à $30 > MOD > 3$ kDa, **F** e **G** representam as culturas com $MOD > 30$ kDa, irradiadas e não irradiadas, respectivamente, para todas as frações.

4.2.5 Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey-Kramer – Comparação entre culturas com diferentes frações de MOD

Foram comparadas as médias das densidades bacterianas entre as culturas com diferentes frações irradiadas e as médias daquelas com diferentes frações não irradiadas. Para tanto, foi aplicada a análise de variância (ANOVA). Caso o valor de P confirmasse significância entre as três frações de MOD ($P < 0,005$), o teste de Tukey-Kramer seria aplicado para verificar entre quais pares de tratamentos a diferença se confirmava.

As análises de variância envolvendo as culturas com as frações irradiadas (Tabela 10) revelaram que houve diferenças em 4 dos 11 momentos de amostragem para os valores médios de densidade bacteriana. Aqui, 3 diferenças entre as frações irradiadas mostraram-se significativas e em 1 momento as diferenças foram muito significativas. O valor de P observado para as densidades no tempo 0 é devido a erros de metodologia, já que os inóculos são iguais quanto à origem e volume, para todas as culturas.

Tabela 10. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com as frações irradiadas de MOD, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2.

Tempo	<i>Densidade Bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹)</i>						ANOVA
	MO<3 kDa		30>MO>3 kDa		MO>30 kDa		
Dia	Média	DP	Média	DP	Média	DP	P
0	0,705	0,083	0,327	0,078	0,341	0,036	0,0193*
0,5	13,091	1,121	10,278	2,778	8,660	0,829	0,1849
1	28,487	2,825	23,985	3,991	24,790	2,791	0,4405
2	36,725	1,081	40,413	2,145	38,596	2,179	0,2879
5	10,065	0,692	6,958	0,565	10,824	0,783	0,0216*
8	7,266	0,770	7,694	0,151	7,164	0,516	0,6314
12	7,968	0,513	5,969	1,278	11,084	1,043	0,0321*
15	8,624	0,334	6,768	2,020	17,267	1,042	0,0081**
19	9,598	0,726	7,619	0,830	8,868	0,652	0,1567
23	10,022	0,488	8,640	2,679	7,574	0,610	0,4233
27	10,740	0,613	9,794	1,888	4,978	0,401	0,0302*

* significativo

** muito significativo

O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer mostrou que em 5 dias, as densidades bacterianas diferiram significativamente entre as culturas com fração de MOD<3 kDa e 30>MOD>3 kDa (q = 6,407 e P<0,05) e entre as culturas com fração 30>MOD>3 kDa e MOD>30 kDa (q = 7,972 e P<0,05). Para o tempo 12 dias, as médias das densidades foram significativamente diferentes apenas entre as culturas com MOD>30 kDa e 30>MOD>3 kDa. Aos 15 dias, foi verificada diferença significativa entre as culturas com MOD<3 kDa e MOD>30 kDa (q = 9,215 e P<0,05) e muito significativa entre as culturas com MOD>30 kDa e 30>MOD>3 kDa (q = 11,194 e P<0,01). Por fim, aos 27 dias, verificou-se que os valores médios das densidades diferiram significativamente entre as culturas com MOD<3 kDa e MOD>30 kDa (q = 6,969 e P<0,05).

Por sua vez, as análises de variância envolvendo as culturas com as frações não irradiadas (Tabela 11) revelaram que em 1 dos 11 momentos de amostragem os valores médios da densidade bacteriana se mostraram significativamente diferentes e também em 1 momento as diferenças foram extremamente significativas.

Tabela 11. Média e desvio-padrão (DP) da densidade bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹) nas culturas enriquecidas com as frações não irradiadas de MOD, ao longo dos 27 dias de cultivo e respectivos valores de P, com n = 2.

Tempo	<i>Densidade Bacteriana (10^6 céls.mL⁻¹)</i>						ANOVA
	MO<3 kDa		30>MO>3 kDa		MO>30 kDa		P
Dia	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
0	0,469	0,036	0,391	0,062	0,328	0,047	0,1396
0,5	21,080	0,981	9,144	0,142	9,331	0,433	0,0005***
1	32,812	2,449	24,533	8,012	23,412	1,591	0,2608
2	25,538	0,735	32,442	1,187	26,581	1,262	0,0147*
5	7,434	1,408	6,011	0,083	6,791	0,447	0,3736
8	7,166	0,605	6,188	1,277	6,783	0,692	0,6086
12	9,173	0,958	5,527	1,704	7,360	0,372	0,1100
15	7,152	0,472	7,287	1,827	8,046	0,174	0,7081
19	5,877	0,406	6,351	2,415	8,419	0,536	0,3144
23	6,451	0,337	8,139	0,936	7,267	0,457	0,1610
27	7,940	0,447	7,601	1,472	6,727	0,272	0,4753

* significativo

*** extremamente significativo

Em 12 horas, as diferenças se confirmaram extremas entre as culturas com MOD<3 kDa e 30>MOD>3 kDa ($q = 27,030$ e $P < 0,001$) e MOD<3 kDa e MOD>30 kDa ($q = 26,606$ e $P < 0,001$). Já em 48 horas, as análises comparativas revelaram diferenças significativas entre MOD<3 kDa e 30>MOD>3 kDa ($q = 7,628$ e $P < 0,05$) bem como entre as culturas com 30>MOD>3 kDa e MOD>30 kDa ($q = 8,986$ e $P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Justificativa para obtenção da MOD da fase estacionária

As frações de MOD foram obtidas quando as culturas atingiram a fase estacionária, caracterizada pela estabilidade ou decréscimo na concentração do número de células, em concomitância com o decréscimo da concentração de clorofila *a*. Nessa fase, é grande a possibilidade de ocorrência de morte celular de parte das células de *M. aeruginosa* as quais, ao se desintegrarem, liberam MOD para o ambiente. Por outro lado, as células que permanecem vivas, mas sem entrar em citocinese, aumentam a liberação de MOD para o meio, por excreção. A opção por esta fase do ciclo biológico justifica-se na maior fidelidade do experimento com o que ocorre naturalmente em *blooms* de *M. aeruginosa* expostos a altas intensidades de luz na superfície dos reservatórios, onde predomina. Sendo assim, o experimento de biodisponibilidade de carbono orgânico dissolvido das frações de MOD irradiada e não irradiada buscou descrever a atividade metabólica dos microrganismos heterotróficos da comunidade do reservatório de Barra Bonita envolvidos no processo de degradação a partir da MOD produzida por *M. aeruginosa* em *blooms*.

5.2 Biodisponibilidade da MOD à comunidade bacteriana

Todas as três frações de MOD investigadas no presente estudo apresentaram-se altamente biodisponíveis à comunidade bacteriana, fato revelado na rápida degradação inicial do COD (48 horas) bem como nos incrementos iniciais da densidade e da biomassa bacteriana. As culturas com fração de MOD<3 kDa e MOD>30 kDa revelaram-se mais vulneráveis à radiação UV, confirmando-se nas numerosas diferenças encontradas para os valores de densidade bacteriana ao longo do período de incubação (Teste *t* de Student – Tabela 4 e 7), principalmente no início da degradação da MOD<3 kDa irradiada (12 e 48 horas) e em 48 horas para a MOD>30 kDa.

Os valores iniciais de COD mostraram-se diferentes em cada uma das frações, visto que foram mantidas as concentrações originais de COD que cada uma das diferentes frações de MOD que representava no momento anterior ao fracionamento. A maior parte da MOD liberada pela *M. aeruginosa* concentrou-se abaixo de 3 kDa. Resultados similares foram encontrados por Aoki *et al.* (2008), em experimentos realizados com cepas de *M. aeruginosa* obtidas em um reservatório eutrofizado no Japão.

Aliando-se a concentração inicial de COD aos valores máximos de densidade e biomassa bacterianas, é possível inferir que a energia disponível para o crescimento bacteriano liberada na degradação dos compostos das frações analisadas aumenta na seguinte ordem $30 > \text{MOD} > 3$ kDa, $\text{MOD} > 30$ kDa e $\text{MOD} < 3$ kDa. Estes resultados podem ser legitimados pela teoria proposta por Amon & Benner (1994), o *modelo do contínuo tamanho-reatividade* o qual descreve que moléculas de alta massa molecular são mais intensamente degradadas que as moléculas de baixa massa molecular devido à maior biorreatividade. Esta situação pode ser justificada pela presença de numerosos sítios reativos em moléculas maiores, estes reduzidos em moléculas pequenas.

É importante salientar que o volume de água do reservatório utilizado para preparação dos controles representa o dobro daquele utilizado na composição das culturas enriquecidas com uma das frações da MOD liberada pela *M. aeruginosa*. Como a concentração média de COD inicial nos controles é de $4,74 \text{ mgC.L}^{-1}$, às culturas enriquecidas foi adicionado $2,37 \text{ mgC.L}^{-1}$ de COD correspondente ao volume de água do reservatório. Assim, a interferência do COD advindo da água do reservatório de Barra Bonita corresponde a uma parcela relativamente pequena dos valores iniciais de COD observados para as culturas bacterianas enriquecidas (13,25 e 14,79% para as culturas com $\text{MOD} < 3$ kDa, 29,96 e 31,06% para as culturas com $30 > \text{MOD} > 3$ kDa; 27,6

e 27,33% para as culturas com MOD>30 kDa, irradiadas e não irradiadas respectivamente).

Os resultados obtidos na presente investigação confirmaram a expectativa de que as densidades bacterianas atingiriam valores máximos nos primeiros momentos (horas ou dias) de incubação. Chróst *et al.* (1989) encontrou resultados similares em estudos envolvendo a produção de matéria orgânica fitoplanctônica e sua simultânea decomposição bacteriana em um lago naturalmente eutrófico, durante um *bloom* de algas no início da primavera. Estes autores também observaram que quando o *bloom* começou a declinar, a biomassa bacteriana aumentou rapidamente e, no final da floração, as bactérias contribuíram de 48 a 70% na biomassa total do plâncton (até 200µm). Um padrão semelhante de degradação foi observado neste trabalho, o qual se delineia por uma fase inicial de rápida degradação (intenso crescimento bacteriano), seguida de uma fase de aparente estabilidade (densidades bacterianas constantes).

Apesar de ter sido verificado um mesmo padrão de degradação do COD para as culturas com fração de MOD<3 kDa irradiada e não irradiada – uma fase rápida de degradação nos primeiros momentos da incubação (de 24 a 48 horas) e uma fase posterior lenta e relativamente estável – observa-se uma diferença temporal vista tanto para densidade como para biomassa bacterianas máximas nas culturas com MOD<3 kDa irradiada (48 horas) e não irradiada (24 horas) a qual reflete a maior eficiência na assimilação do COD presente na fração não irradiada. Tal acontecimento pode ser justificado pelo fato de que, ao sofrer influência da radiação UV, a MOD de baixa massa molecular e diageneticamente jovem, p.e. exudatos algais, pode passar por reações de condensação e humificação, em que radicais livres de ácidos graxos da MOD reagem entre si formando polímeros menos propensos à pronta degradação bacteriana, que podem ser tanto substâncias lábeis como húmicas (Harvey *et al.*, 1983). Além disso,

é provável que tenha ocorrido o fenômeno da fotooxidação no qual a radiação UV degrada os compostos orgânicos a subprodutos inorgânicos como dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, monóxido de carbono, entre outros. Este evento foi verificado por Bertilsson & Tranvik (2000) em experimentos com amostras de MOD provenientes de 32 lagos temperados na Suíça, expostas a radiação UV-A+B durante um período de 12 horas, o mesmo tempo utilizado no presente estudo.

É possível notar também que nas primeiras 48 horas de incubação o consumo bacteriano da fração de MOD < 3 kDa não irradiada foi mais intenso que o consumo da mesma fração irradiada, o que confere um crescimento inicial máximo mais acelerado (densidade bacteriana – Tabela 4). Estes resultados condizem com aqueles observados por Tranvik & Kokalj (1998), Tranvik & Bertilsson (2001) e Obernosterer *et al.* (2001) em experimentos de degradação do COD de diferentes fontes, incluindo lagos temperados e oceanos. Segundo estes autores, após sofrer ação da radiação UV, a MOD produzida pelo fitoplâncton é menos eficientemente consumida pelo bacterioplâncton. Este fato é justificado pela ausência de estruturas que absorvam a radiação UV na MOD produzida pelas algas (p.e. anéis aromáticos). Essas estruturas são amplamente encontradas em moléculas de ácidos fúlvicos e húmicos característicos da maior parte da MOD refratária (McKnight & Aiken, 1998). Além disso, sabe-se que estes ácidos tornam-se mais biodisponíveis às bactérias após serem expostos à luz UV (Bertilsson & Tranvik, 1998; Anesio *et al.*, 2005).

Por outro lado, valores máximos de densidade e biomassa bacteriana para as culturas com MOD < 3 kDa irradiada mostraram que o *pool* de MOD fitoplanctônica de baixa massa molecular tem sua biodisponibilidade aumentada quando submetido à ação da radiação UV, apesar do consumo ser ligeiramente retardado. Este padrão de utilização da MOD também foi relatado em pesquisa de Rosenstock *et al.* (2005) em

que substâncias não-húmicas de baixo peso molecular de diferentes regiões oceânicas sustentaram um maior crescimento bacteriano e, assim, tiveram sua biodisponibilidade aumentada após serem submetidas à radiação UV.

O consumo bacteriano ao final do período de incubação mostrou-se bastante distinto entre as culturas com MOD<3 kDa irradiada e não irradiada. Tal fato também pode ser associado à degradação de compostos refratários presentes nas culturas bacterianas irradiadas e que não foram consumidos nos primeiros momentos da incubação. Assim, a ação da radiação UV facilitou a degradação destes compostos recalcitrantes presentes na MOD<3 kDa irradiada, também confirmado por um aumento na densidade bacteriana nestas culturas (Moran & Zepp, 1997).

Para as culturas com a fração 30>MOD>3 kDa, as diferenças observadas para as degradações em ambos os tratamentos permitem concluir que os compostos constituintes desta fração da MOD sofrem ligeiras alterações quando sob influência da radiação UV o que confere um aumento da biodisponibilidade à fração irradiada. É possível inferir que tais compostos sofrem moderada ação da luz ultravioleta (McKnight & Aiken, 1998) o que revela apenas um único momento de diferença significativa entre os valores máximos de densidade bacteriana (48 horas - Tabela 5). Em experimentos envolvendo ambientes de água salgada, Obernosterer *et al.* (2001) relata que, após sofrer ação da radiação UV, a MOD<20 kDa proveniente do oceano apresentou um sensível incremento em sua disponibilidade ao bacterioplâncton, fato que corrobora os resultados aqui apresentados.

Já o consumo nas culturas bacterianas cujo recurso energético compreendeu a fração de MOD>30 kDa revelou que a parte irradiada foi mais intensamente degradada nos primeiros 12 dias. Este comportamento da fração de MOD>30 kDa foi observado para substâncias orgânicas de alta massa molecular as quais são parcialmente oxidadas,

dando origem a uma ampla variedade de compostos de menor peso molecular, dentre os quais se encontram substratos mais acessíveis ao bacterioplâncton (Kieber *et al.*, 1989; Moran & Zepp, 1997). Também foram encontradas as maiores diferenças entre as densidades bacterianas máximas das culturas com MOD irradiada e com MOD não irradiada para esta fração ($38,60.10^6$ e $26,58.10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente) o que confirma mais uma vez o aumento na biodisponibilidade desta fração após tratamento com radiação UV.

5.3 Frequência relativa dos morfotipos celulares bacterianos e sucessão bacteriana

A pequena variação inicial na frequência relativa dos morfotipos bacterianos nas culturas controle pode ser justificada pela limitação do carbono orgânico. Já o crescimento bacteriano pode ser creditado à estabilidade das condições de cultivo e pelo enriquecimento com nutrientes inorgânicos do meio ASM-1 adicionado. Após o esgotamento das fontes de nutrientes na cultura controle, sucedeu um período de estabilidade no crescimento bem como na frequência relativa dos morfotipos bacterianos.

É evidente a predominância do morfotipo cocobacilo seguido de bacilo, ambos característicos do tempo inicial (0 hora) em todos os tratamentos. Isto indica que no reservatório de Barra Bonita a comunidade bacteriana típica da estação seca (inverno) é caracterizada pela preponderância deste tipo celular bacteriano. Em experimentos com amostras ambientais do mesmo reservatório, Racy (2004) também observou o mesmo padrão de distribuição da frequência dos morfotipos bacterianos para o mês de junho de 2003.

Quanto à distribuição morfotípica das bactérias associadas às frações de MOD produzidas por *M. aeruginosa*, não houve diferenças significativas entre as frações,

tampouco entre os tratamentos, irradiado e não irradiado. Em todas as culturas observou-se a predominância de bacilos, seguidos de cocobacilos e vibrios na fase inicial da degradação (24 e 48 horas de incubação – Figura 19) o que indica uma tendência à seleção preferencial destes morfotipos bacterianos (Pernthaler *et al.*, 1998, Worm *et al.*, 2001). Tal fato indica que estes tipos bacterianos podem ser especialistas na degradação das moléculas lábeis da MOD de *M. aeruginosa*. Em estudo realizado no mesmo reservatório, Racy (2004) também observou predomínio dos cocobacilos e bacilos em amostras coletadas durante um *bloom* de *M. aeruginosa*.

No que se refere à fase de estabilidade da comunidade bacteriana, a aparente homogeneidade entre as proporções dos morfotipos bem como a estabilidade da densidade bacteriana nas culturas com distintas frações (irradiadas e não irradiadas) condiz com a proposição de uma fase de lenta degradação dos compostos mais difíceis de serem mineralizados (substâncias refratárias) em todas as culturas.

Aos 15 dias de incubação, as culturas com fração de MOD > 30 kDa irradiada apresentaram um comportamento atípico às demais culturas. Nesse momento a comunidade bacteriana apresentou um segundo pico na densidade de células bacterianas (Figura 16), bem como diferenças perante as porcentagens de morfotipos bacterianos na comunidade (Tabela 9). Esse fato pode ser interpretado como um evento de sucessão na comunidade bacteriana ocasionado pela degradação inicial dos compostos mais lábeis e posterior seleção de outras bactérias metabolicamente capazes de degradar alguns compostos mais recalcitrantes (Riemann *et al.*, 2000).

Estas mudanças na abundância relativa dos morfotipos bacterianos ao longo do período de incubação (Figura 17) sugerem um evento de sucessão durante as distintas fases de degradação da MOD (Pernthaler *et al.*, 1998). Tais bactérias possivelmente apresentam capacidades metabólicas particulares que as tornam especialistas na

degradação de diferentes compostos orgânicos (Martinez *et al.*, 1996; Riemann *et al.*, 2000) e, assim, promovem significativas transformações biogeoquímicas na MOD advinda dos *blooms* algais.

5.4 Diferenças entre as frações de MOD

Considerando a heterogeneidade da MOD quanto à massa molecular, e consequente degradação bacteriana (Amon & Benner, 1996), bem como os valores máximos de densidade bacteriana, a assimilação do carbono orgânico foi mais eficiente após a irradiação das frações devido às alterações ocorridas na MOD pela ação da radiação UV (Lindell *et al.*, 1995; Rosenstock *et al.*, 2005). É necessário salientar que, apesar das culturas com fração de MOD < 3 kDa (tanto irradiada como não irradiada) terem apresentado as maiores concentrações iniciais de COD, os maiores valores de densidade bacteriana alcançados foram bastante parecidos entre as culturas com MOD irradiada e não irradiada.

Caso sejam consideradas as concentrações iniciais de COD, as maiores eficiências de conversão de MOD em biomassa bacteriana foram observadas para as culturas com MOD > 30 kDa e para aquelas com 30 > MOD > 3 kDa, ambas irradiadas. Estes resultados podem ser corroborados pelo *modelo do contínuo tamanho-reatividade* (Amon & Benner, 1994, 1996), o qual sugere que as moléculas de alta massa molecular são mais biorreativas que as moléculas de baixa massa molecular.

Além disso, as diferenças nos valores de densidade e biomassa bacterianas podem ser justificadas pelas diferenças estabelecidas nas condições de crescimento entre as frações de MOD adicionados como substrato às culturas (Pernthaler *et al.*, 1998, Worm *et al.*, 2001), bem como da influência da radiação UV sobre o *pool* de MOD (Harvey *et al.*, 1983; Naganuma *et al.*, 1996; Gobler *et al.*, 1997)

6. CONCLUSÃO

De um modo geral, a radiação UV-A+B aumentou a biodisponibilidade dos compostos de alta, média e baixa massa molecular presentes na MOD excretada por células na fase estacionária do crescimento de *M. aeruginosa*, porém o processo de degradação pode se tornar um pouco retardado (horas ou dias). Este resultado leva a crer que a radiação incidente na superfície do reservatório de Barra Bonita aumenta a biodisponibilidade da MOD autóctone liberada por *blooms* de *M. aeruginosa* e, com isso, facilita a ocorrência do *microbial loop* (Azam *et al.*, 1983) no reservatório em questão.

A dinâmica global do consumo de MOD relatada no presente estudo indica que a maior parte da MO produzida pela *M. aeruginosa* durante um *bloom* é rapidamente degradada pela comunidade bacteriana nas primeiras 48 horas de incubação. Esta constatação constitui um claro indicativo de que a maior parte do carbono orgânico dissolvido liberado no reservatório de Barra Bonita em consequência de um *bloom* desta cianobactéria é mineralizado relativamente rápido, em um período de tempo bem inferior ao menor tempo de residência das águas no reservatório (em média 37 dias no verão e 137 dias no inverno). Tal fato indica que a MOD de *M. aeruginosa* é produzida e consumida pelo bacterioplâncton no local, teoricamente sem exportação. Quando incorporada na forma de biomassa bacteriana, a MOD estará disponível ao consumo (predação das bactérias) por organismos de níveis tróficos superiores (nanoflagelados heterotróficos e zooplâncton).

O fato das frequências relativas dos morfotipos bacterianos presentes nos controles serem semelhantes às aquelas ocorridas nas três frações de MOD estudadas seria um indicativo de ratificação da tese inicial a qual propôs que haveria ocorrência de constantes e especializados consórcios bacterianos capazes de mineralizar prontamente

a MOD liberada pela cianobactéria. Assim, os constantes *blooms*, ou a sempre alta biomassa de *M. aeruginosa* no reservatório de Barra Bonita ao longo do ano, fazem com que tais consórcios bacterianos especializados na mineralização da MOD liberada pela cianobactéria estejam sempre disponíveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOKI, S., OHARA, S., KIMURA, K., MIZUGUCHI, H., FUSE, Y. & YAMADA, E. 2008. Characterization of Dissolved Organic Matter Released from *Microcystis aeruginosa*. **Analytical Sciences**. 24:389-394
- AMON, RMW. & BENNER, R. 1994. Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. **Nature**. 369:549-552
- AMON, RMW. & BENNER, R. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**. 41:41-51
- AMADO, AM., FARJALLA, VF., ESTEVES, FA., BOZELLI, RL., ROLAND, F. & ENRICH-PRAST, A. 2006. Complementary pathways of dissolved organic carbon removal pathways in clear-water Amazonian ecosystems: photochemical degradation and bacterial uptake. **FEMS Microbiology Ecology**. 56:8-17
- ANESIO, AM., GRANÉLI, W., AIKEN, GR., KIEBER, DJ. & MOPPER, K. 2005. Effect of humic substance photodegradation on bacterial growth and respiration in lake water. **Applied and Environmental Microbiology**. 71:6267-6275
- ARNOSTI, C., REPETA, DJ. & BLOUGH, NV. 1994. Rapid bacterial degradation of polysaccharides in anoxic marine systems. **Geochimica et Cosmochimica Acta** 58:2639-2652
- AZAM, F. & CHO, BC. 1987. Bacterial utilization of organic matter in the sea. In: FLETCHER, M., GRAY TRG. e JONES, JG. (Eds). *Ecology of Microbial Communities*. Cambridge University Press. pp. 261-281.
- AZAM, F., FENCHEL, T., FIELD, JG., GRAY, JS., MEYER-REIL, LA. & THINGSTAD, F. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. **Marine Ecology Progress Series**. 10:257-263
- BAGATINI, IL. 2008. Associação de Bactérias à Cápsula de *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) em cultura. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 70 p.
- BAINES, SB. & PACE, ML. 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. **Limnology and Oceanography**. 36: 1078-90
- BENNER, R., PAKULSKI, JD., MCCARTHY, M., HEDGES, JI. & HATCHER, PG. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. **Science**. 255: 1561-1564
- BENNER, R. & BIDDANDA, B. 1998. Photochemical transformation of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. **Limnology and Oceanography**. 43:1373-1378

- BERTILSSON, S. & TRANVIK, L.J. 1998. Photochemically produced carboxylic acids as substrates for freshwater bacterioplankton. **Limnology and Oceanography**. 43(5): 885–895
- BERTILSSON, S. & TRANVIK, L.J. 2000. Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. **Limnology and Oceanography**. 45:753-762
- BIDDANDA, B. & BENNER, R. 1997. Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. **Limnology and Oceanography**. 42: 306-318
- BITTAR, TB. (em preparação). Efeito da radiação solar sobre a biodisponibilidade da matéria orgânica dissolvida produzida por *Microcystis aeruginosa*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- BITTAR, TB. 2005. Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de três espécies de microalgas isoladas do reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê/SP). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 87 p.
- CALIJURI, MC. & DOS SANTOS, ACA. 2001. Temporal variations in phytoplankton primary production in a tropical reservoir (Barra Bonita, SP – Brasil). **Hidrobiologia**, 445:11-26
- CALIJURI, MC. & TUNDISI, JG. 1990. Limnologia comparada das represas do Lobo (Broa) e Barra Bonita- Estado de São Paulo: mecanismos de funcionamento e bases para o gerenciamento. **Ver. Brasileira de Biologia**, 50: 893-913
- CARLSON, CA., DUCKLOW, HW. & MICHAELS, AF. 1994. Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. **Nature**. 371:405-408
- CHOI, K., UEKI, M., IMAI, A., KIM, B. & KAWABATA, Z. 2004. Photoalteration of dissolved organic matter (DOM) released from *Microcystis aeruginosa* in different growth phases: DOM-fraction distribution and biodegradability. **Archiv für Hydrobiologie**. 159:271-286
- COOPER, WJ., SHAO, C., LEAN, DRS., GORDON, AS. & SCULLY, FE. 1994. Factors affecting the distribution of H₂O₂ in surface waters,. *In* Environmental chemistry of lakes and reservoirs. **Advances in Chemistry Series**. 237:393-422
- CHRÓST, RJ., MÜNSTER, U., RAI, H., ALBRECHT, D., WITZEL, PK. & OVERBECK, J. 1989. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. **Journal of Plankton Research**. 11:223-242
- DELLAMANO-OLIVEIRA, MJ., COLOMBO-CORBI, V. & VIEIRA, AAH. 2007. Carboidratos dissolvidos do reservatório de Barra Bonita (Estado de São Paulo, Brasil) e sua relação com as algas fitoplanctônicas abundantes. **Biota Neotropica** 7:59-66

- DUCKLOW, HW. & CARLSON, CA. 1992. Oceanic bacterial production. **Advances in Microbial Ecology**. 12:113-181
- EILER, A. & BERTILSSON, S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. **Environmental Microbiology**. 6:1228-1243
- EMBRAPA. 1999. **EMBRAPA Solos: Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA, 412p.
- EMBRAPA. 2002. **Brasil Visto do Espaço**. Disponível em: <http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br>. Acessado em 29/06/2009
- FUHRMAN, JA. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. **Marine Biology**, 66:109- 120
- GOBLER, CJ., HUTCHINS, DA., FISHER, NS., COSPER, EM. & SAÑUDO-WILHELMY, SA. 1997. Release and bioavailability of C, N, P, Se and Fe following viral lysis of a marine chrysophyte. **Limnology and Oceanography**. 42:1492-1504
- GORHAM, PR., MCLACHLAN, J., HAMMER, UT. & KIM, WK. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae* (Lingb.). **Verh. Internat. Verein. Limnol.** 15: 769-780
- GRANELI, W., LINDELL, M. & TRANVIK, L. 1996. Photo-oxidative production of dissolved inorganic carbon in lakes of different humic content. **Limnology and Oceanography** 41:698–706
- HARVEY, GA., BORAN, DA., CHESAL, LA. & TOKAR, JM. 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. **Marine Chemistry**. 12:119-132
- HUANG, WJ., LAI, CH. & CHENG, YL. 2007. Evaluation of extracellular products and mutagenicity in cyanobacteria cultures separated from a eutrophic reservoir. **Science of the Total Environment**. 377:214–223
- KAPLAN, LA. & BOTT, TL. 1983. Microbial heterotrophic utilization of dissolved organic matter in a piedmont stream. **Freshwater Biology**. 13:363–77
- KAPUSTINA, LL. 2006. Experimental Study of *Microcystis*-Associated and Free-Living Bacteria. **Microbiology**. 75(5):696–701
- KIEBER, DJ., DANIEL, JM. & MOPPER, K. 1989. Photochemical source of biological substrates in sea water: implications for carbon cycling. **Nature**. 341:637–639
- KIEBER, RJ., HYDRO, LJ. & SEATON, PJ. 1997. Photooxidation of triglycerides and fatty acids in seawater: implication toward the formation of marine humic substances. **Limnology and Oceanography**. 42:1454-1462
- LAMPERT, W. & SOMMER, U. 1997. **Limnoecology**. Oxford University Press, Inc. pp

96-97.

- LANCELOT, C. 1984. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the southern Bight of the North sea. **Estuarine Coastal Shelf Science**. 18: 65-77
- LINDELL, MJ., GRANÉLI, W. & TRANVIK, LJ. 1995. Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**. 40:195-199
- LORENZEN, CJ. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. **Limnology and Oceanography**. 12:343-346
- MADRONICH, S. 1992. Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. **Geophysical Research Letters**. 19: 37-40
- MARKER, AFH., NUSCH, EA., RAI, H. & RIEMANN, B. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. **Arch Hydrobiol Beih**. 14:91-106
- MARTINEZ, J., SMITH, DC., STEWARD, GF. & AZAM, F., 1996. Variability in ectoenzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. **Aquatic Microbial Ecology**. 10:223–230
- MATSUMURA-TUNDISI, T. & TUNDISI, JG. 2005. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). **Hydrobiologia**. 542:367-378
- MCKNIGHT, DM. & AIKEN, GR. 1998. Sources and age of aquatic humus. *In: Ecological Studies: Aquatic humic substances*, vol. 133. ed. Hessen, D. O. & Tranvik, L. J., pp. 9-39. Springer-Verlag, Berlin
- MEYER, JL., EDWARDS, RT. & RISLEY, R. 1987. Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. **Microbial Ecology**. 13:13–29
- MOPPER, K., ZHOU, X., KIEBER, RJ., KIEBER, DJ., SIKORSKI, RJ. & JONES, RD. 1991. Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. **Nature**. 353: 60–62
- MORAN, MA. & ZEPP, RG. 1997. Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. **Limnology and Oceanography**. 42:1307-1316
- MÜNSTER, U. & CHRÓST, RJ. 1990. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter, p. 8-46. *In* Overbeck, J. & Chróst, RJ. reds., **Aquatic Microbial Ecology: Biochemical and Molecular Approaches**. Springer
- MYKLESTAD, S.M. 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the Total Environment*. 165: 155-164

- NAGANUMA, T., KONISHI, S., INOUE, T., NAKANE, T. & SUKIZAKI, S. 1996. Photodegradation or photoalteration? Microbial assay of the effect of UV-B on dissolved organic matter. **Marine Ecology Progress Series**. 135:309-310
- NAGATA, T. & WATANABE, Y. 1990. Carbon-to-volume and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. 56:1303-1309
- NUSCH, EA. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Arch Hydrobiol Beih.** 14:14-36
- OBERNOSTERER, J., SEMPÉRÉ, R. & HERNDL, GJ. 2001. Ultraviolet radiation induces reversal of the bioavailability of DOM to marine bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**. 24: 61–68
- OGAWA, H. & OGURA, N. 1992. Comparison of two methods for measuring dissolved organic carbon in sea water. **Nature**. 356: 696–698
- OPSAHL, SP. & ZEPP, RG. 2001. Photochemically-induced alteration of stable carbon isotope ratios ($\delta C-13$) in terrigenous dissolved organic carbon. **Geophysical Research Letters**. 28:2417-2420
- PAUSZ, C. & HERNDL, GJ. 1999. Role of ultraviolet radiation on phytoplankton extracellular release and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**. 18:85-93
- PERNTHALER, J., GLÖCKNER, FO., UNTERHOLZNER, S., ALFREIDER, A., PSENNER, R. & AMANN, R. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archaea* in a high mountain lake. **Applied and Environmental Microbiology**. 64: 4299-4306
- PORTER, KG. & FEIG, TS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnology and Oceanography**. 25:943-948
- RACY, F. 2004. Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos das comunidades bacterianas em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP 63p.
- REYNOLDS, CS., JAWORSKI, GHM., CMIECH, HA. & LEEDALE, GF. 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kütz. Emend. Elenkin. **Physiological Transactions of the Royal Society of London**, Series B. 293:419-477
- RIEMANN, L., STEWARD, GF. & AZAM, F. 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. **Applied and Environmental Microbiology**. 66:578–587
- ROSENSTOCK, B., ZWISLER, W. & SIMON, M. 2005. Bacterial consumption of humic

- and non-humic low and high molecular weight DOM and the effect of solar irradiation on the turnover of labile DOM in the southern ocean. **Microbial Ecology**. 50:90–101
- SAUNDERS, GW. 1976. Decomposition in freshwater. *In*: Anderson, JM. & MacFayden A. (eds.), *The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes*. 17o Symposium of British Ecological Society, Blackwell Scientific Publications, New York: 341–373
- SCULLY, NM., MCQUEEN, DJ. & LEAN, DRS. 1996. Hydrogen peroxide formation: The interaction of ultraviolet radiation and dissolved organic carbon in lake waters along a 43–758N gradient. **Limnology and Oceanography**. 41(3): 540–548
- SØNDERGAARD, M. & MIDDELBOE, MA. 1995. A cross-system analysis of labile dissolved organic carbon. **Marine Ecology Progress Series**. 118:283-294
- STROME, DJ. & MILLER, MC. 1978. Photolytic changes in dissolved humic substances. **Verh. Internat. Verein. Limnol.** 20:1248-1254
- SUHETT, AL., AMADO, AM., BOZELLI, RL., ESTEVES, FA. & FARJALLA, VF. 2006. O papel da fotodegradação do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. 10(2):186-204
- SUN, J. & LIU, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. **Journal of Plankton Research**. 25:1331-1346
- TORTORA, GJ., FUNKE, BR. & CASE, CL. 2003 *Microbiologia*. 6ª ed. 827pp. Edit. Artmed Editora S.A. Porto Alegre – Brasil
- TRANVIK, LJ. 1998. Degradation of dissolved organic matter in humic waters by bacteria, *In*: Hessen, DO. & Tranvik, LJ. (eds.). *Aquatic Humic Substances – Ecology and Biogeochemistry*. Springer, Berlin, pp. 259-283
- TRANVIK, LJ. & BERTILSSON, S. 2001. Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. **Ecology Letters**. 4:458-463
- TRANVIK, LJ. & KOKALJ, S. 1998. Decreased biodegradability of algal DOC due to interactive effects of UV radiation and humic matter. **Aquatic Microbial Ecology**. 14:301-307
- TUNDISI, JG. & MATSUMURA-TUNDISI, T. 1990. Limnology and eutrophication of Barra Bonita Reservoir, São Paulo State, Southern Brazil. **Arch. Hydrobiol. Beih. (Ergebn. Limnol.)**. 33:661-676
- VÄHÄTALO, H., AURIOLA, S. & LAPINJOKI, S. 1999. High performance liquid chromatography-mass spectrometry of an osteocalcin derivative. **Journal of Chromatography**. 846:49-57
- VALENTINE, RL. & ZEPP, RG. 1993. Formation of carbon monoxide from the photodegradation of terrestrial dissolved organic carbon in natural waters.

Environmental Science and Technology. 27: 409–412

WETZEL, RG. 1972. The role of carbon in hard-water marl lakes. *In*: Likens, GE. (Ed.). *Nutrients and eutrophication: the limiting-nutrient controversy*. Spec. Symp., Amer. Soc. **Limnology and Oceanography**. 1:84-97

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

WETZEL, RG., HATCHER, PG. & BIANCHI, TS. 1995. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism, **Limnology and Oceanography**. 40:1369–1380

WMO. 1995. *Scientific assessment of ozone depletion: 1994*. World Meteorological Organization, Global Ozone Research and Monitoring Project, Relatório n° 37, Geneva

WORM, J. & SØNDERGAARD, M. 1998. Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). **Aquatic Microbial Ecology**. 14:19-28

WORM, J., GUSTAVSON, K., GARDE, K., BORCH, NH. & SØNDERGAARD, M. 2001. Functional similarity of attached and free-living bacteria during freshwater phytoplankton blooms. **Aquatic Microbial Ecology**. 25:103–111

ZAR, JH. 1999 *Biostatistical Analysis*. 4^a ed. 663pp. Edit. Prentice Hall. New Jersey – USA

ZARITSKY, A. 1975. On dimensional determination of rod-shaped bacteria. *J. Theor. Biol.* 54 :243-248 *apud* RACY, F. 2004. Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos das comunidades bacterianas em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP. 63p.

ZEPP, RG., CALLAGHAN, TV. & ERICKSON, DJ. 1995. Effects of increased solar ultraviolet radiation on biogeochemical cycles. **Ambio**. 24:181-187