

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

**Assimilação por bactérias do carbono e nitrogênio provenientes da  
matéria orgânica excretada e celular de *Planktothrix agardhii***

LETÍCIA PITON TESSAROLLI

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  
2010

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

T338ab

Tessarolli, Leticia Piton.

Assimilação por bactérias do carbono e nitrogênio provenientes da matéria orgânica excretada e celular de *Planktothrix agardhii* / Leticia Piton Tessarolli. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
57 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Ecologia microbiana. 2. Bactérias. 3. Cianobactéria. 4. Matéria orgânica. 5. Degradação. I. Título.

CDD: 576.15 (20ª)

**Leticia Píton Tessarolli**

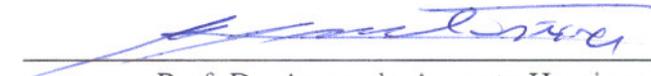
**Assimilação por bactérias de carbono e nitrogênio provenientes da matéria orgânica excretada e celular de *Planktothrix agardhii***

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 26 de maio de 2010

BANCA EXAMINADORA

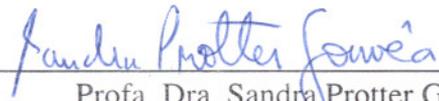
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Odete Rocha  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador

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

"Tudo que possas ou sonhas fazer,  
comece. A audácia contém gênio,  
poder e magia." (J. W. Goethe)

## AGRADECIMENTOS

"Uma alegria compartilhada transforma-se numa dupla alegria; uma tristeza compartilhada, em meia tristeza" (Autor Desconhecido)

A todos aqueles com quem posso compartilhar a minha alegria, meus mais sinceros agradecimentos:

- ❖ Ao professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança na realização desse trabalho;
- ❖ À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN), pela formação acadêmica e infra-estrutura fornecida para o trabalho;
- ❖ À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto temático e bolsa oferecida;
- ❖ À Profa. Dra. Odete Rocha, pela disponibilidade em tirar dúvidas e por aceitar compor essa banca de mestrado;
- ❖ À Profa. Dra Sandra Protter Gouvea, pelas importantes contribuições ao artigo de qualificação, e por aceitar novamente compor a banca de mestrado;
- ❖ Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini Júnior, pela importante contribuição com o auxílio nas análises matemáticas e discussão dos dados;
- ❖ À Prof. Dr. Maria Inês de Salgueiro Lima, por disponibilizar o microondas de seu laboratório;
- ❖ Aos professores e funcionários do PPG-ERN (João e Roseli), e ao funcionário Marco (Botânica).
- ❖ Ao técnico de campo Luizinho, pela imprescindível ajuda e disponibilidade nas coletas em Barra Bonita;
- ❖ Ao técnico Luiz Sartori, pelo apoio técnico e paciência (mesmo em perguntas repetidas à exaustão!), e pela amizade no laboratório;
- ❖ Aos amigos do Laboratório de Ficologia: Inessa, Fabrício, Alessandra, Cilene, Helena, Guilherme, Rodrigo, Ingritt, Thais Bittar, Thais Garcia, Vitor, Vanessa, Zezé, Danilo, Patrícia, Ana Teresa. Pelas contribuições diretas e discussões sobre trabalho, e também pela amizade, dentro e fora do laboratório, pelas conversas e risadas, deixando os dias mais felizes!
- ❖ Um agradecimento especial à Inessa! Obrigada! Pela paciência em me ensinar as técnicas de laboratório, discutir os experimentos, nas execuções dos experimentos (mesmo no meio da madrugada, esperando as filtrações!), discussão dos dados,

correções e sugestões no artigo e na dissertação... Mas principalmente obrigada pela amizade! Pelas inúmeras conversas (mesmo que algumas delas não façam sentido algum... rs), por me agüentar reclamando que nada dá certo, pelas palavras de estímulo, pelo apoio nas correrias com papéis e pelo apoio intelectual e psicológico! Essa dissertação não teria saído sem você!! *Muchas Gracias!* ;)

- ❖ Aos amigos de São Carlos, que estão juntos desde a graduação, e que tanto me apoiaram durante esses sete anos, com muitas conversas e muita bagunça. Em especial a: Fê, Carol, Cí Camila, Cí Oi, Quel, Toshi e FÁ;
- ❖ Um agradecimento especial à Fê, pelo convívio diário e amizade, e pelo tempo gasto falando dos mais variados assuntos em casa, e pelo resto do tempo gasto com risadas e aventuras domésticas. A diversão é sempre garantida!
- ❖ A todos os amigos e colegas que conheci em São Carlos durante essa “aventura”, obrigada!
- ❖ Aos meus pais, José Antonio e Elisa, e ao meu irmão, Gabriel, que incondicionalmente me apoiaram e me fortaleceram na busca pelos meus objetivos, com palavras de estímulo e conforto, mesmo quando a distância foi necessária. Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão...
- ❖ A todos os meus familiares, sempre dispostos a ajudar nas minhas conquistas.
- ❖ A Deus.

## RESUMO

A cianobactéria *Planktothrix agardhii* é um organismo importante para a dinâmica do reservatório de Barra Bonita devido às florações recorrentes ao longo do ano. Existem, entretanto, ainda poucos dados publicados sobre a dinâmica da degradação dos polissacarídeos e compostos nitrogenados excretados por esse organismo e a forma com que esse processo, e os compostos disponibilizados, podem afetar a diversidade e abundância da comunidade bacteriana. Este estudo teve como objetivo, portanto, verificar a viabilidade do excretado e da biomassa celular dessa cianobactéria como fonte única de carbono e nitrogênio para as bactérias. Para isso foram montados dois experimentos: o primeiro utilizando a matéria orgânica dissolvida (MOD) liberada por *Planktothrix agardhii* como substrato para estabelecimento de uma comunidade bacteriana proveniente de um inóculo de Barra Bonita, e o segundo, montado da mesma maneira, utilizando biomassa celular dessa cianobactéria como substrato. Análises de carbono e nitrogênio dissolvido e particulado forneceram subsídio para o ajuste de um modelo cinético do decaimento, enquanto contagem e análises de morfotipos bacterianos, juntamente com eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foram utilizadas para estabelecer um possível processo de sucessão bacteriana na utilização desses substratos. Os ajustes no modelo cinético mostraram duas fases de degradação para ambos o nitrogênio e carbono orgânicos, sendo a primeira fase rápida, durante os três primeiros dias de degradação, seguida por uma fase mais lenta de degradação. Os coeficientes de degradação da primeira fase ( $k_T$ ) alcançaram valores até 60x maiores que os determinados para a segunda fase da mineralização ( $k_3$ ). Os valores encontrados de compostos residuais estão de acordo com dados publicados sobre o reservatório, e podem ter implicação ecológica pela possibilidade de sua exportação para áreas a jusante. As concentrações de bactérias, em número e biovolume total das amostras, forneceram uma curva com pico máximo no segundo e terceiro dia de cultura experimental, seguido por um declínio, mais acentuado nas curvas de biovolume, devido à contínua redução no valor médio por célula bacteriana verificado nas culturas. As análises de morfotipos não revelaram diferenças significativas de acordo com o tempo nas culturas com MOD, porém, nas culturas com biomassa bacteriana, pôde ser observada uma redução na concentração de bacilos em função do tempo, com conseqüente aumento na concentração de cocobacilos e cocos. Uma análise preliminar do gel de DGGE permitiu identificar alterações nos padrões de bandas apresentados entre os dias 1, 3 e 5, de ambos os experimentos, o que pode ser indicativo de um processo de sucessão em andamento nessas culturas. A utilização dessas fontes de carbono e nitrogênio pelas bactérias mostrou-se, portanto, viável, para manutenção da comunidade bacteriana e foi sugerido, por análise preliminar, um possível processo de sucessão.

## ABSTRACT

The cyanobacterium *Planktothrix agardhii* is an important organism for the dynamics of Barra Bonita reservoir due to recurrent blooms throughout the year. However, there are still few published data on the dynamics of polysaccharides degradation and nitrogenous compounds excreted by the cells, as well as the way this process, and the compounds available, may affect the diversity and abundance of the bacterial community. This study aimed, therefore, to determine the feasibility of the released organic matter and cell biomass of cyanobacteria as the sole source of carbon and nitrogen for bacteria. Two similar experiments were performed: one using the dissolved organic matter (DOM) released by *P. agardhii* as a substrate for the establishment of a community from an inoculum from Barra Bonita reservoir and the second using cellular biomass of cyanobacteria as a substrate. Analysis of carbon and nitrogen, dissolved and particulate, provided the adjustment of a decay kinetic model, while counting and analysis of bacterial morphotypes, along with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), were used to establish a possible process of bacterial succession by using these substrates. The settings in the kinetic model showed two phases of degradation for both nitrogen and organic carbon: first, a rapid phase, during the first three days of degradation, followed by a slower phase of degradation. The degradation coefficients of the first phase ( $k_T$ ) reached values up to 60x higher than those determined for the second phase of mineralization ( $k_3$ ). Our values for residual compounds are in agreement with published data on the reservoir, and may have ecological implications for the possibility of export to downstream areas. Bacterial concentrations in number and total biovolume of the samples provided a curve with a peak in the second and third days of experimental culture, followed by a decline, more pronounced in curves of biovolume due to the continuing reduction in the average value per bacterial cell found in cultures. The analysis of morphotypes showed no significant differences through time in cultures with DOM, however, in cultures with bacterial biomass, a reduction in the concentration of bacilli may be observed, with a consequent increase in the concentration of coccobacilli and cocci. A preliminary analysis of the DGGE showed changes in patterns of bands produced between days 1, 3 and 5 in both experiments, which may be indicative of a succession process in these cultures. The use of these sources of carbon and nitrogen by bacteria proved therefore feasible to maintain the bacterial community and a possible succession process has been suggested.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reservatório de Barra Bonita, apresentado o ponto de coleta (coordenadas 22°32'50,98"S e 48°29'28,23"W), origem da cianobactéria *Planktothrix agardhii* e do inóculo bacteriano utilizados nos experimentos (Fonte: Google Earth – 30/06/2010) **7**
- Figura 2.** Fotomicrografia de *Planktothrix agardhii* em cultura axênica, obtida em microscopia óptica. **8**
- Figura 3.** Esquema do sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo bacteriano. A entrada de água permanece tampada e é aberta apenas dentro da água; o algodão, autoclavado com o sistema, é colocado na mangueira ligada à bomba para evitar contaminação por bactérias aéreas (Fonte: Bagatini, 2008). **9**
- Figura 4.** Esquema do modelo teórico utilizado para ajuste cinético do processo de degradação da MOD e da biomassa de *P. agardhii*. MODisp: carbono ou nitrogênio orgânico disponíveis para a degradação bacteriana; MOD<sub>R</sub>: carbono ou nitrogênio orgânico refratário; MOP: carbono ou nitrogênio orgânico particulado (células bacterianas); IN<sub>1;2ou3</sub>: carbono ou nitrogênio nas formas mineralizadas. **15**
- Figura 5.** Curvas de decaimento do carbono orgânico disponível (CODisp) e de incorporação e decaimento do carbono orgânico particulado (COP) em relação à duração da cultura experimental (em dias), juntamente com o modelo cinético de primeira ordem aplicado. A barra de erros corresponde ao desvio padrão, com n=3 (réplicas de cultura). R<sup>2</sup>=0,90409 (CODisp) e R<sup>2</sup>=0,42482 (COP). **21**
- Figura 6.** Concentração de nitrogênio orgânico, desvio padrão (com n=3), e ajuste cinético das curvas de decaimento do NODisp e assimilação e decaimento do nitrogênio nas células bacterianas (NOP) em uma cultura com MOD de *P. agardhii*. Valores expressos em mg L<sup>-1</sup> em relação à duração da cultura em dias. **22**
- Figura 7.** Concentração de células bacterianas (± DP; em células por mL<sup>-1</sup>) e biovolume bacteriano total (± DP, em μm<sup>3</sup>.mL<sup>-1</sup>) na cultura experimental com MOD de *P. agardhii* em relação ao tempo de duração do experimento (em dias). **24**

**Figura 8.** Biovolume médio ( $\pm$  DP, em  $\mu\text{m}^3$ ) obtido para células bacterianas presentes nas culturas experimentais com MOD de *P. agardhii* como fonte de carbono e nitrogênio, em relação ao tempo de duração dos experimentos (em dias). **25**

**Figura 9.** Frequências relativas dos morfotipos encontrados para as culturas experimentais da comunidade bacteriana em MOD liberada por *P. agardhii* nos diferentes dias de amostragem. **26**

**Figura 10.** Concentração de carbono ( $\text{mg L}^{-1}$ ) com desvio padrão ( $n=3$ ) e ajuste cinético da curva de decaimento do CODisp e de formação e degradação do COP em relação à duração da cultura experimental (em dias) utilizando com substrato o conteúdo intracelular (biomassa) de *P. agardhii*.  $R^2=0,99789$  (CODisp) e  $R^2=0,84$  (COP). **26**

**Figura 11.** Curva de decaimento do NDisp nas culturas com biomassa de *P. agardhii* e formação e decaimento do produto intermediário (NOP). Os ajustes foram realizados de acordo com o modelo cinético adotado. Valores expressos em  $\text{mg L}^{-1}$ , com desvio padrão ( $n=3$ ) em relação à duração da cultura em dias. **30**

**Figura 12.** Concentração de células bacterianas (células bacterianas por mL) e biovolume total por mL (em  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) na cultura experimental com biomassa de *P. agardhii* como fonte de carbono e nitrogênio em relação ao tempo de duração do experimento (em dias). **31**

**Figura 13.** Biovolume médio ( $\pm$  DP, em  $\mu\text{m}^3$ ) obtido para células bacterianas presentes nas culturas experimentais com o conteúdo intracelular de *P. agardhii* como substrato, em relação ao tempo de duração dos experimentos (em dias). **32**

**Figura 14.** Frequências relativas dos morfotipos encontrados para as culturas experimentais da comunidade bacteriana em biomassa de *P. agardhii* nos diferentes dias de amostragem. **33**

**Figura 15.** Gel de DGGE da comunidade bacteriana para os dias 1, 3 e 5 de amostragem, nas culturas experimentais com MOD e Biomassa como substrato. P = padrão; 1, 2 e 3 representam as réplicas de cultura em cada dia de amostragem; A, B e C representam, respectivamente, dias 1, 3 e 5 de uma cultura controle, onde não estavam presentes fontes de nitrogênio. **34**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Reagentes e Concentrações utilizadas para reação de amplificação do DNA (PCR), como descrito por Bagatini, 2008 **18**

**Tabela 2.** Concentração (em mg L<sup>-1</sup>) de carbono orgânico total (COT), nitrogênio orgânico (NOT), nitrato+nitrito (NO<sub>3</sub>), amônio (NH<sub>4</sub>), proteínas e fosfato (PO<sub>4</sub>) na MOD e biomassa celular de *P. agardhii*, utilizados como substrato para a montagem do experimento (média ± DP). **20**

**Tabela 3.** Resumo dos parâmetros obtidos pela aplicação do modelo cinético da degradação do carbono orgânico dissolvido e nitrogênio orgânico dissolvido, nas culturas experimentais com MOD de *P. agardhii*. [MODisp]<sub>i</sub> = concentração inicial de carbono ou nitrogênio orgânico disponível; MOD<sub>R</sub> = carbono ou nitrogênio orgânico residual na cultura; MOP = carbono ou nitrogênio orgânico particulado bacteriano;  $k_T$  = coeficiente de decaimento do MODisp;  $k_3$  = coeficiente de mineralização do MOD<sub>R</sub>;  $k_5$  = coeficiente de mineralização do MOP;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $R^2$  = coeficiente de determinação. **23**

**Tabela 4.** Parâmetros obtidos na aplicação do modelo cinético da degradação do carbono orgânico disponível e nitrogênio orgânico disponível, nas culturas experimentais com biomassa de *P. agardhii*. [MODisp]<sub>i</sub> = concentração inicial de carbono ou nitrogênio orgânico disponível; MOD<sub>R</sub> = carbono ou nitrogênio orgânico residual na cultura; MOP = carbono ou nitrogênio orgânico particulado bacteriano;  $k_T$  = coeficiente de decaimento do MODisp;  $k_3$  = coeficiente de mineralização do MOD<sub>R</sub>;  $k_5$  = coeficiente de mineralização do MOP;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $R^2$  = coeficiente de determinação. **29**

## LISTA DE ABREVIATURAS

COD <sub>isp</sub>	Carbono Orgânico Disponível para degradação
COD <sub>R</sub>	Carbono Orgânico Dissolvido Residual
COP	Carbono Orgânico Particulado
COT	Carbono Orgânico Total
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dNTPs	Desoxinucleotídeos Trifosfatados, onde N = adenosina, citidina, guanosina ou timidina
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IN	Composto (carbono ou nitrogênio) mineralizado
MO	Matéria Orgânica
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
MOD	Matéria Orgânica (carbono ou nitrogênio) Residual (Refratária)
MOD <sub>isp</sub>	Matéria Orgânica (carbono ou nitrogênio) Disponível para Degradação
MOP	Matéria Orgânica (carbono ou nitrogênio) Particulada
NID	Nitrogênio Inorgânico Dissolvido
NOD	Nitrogênio Orgânico Dissolvido
NOD <sub>isp</sub>	Nitrogênio Orgânico Disponível para degradação
NOD <sub>R</sub>	Nitrogênio Orgânico Dissolvido Residual
NOP	Nitrogênio Orgânico Particulado
NOT	Nitrogênio Orgânico Total
NT	Nitrogênio Total
PCR	Polymerase chain reaction
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	6
3. Material e Métodos.....	7
3.1. Local de Estudo.....	7
3.2. Organismos.....	8
3.2.1. <i>Planktothrix agardhii</i> .....	8
3.2.2. Inóculo Bacteriano.....	9
3.3. Obtenção da MOD e Biomassa de Células de <i>P. agardhii</i> .....	10
3.4. Experimento I: Utilização da MOD de <i>P. agardhii</i> pelo bacterioplâncton.....	11
3.5. Experimento II: Utilização da MO Intracelular de <i>P. agardhii</i> pelo bacterioplâncton.....	11
3.6. Análises.....	12
3.6.1. Proteínas.....	12
3.6.2. Fosfato.....	12
3.6.3. Carbono Orgânico e Nitrogênio Total.....	12
3.6.4. Nitrogênio Inorgânico.....	13
3.6.4.1. Nitrato e Nitrito.....	13

3.6.4.2. Amônio.....	13
3.6.5. Nitrogênio Orgânico.....	13
3.7. Comunidade Bacteriana.....	13
3.7.1. Preparação das Amostras, Densidades e Morfotipos.....	13
3.7.2. Biovolume.....	14
3.7.3. Índice de Conversão Biovolume-Biomassa.....	14
3.8. Modelo Cinético.....	15
3.9. Análise Genética da Comunidade Bacteriana.....	17
3.9.1. Extração do DNA.....	17
3.9.2. Amplificação do DNA.....	17
3.9.3. DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante).....	18
4. Resultados.....	20
4.1. Caracterização parcial da MOD excretada e da biomassa de células de <i>P. agardhii</i> .....	20
4.2. Experimento I: Degradação da MOD excretada por <i>P. agardhii</i> .....	20
4.3. Índice de Conversão Biovolume-Biomassa bacteriana.....	26
4.4. Experimento II: Degradação da biomassa fitoplanctônica de <i>P. agardhii</i> .....	26
4.5. Genética da Comunidade Bacteriana.....	33
5. Discussão.....	35
6. Conclusões.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias têm grande importância no reservatório de Barra Bonita, sendo constantemente observadas florações ao longo do ano, principalmente durante o verão, fato que pode estar relacionado às elevadas temperaturas, maior estabilidade da coluna d'água, menor tempo de residência e à alta irradiação solar (Dellamano-Oliveira, 2006). A dominância das cianobactérias em reservatórios, segundo Reynolds (1999), está relacionada a características comuns a algumas espécies desse grupo, como a habilidade de permanecer suspensa e regular a sua flutuação na coluna d'água e capacidade de suportar as alterações diárias na intensidade de mistura do sistema, tornando essas espécies mais competitivas pelos recursos disponíveis.

A cianobactéria *Planktothrix agardhii* é um organismo cosmopolita, formador de florações, extremamente abundante em ambientes de água-doce, muitas vezes encontrando-se em coexistência ou alternância de dominância com outras cianobactérias, como por exemplo, *Microcystis aeruginosa* (Visser *et al.*, 2005). De fato, no reservatório de Barra Bonita, esses dois organismos, juntamente com outras espécies de cianobactérias, apresentam dominância em diferentes períodos, produzindo extensas populações, inclusive 'blooms' que podem se repetir ao longo do ano. Durante as florações ocorre excreção de grande quantidade de matéria orgânica dissolvida (MOD) pelas células saudáveis para o meio, ou ainda, liberação de MOD e biomassa fitoplanctônica celular em virtude da morte e lise dos organismos (Brock e Cline, 1984; Wood e Van Halen, 1990). Esse material fica imediatamente disponível para utilização pelos micro-organismos com habilidade para tal, geralmente heterotróficos, um processo dominado pela comunidade bacteriana (Cole *et al.*, 1982; Wetzel, 2001). A utilização desse material, disponibilizado como fonte de carbono e nitrogênio, por micro-organismos heterotróficos, que remineralizam os nutrientes, ou tornam a MOD

disponível para outros organismos, como descrito posteriormente, tem uma implicação ecológica de grande importância para o reservatório, visto a abundância e frequência das florações fitoplanctônicas ao longo do ano.

O carbono orgânico excretado, ou seja, liberado pelas células saudáveis durante a fotossíntese, representa, em média, 5% do carbono fotoassimilado por célula em estado fisiológico normal, podendo, entretanto, em situações de estresse das células (i.e. concentrações limitantes de nitrogênio e fósforo e altas intensidades de luz) alcançar até 30% do total (Mague *et al.*, 1980; Fogg, 1983; Vieira *et al.*, 1998; Biddanda e Benner, 1997). Existem evidências de que cerca de 10 a 50% da produção primária fitoplanctônica são reciclados pelo bacterioplâncton (Søndergaard e Jensen, 1986) e que a liberação extracelular pode corresponder de 4 a 100% da necessidade de carbono das bactérias (Riemman *et al.*, 1982; Cole *et al.*, 1982; Bell e Kuparinen, 1984). A ação bacteriana representa, portanto, tanto o primeiro quanto o último passo para a remineralização do carbono orgânico excretado pelo fitoplâncton (Newell *et al.*, 1981).

A habilidade na utilização da MOD de origem fitoplanctônica como fonte de energia pela comunidade bacteriana foi descrita por Azam e colaboradores (1983), assim como o processo de reintrodução do carbono orgânico dissolvido na cadeia trófica por este grupo, tornando-o imediatamente disponível no ambiente para grupos de organismos que não teriam inicialmente a habilidade para utilizá-lo. Esse processo, que permite a ciclagem do carbono com maior eficiência, juntamente com outros compostos presentes na MOD, foi denominado elo microbiano, ou '*microbial loop*' (Azam *et al.*, 1983). Esse processo evita que grande parte dos compostos alcance o fundo dos reservatórios, onde ficariam indisponíveis para utilização pelos diferentes níveis tróficos (Ducklow e Carlson, 1992; Thomas, 1997).

A composição da MOD em um ambiente aquático pode variar de acordo com a espécie dominante para sua liberação. Os carboidratos poliméricos são os compostos geralmente predominantes, chegando a mais de 90% da MOD excretada pelas algas. Os polissacarídeos liberados por cianobactérias podem servir como uma fonte de carbono bastante eficiente para as bactérias, pois são degradados completamente pelo bacterioplâncton (Colombo *et al.*, 2004). No entanto, existe também uma grande variedade de outros compostos nos excretados (Guillard e Wangersky, 1958). De fato, compostos nitrogenados podem ser encontrados, ainda que em baixas concentrações, além de grupos orgânicos, como os ácidos carboxílicos, di e trissacarídeos, vitaminas, alcalóides e ácidos graxos, estes últimos, geralmente, em quantidades mínimas (Antia *et al.*, 1991; Bronk *et al.*, 1994; Bronk e Ward, 1999; Diaz e Raimbault, 2000). Muitos desses compostos são importantes fontes de nitrogênio para os organismos autótrofos e heterótrofos (Bronk, 2002).

Para algumas espécies de cianobactérias existem dados relatando a excreção de 5 até 40% do carbono fotoassimilado (Meffert e Zimmermann-Telschow, 1979) e de compostos nitrogenados, como aminoácidos livres e combinados em peptídeos, e proteínas, glicoproteínas, açúcares aminados, nucleotídeos, purinas, pirimidinas e uréia, entre outros (Antia *et al.*, 1991). Entretanto, poucos dados são encontrados sobre o destino dos compostos nitrogenados excretados por cianobactérias, e sua possível utilização pela comunidade bacteriana como fonte de nitrogênio.

Além da MOD, após os eventos de floração, ficam disponíveis grandes quantidades de biomassa celular fitoplanctônica particulada, originárias do conteúdo celular, que podem representar outra importante fonte de carbono e nitrogênio para a comunidade bacteriana, permitindo a manutenção de uma comunidade diversa e abundante,

utilizando as diferentes formas de substrato oferecidas como fontes de nutrientes (Puddu *et al.* 2003; Lee e Rhee, 1997)

O estabelecimento da comunidade bacteriana responsável pela degradação será, assim, diretamente influenciado pela composição da matéria orgânica; pela disponibilidade dos compostos presentes para degradação, e pelos grupos específicos que possuem habilidade para a degradação de compostos (Bell e Mitchell, 1972; Bell e Sakshaug, 1980; Fallowfield e Daft, 1988; Girollo, 2003). A comunidade bacteriana que se estabelece durante a degradação pode, portanto, ser constituída de grupos mais específicos ou de grupos mais generalistas, e pode ser influenciada também pela oferta de nutrientes (Bell, 1984) ou por diferentes adaptações na captura dos compostos, que permitam que determinados grupos sejam favorecidos. A comunidade bacteriana estabelecida, assim como a oferta dos diferentes compostos, vai influenciar diretamente no rendimento do processo de degradação e incorporação de biomassa bacteriana, e no estabelecimento de um equilíbrio entre liberação e consumo de produtos extracelulares (Bell e Sakshaug, 1980). Além dessas diferenças do processo inicial de utilização da matéria orgânica disponível, podem ainda ser verificados eventos de sucessão bacteriana, visto que a redução dos nutrientes disponíveis e/ou alteração dos compostos pela própria comunidade, pode favorecer a competição na captação de recursos a grupos diferentes, ao decorrer do tempo.

A técnica molecular do DGGE (do inglês, *Denaturing gradient gel eletrophoresis*) permite uma forma de acesso rápido à diversidade da comunidade bacteriana. Esse método gera um padrão bem definido de bandas, relacionado às variações nas seqüências de nucleotídeos presentes no DNA amplificado por reação da polimerase em cadeia (PCR), que vão afetar diretamente os padrões de desnaturação e migração dessas moléculas (Muyzer e Smalla, 1998; Muyzer *et al.*, 1993). Também é possível, a partir

das bandas obtidas nessa técnica, o seqüenciamento do fragmento de DNA e posterior identificação das espécies presentes na comunidade.

Apesar da importância de *P. agardhii* para a dinâmica do reservatório de Barra Bonita e de outros corpos d'água onde são freqüentes as florações dessa cianobactéria, existem ainda poucos dados publicados sobre a dinâmica da degradação dos polissacarídeos e compostos nitrogenados excretados por esta espécie, e as formas com que esse processo está relacionado com o estabelecimento e manutenção de uma comunidade bacteriana.



## 2. OBJETIVOS

### *Objetivos Gerais*

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de degradação bacteriana da matéria orgânica de *P. agardhii*, analisando a viabilidade de utilização do carbono e nitrogênio orgânicos liberados por essa cianobactéria como fonte de nitrogênio e energia para a comunidade bacteriana.

### *Objetivos Específicos*

- (I) Verificar a utilização da MOD excretada por *P. agardhii* em cultura como única fonte de carbono e nitrogênio para a manutenção da comunidade bacteriana.
- (II) Verificar a viabilidade da utilização do conteúdo celular (biomassa) de uma cultura de *P. agardhii* como única fonte de carbono e nitrogênio para a comunidade bacteriana.
- (III) Modelar a cinética do processo de degradação desses compostos;
- (IV) Verificar possível processo de sucessão na comunidade bacteriana responsável pela degradação dos compostos, através de análise em DGGE (“*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*”).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de Estudo

O reservatório de Barra Bonita (Figura 1), de coordenadas geográficas 22° 29'S, 48° 34'O formado pela confluência dos rios Piracicaba e Tietê está localizado entre os municípios de Barra Bonita e Igarapu do Tietê, na região central do estado de São Paulo. Possui uma área de 310 km<sup>2</sup> e um volume total de 3,2 km<sup>3</sup>.



**Figura 1.** Reservatório de Barra Bonita, apresentado o ponto de coleta (coordenadas 22°32'50,98"S e 48°29'28,23"O), origem da cianobactéria *Planktothrix agardhii* e do inóculo bacteriano utilizados nos experimentos. (Fonte: Google Earth – 30/06/2010)

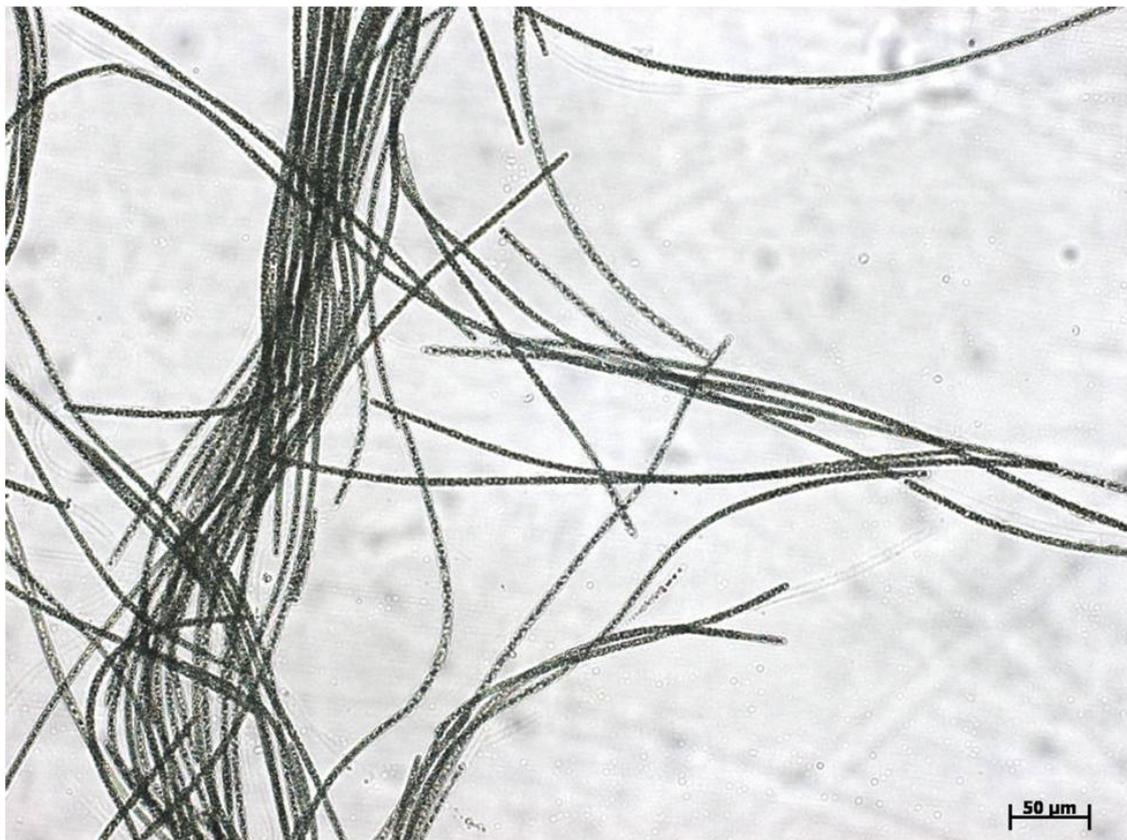
A represa apresenta profundidade média e máxima de, respectivamente, 10 e 30m. No verão (estação chuvosa) a vazão é de 1500m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> e o tempo médio de retenção de 37 dias, e no inverno (estação seca) os valores médios são de 200 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> e 137 dias

(Matsumura-Tundisi e Tundisi, 2005). Esses valores são, entretanto, variáveis de acordo com a operacionalidade da usina hidrelétrica instalada.

### 3.2. Organismos

#### 3.2.1. *Planktothrix agardhii*

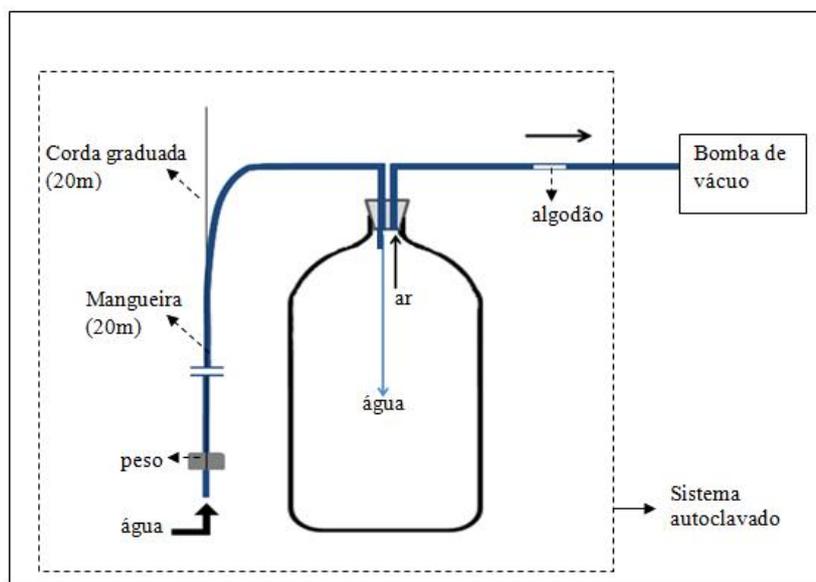
A Cyanobacteria *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis e Komárek (1988) (Figura 2) foi isolada do reservatório de Barra Bonita e é mantida em cultivo axênico (clone BB013) na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835). Essa espécie fitoplanctônica pertence à ordem Oscillatoriales, por isso não apresenta heterocitos, e é considerada como não fixadora de nitrogênio atmosférico.



**Figura 2.** Fotomicrografia de *Planktothrix agardhii* em cultura axênica, obtida em microscopia óptica.

### 3.2.2. Inóculo Bacteriano

O bacterioplâncton utilizado foi coletado no reservatório de Barra Bonita através de amostrador (Figura 3), desenvolvido por Bagatini (2008), de modo a obter-se uma amostra representativa da coluna d'água (0, 5, 10 e 15 metros de profundidade). O inóculo bacteriano foi coletado uma única vez e utilizado para ambos os experimentos. A amostra foi filtrada, sob condições estéreis, em filtros de fibra de vidro GF/C (Whatman) com poros de 1,2  $\mu\text{m}$ , para a remoção de algas, protozoários e detritos. Para evitar o desenvolvimento posterior de organismos eucariotos, o inóculo bacteriano foi incubado com Cicloheximida (Sigma-Aldrich) em concentração final de 10  $\text{mg L}^{-1}$ , por um período de 12h. A concentração final desse antibiótico após montagem do experimento foi menor que 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  e distribuída igualmente entre as culturas experimentais, e este composto não tem efeito seletivo sobre a comunidade bacteriana.



**Figura 3.** Esquema do sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo bacteriano. A entrada de água permanece tampada e é aberta apenas dentro da água; o algodão, autoclavado com o sistema, é colocado na mangueira ligada à bomba para evitar contaminação por bactérias aéreas (Fonte: Bagatini, 2008).

### 3.3. Obtenção da MOD e Biomassa de Células de P. agardhii

Uma cultura axênica de *P. agardhii* foi cultivada em frasco Erlenmeyer com capacidade para 4L, contendo 3L de meio ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964), modificado pela adição de apenas 20% da concentração original de nitrato. As condições de cultivo foram: irradiância de 80-100  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Quantameter QSL-100, Biospherical Instruments) provida por lâmpadas fluorescentes tipo *luz do dia* com fotoperíodo de 12:12 horas (claro:escuro) e temperatura de  $23 \pm 1$  °C, com agitação constante em agitador magnético. Em 21 dias de cultura, ao final do período de crescimento exponencial, quando foi verificado o esgotamento do nitrogênio inorgânico (nitrato) do meio (item 3.6), essa cultura foi separada por filtração tangencial em cartuchos de fibra oca (Xampler™, AG Technology Corporation/GE) com poros de 0,65  $\mu\text{m}$  (UFP-6-E-4A, A), com equipamento previamente autoclavado para evitar contaminação bacteriana.

A fração menor que 0,65  $\mu\text{m}$  obtida foi posteriormente filtrada em sistemas estéreis de filtração a vácuo com membrana de poros de 0,22  $\mu\text{m}$ , para eliminação de possíveis contaminantes do processo. O material assim obtido foi, neste trabalho, denominado matéria orgânica dissolvida (MOD).

A biomassa fitoplanctônica, definida aqui como a porção maior que 0,65  $\mu\text{m}$ , incluindo as células da cianobactéria, concentrada para 300 mL pela filtração tangencial, foi lavada por filtração tangencial, utilizando-se meio autoclavado ASM-1 (Gorham *et al.*, 1964) sem fontes de nitrogênio e foi congelada para evitar o desenvolvimento de bactérias contaminantes até a montagem do experimento. O processo de congelamento e descongelamento dessa fração possivelmente causou a lise e liberação do conteúdo celular no meio, o qual foi incluído no Experimento II. Para montagem do experimento, esse material foi ressuspenso para 1,6 L de meio ASM-1

modificado pela retirada das fontes de nitrato. Esse meio também não possui fontes externas de carbono para o desenvolvimento dos micro-organismos.

#### *3.4. Experimento I: Utilização da MOD de P. agardhii pelo bacterioplâncton*

Foram montadas três culturas experimentais (réplicas), com volume final de 525 mL, contendo 500 mL de MOD e 25 mL do inóculo bacteriano (aproximadamente 4,8% do volume final), em frascos de 1L de capacidade, com tampas tipo *vent-cap*. Essas culturas foram mantidas no escuro, em temperatura de  $23 \pm 1$  °C e agitadas diariamente, duas vezes ao dia. Os experimentos foram mantidos no escuro para evitar o eventual desenvolvimento de organismos fotossintetizantes procarióticos. Foram retiradas amostras nos períodos de 0, 1, 2, 3, 5, 9, 12 e 15 dias, em que foram realizadas análises de carbono e compostos nitrogenados. Nas amostras de 0, 2, 5 e 15 dias também foram realizadas contagens e análises de morfotipos bacterianos. Para as amostras dos dias 1, 3 e 5, foram realizados procedimentos de amplificação de DNA e posterior corrida em gel de DGGE, para identificação de possíveis diferenças nas comunidades de bactérias responsáveis pela degradação durante as diferentes fases.

#### *3.5. Experimento II: Utilização da MO Intracelular de P. agardhii pelo bacterioplâncton*

As culturas experimentais foram montadas e amostradas de maneira semelhante e mantidas sob as mesmas condições de cultivo do Experimento I. Entretanto, foi utilizado como substrato 500 mL da solução de células de *P. agardhii* e as contagens e análises de morfotipos bacterianos foram realizadas em todas as amostragens realizadas. Os experimentos foram realizados simultaneamente, prevenindo assim diferenças nas comunidades bacterianas iniciais, visando uma análise mais efetiva dos efeitos dos

substratos oferecidos para o estabelecimento e crescimento das populações bacterianas. Concomitantemente aos experimentos também foram realizadas culturas “Controle” contendo meio ASM-1 sem fontes de nitrogênio como substrato, e montadas e mantidas de maneira similar ao apresentado para os experimentos I e II. As amostragens das culturas controle consistiram apenas na retirada de material, amplificação por PCR e corridas em géis de DGGE, para os dias 1, 3 e 5.

### 3.6. Análises

#### 3.6.1. Proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), com a utilização do reagente *folin-fenol*.

#### 3.6.2. Fosfato

A concentração de fosfato dissolvido nas amostras foi determinada segundo metodologia descrita por Strickland e Parsons (1960).

#### 3.6.3. Carbono Orgânico e Nitrogênio Total

As medidas das concentrações de carbono orgânico e nitrogênio das amostras foram realizadas através de um aparelho analisador TOC-Vcph (Shimadzu) equipado com módulo para a análise de nitrogênio total das amostras (TN). Foram realizadas análises da amostra total e da fração dissolvida das amostras (<0,22 µm). A fração particulada foi estimada como a diferença entre a amostra total e a fração dissolvida.

Para o experimento II, de degradação da matéria orgânica intracelular, foi considerado o Carbono Orgânico Disponível (CODisp) e Nitrogênio Orgânico Disponível (NODisp) para degradação, que compreende a fração dissolvida (liberada pela lise das células durante o congelamento) somada a parte correspondente às células e/ou detritos da cianobactéria da fração particulada. Quando a fração particulada das

células de cianobactéria foi considerada nula, o carbono orgânico disponível passou a ser considerado igual ao carbono orgânico dissolvido.

#### 3.6.4. Nitrogênio Inorgânico

##### 3.6.4.1. Nitrato e Nitrito

As análises da concentração de nitrogênio na forma dos compostos nitrato e nitrito foram realizadas pelo método de redução pelo cádmio reativo descrito por Mackereth *et al.* (1978), por agitação.

##### 3.6.4.2. Amônio

A concentração de nitrogênio na forma de amônio nas amostras foi obtida pelo método de fenol-hipoclorito, descrito por Solorzano (1969).

#### 3.6.5. Nitrogênio Orgânico

As concentrações de nitrogênio orgânico dissolvido (NOD) das amostras foram obtidas de maneira indireta, pela subtração da fração inorgânica (NID) da concentração total de nitrogênio (NT) obtida através do analisador TOC-Vcph + TN (equações I e II).

$$(I) \quad \text{NOD} = \text{NT} - \text{NID}$$

$$(II) \quad \text{NID} = \text{NO}_3 + \text{NH}_4$$

### 3.7. Comunidade Bacteriana

#### 3.7.1. Preparação das Amostras, Densidade e Morfotipos

As amostras para contagem de bactérias foram retiradas das culturas experimentais e fixadas com formaldeído (concentração final de 4%). A densidade e morfologia bacterianas foram obtidas por microscopia de epifluorescência (microscópio Zeiss Axioplan 2, Jena, Germany) utilizando-se imagens capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc e tratadas com o auxílio do software de análise de imagens Axiovision release 4.5 (Zeiss). As amostras foram coradas com o fluorocromo DAPI

(0,5 a 1µg mL<sup>-1</sup>) segundo Porter e Feig (1980) e filtradas em membranas de polycarbonato de poro de 0,22 µm (Millipore) coradas com Sudan Black. Os morfotipos foram classificados pela razão comprimento/largura, segundo Racy *et al.* (2005).

### 3.7.2. Biovolume

O biovolume de cada célula foi calculado segundo Sun e Liu (2003) assumindo-se as fórmulas de esferóide prolato para coco e cocobacilo e de cilindro com duas hemiesferas para os demais morfotipos: bacilo, espirilo (células espiraladas ou em forma de S), víbrio (bacilos ou filamentos curvados, em forma de C) e filamento.

### 3.7.3. Índice de Conversão Biovolume-Biomassa

Para obtenção de um índice de conversão do biovolume bacteriano em biomassa de carbono e/ou nitrogênio foram utilizadas as concentrações de carbono particulado (aqui se assumindo como pertencentes somente às células bacterianas na cultura) dividido pelos biovolumes totais calculados para as amostras dos dias 2, 5 e 15 das culturas experimentais com a MOD de *P. agardhii* (Experimento I). Utilizando-se o índice foi possível estimar a parte pertencente às células bacterianas da fração particulada das amostras obtidas, a partir do biovolume estimado nas contagens. Assim, foi possível diferenciar, para a fração particulada, a parte correspondente às células bacterianas, e o restante foi atribuído às células de *P. agardhii* e/ou detritos disponíveis como material para a degradação pela comunidade bacteriana (Equações III, IV e V).

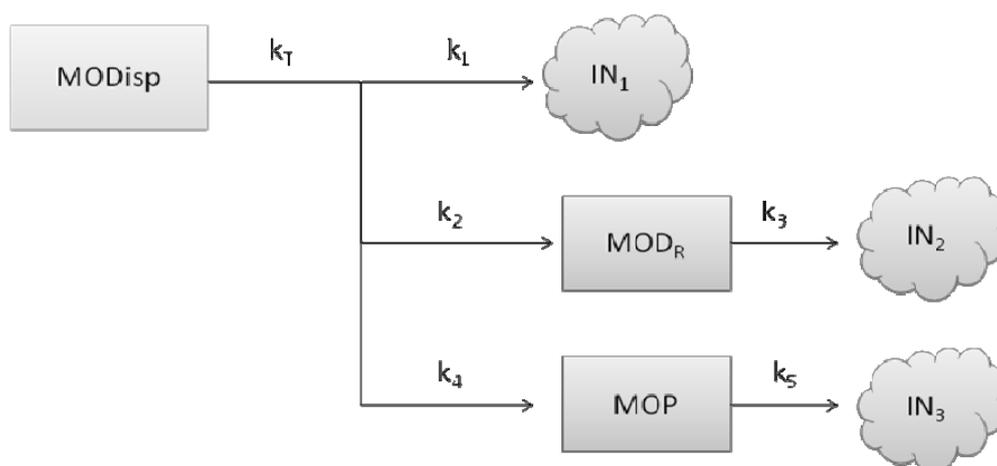
$$(III) \quad \text{MOP (Exp II)} = \text{MO (Biomassa Algal)} + \text{MO (Células Bacterianas)}$$

$$(IV) \quad \text{MO (Células Bacterianas)} = \text{Biovolume bactérias} \times \text{Índice de Conversão}$$

$$(V) \quad \text{Índice de conversão} = \text{MOP (Exp I)} / \text{Biovolume total de células (Exp I)}$$

### 3.8. Modelo Cinético

Os resultados de carbono e nitrogênio orgânico das frações dos experimentos I e II foram ajustados a um modelo (Figura 4) de primeira ordem (eq. VI a XI), desenvolvido com base nas equações propostas para a degradação de lixiviados de macrófitas aquáticas (Peret e Bianchini Jr., 2004).



**Figura 4.** Esquema do modelo teórico utilizado para ajuste cinético do processo de degradação da MOD e da biomassa de *P. agardhii*. MODisp: carbono ou nitrogênio orgânico disponíveis para a degradação bacteriana; MOD<sub>R</sub>: carbono ou nitrogênio orgânico refratário; MOP: carbono ou nitrogênio orgânico particulado (células bacterianas); IN<sub>1,2ou3</sub>: carbono ou nitrogênio nas formas mineralizadas.

Assumiu-se que a degradação da MOD (eq. VI) ocorre de acordo com três processos competitivos. O primeiro trata da mineralização dos compostos lábeis (IN<sub>1</sub>) (eq. VII). A segunda rota propõe a formação de compostos refratários (MOD<sub>R</sub>) (eq. VIII) e sua mineralização (IN<sub>2</sub>) (eq. IX). O terceiro caminho foi a assimilação e conversão em micro-organismos (MOP) (eq. X) e sua participação na mineralização (IN<sub>3</sub>) (eq. XI). As variações temporais da MOD, MOD<sub>R</sub> e MOP foram utilizadas para a

parametrização do modelo. Os ajustes e determinações dos coeficientes foram realizados por regressões não-lineares, para tanto utilizou-se o algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt (Press *et al.*, 1993).

$$(VI) \frac{d[MOD_{isp}]}{dt} = -k_T [MOD_{isp}]$$

$$(VII) \frac{d[IN_2]}{dt} = k_T \left[ \frac{k_1}{k_T} \times MOD_{isp} \right]$$

$$(VIII) \frac{d[MOD_R]}{dt} = k_T \left[ \frac{k_2}{k_T} \times MOD_{isp} \right] - k_3 [MOD_R]$$

$$(IX) \frac{d[IN_3]}{dt} = k_3 [MOD_R]$$

$$(X) \frac{d[MOP]}{dt} = k_T \left[ \frac{k_4}{k_T} \times MOD_{isp} \right] - k_5 [MOP]$$

$$(XI) \frac{d[IN_3]}{dt} = k_5 [MOP]$$

Em que:

MODisp = carbono ou nitrogênio orgânico dissolvido da MOD ou biomassa produzida por *P. agardhii* e disponível para degradação;

MOP = carbono ou nitrogênio orgânico particulado bacteriano;

MOD<sub>R</sub> = carbono ou nitrogênio orgânico residual na cultura;

$k_T$  = coeficiente de decaimento do MODisp;

$k_1$  = coeficiente de mineralização do MODisp;

$k_2$  = coeficiente de formação do MOD<sub>R</sub>;

$k_3$  = coeficiente de mineralização do MOD<sub>R</sub>;

$k_4$  = coeficiente de formação do MOP;

$k_5$  = coeficiente de mineralização do MOP;

IN<sub>1,2 e 3</sub> = Compostos inorgânicos provenientes da mineralização.

t = tempo de cultura (dias)

### 3.9. Análise Genética da Comunidade Bacteriana

Alíquotas de 50 mL de cada uma das réplicas de culturas foram retiradas, e centrifugadas em tubos *falcon* a 15500 xg por 25 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuscitado em aproximadamente 1 mL de água autoclavada e guardado em tubos eppendorf a -5° C até o período de extração.

#### 3.9.1. Extração do DNA

A extração e a lavagem do DNA foram realizadas de acordo com Colombo (2006), com modificação pela adição de extração mecânica por meio da utilização de pérolas de vidro (Bagatini, 2008).

As amostras foram centrifugadas a 16.000 xg para retirada do etanol e lavadas com água autoclavada. Após a obtenção do *pellet* adicionou-se 100 µL de solução de lise (50 ng µL<sup>-1</sup> de proteinase K em tampão TE – Tris 10mM, EDTA pH 8,0) e 0,2 g de pérolas de vidro (150-212 µm, Sigma-Aldrich). As amostras foram levadas ao “vortex” por 30 segundos e tratadas com banhos térmicos: 55 °C por 15 minutos e mais 15 minutos a 80 °C.

Após a extração, foi realizada a lavagem do material para a retirada da proteinase K e purificação do material, visto que o DNA desta forma não é estável devido à continuada ação de nucleases (Oliveira *et al.* 2000). O material extraído foi lavado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), clorofórmio, etanol 70% e acetato de sódio (concentração final 1M) e etanol 100% (Colombo 2006). O DNA obtido foi ressuscitado em 20µL de água ultrapura autoclavada.

#### 3.9.2. Amplificação do DNA

Foram realizadas amplificações da região 16S rDNA por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* 968f com grampo CG e 1401r, para o Domínio Bacteria (Heuer *et al.* 1997), que amplificam as regiões variáveis

V6, V7 e V8 do 16S rDNA. Os reagentes e suas concentrações utilizadas na mistura de reação da PCR encontram-se especificados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Reagentes e concentrações utilizadas para reação de amplificação do DNA (PCR), como descrito por Bagatini (2008)

Reagentes	Estoque	Concentração Final por reação	Volume por reação (50 µL)
<i>Primer 968f</i>	10 µM	0,3 µM	1,5 µL
<i>Primer 1401r</i>	10 µM	0,3 µM	1,5 µL
Tampão da Taq <sup>1</sup>	10x	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs <sup>2</sup>	1,25 mM*	200 µM	8 µL
Taq-polimerase	5 U/µL	2U	0,4 µL
DNA	---	---	3 µL
Água	---	---	29,1 µL

<sup>1</sup> Solução tampão da *Taq* 10X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl). <sup>2</sup> Solução de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados, onde N = adenosina, citidina, guanosina ou timidina). \* Concentração final de cada dNTP.

O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos; 33 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos; extensão final a 72 °C por 5 minutos e finalização com resfriamento a 4 °C. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA 1x (TBE). O restante do material amplificado foi utilizado para a realização do DGGE.

### 3.9.3. DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante)

O DNA amplificado foi utilizado para eletroforese em gel de poliácridamida 6% (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) com gradiente desnaturante (DGGE) (equipamento da Scieplas). Os reagentes foram preparados de acordo com Oliveira *et al.* (2000). Utilizou-se um gradiente de 35 a 60% de desnaturante (100% de desnaturante definido como 7 M de uréia e 40% [v/v] de formamida deionizada) e a eletroforese foi realizada a 65°C por 15 horas a 60V em tampão TAE 1x (0,04M de Tris; 0,02M de ácido acético

glacial e 1mM de EDTA). Depois da eletroforese o gel foi corado por 1 hora com solução de GelRed (Biotium) em água ultrapura (0,15  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). As imagens foram capturadas com sistema de fotodocumentação Gel Doc XR+ (BIO-RAD) e tratadas com software QuantityOne (BIO-RAD).

Foi utilizado como padrão no DGGE o produto de PCR de uma mistura de bactérias conhecidas: *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus* e *Mycobacterium stigmatis*. As respectivas bandas ocorrem nesta mesma ordem no gel, da menor concentração (35%) à maior concentração (60%).

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Caracterização parcial da MOD excretada e da biomassa de células de *P. agardhii*

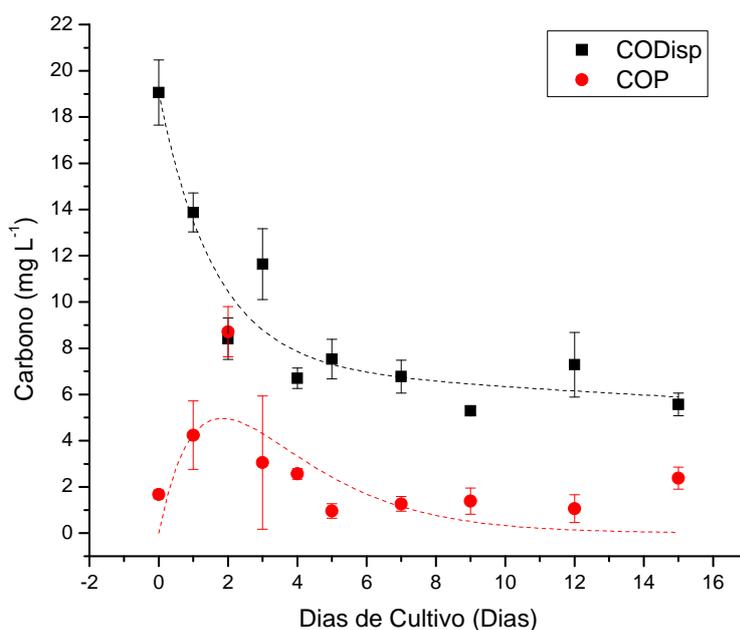
Na tabela 2 estão apresentadas as concentrações de carbono orgânico total e dos compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos, das soluções utilizadas como substrato para o crescimento bacteriano. As análises foram realizadas anteriormente à adição da comunidade bacteriana nas culturas experimentais.

**Tabela 2.** Concentração (em mg L<sup>-1</sup>) de carbono orgânico total (COT), nitrogênio orgânico total (NOT), nitrato+nitrito (NO<sub>3</sub>), amônio (NH<sub>4</sub>), proteínas e fosfato (PO<sub>4</sub>) na MOD e biomassa celular de *P. agardhii*, utilizados como substrato para a montagem do experimento (média ± DP).

	MOD	Biomassa
<b>COT</b>	20,907 ± 2,336	23,350 ± 0,455
<b>NOT</b>	2,003 ± 0,242	4,122 ± 0,098
<b>NO<sub>3</sub></b>	0,019 ± 0,012	0,073 ± 0,007
<b>NH<sub>4</sub></b>	0,099 ± 0,017	0,021 ± 0,019
<b>Proteínas</b>	0,013 ± 0,0003	0,034 ± 0,002
<b>PO<sub>4</sub></b>	2,993 ± 0,017	2,839 ± 0,084

##### 4.2. Experimento I: Degradação da MOD excretada por *P. agardhii*

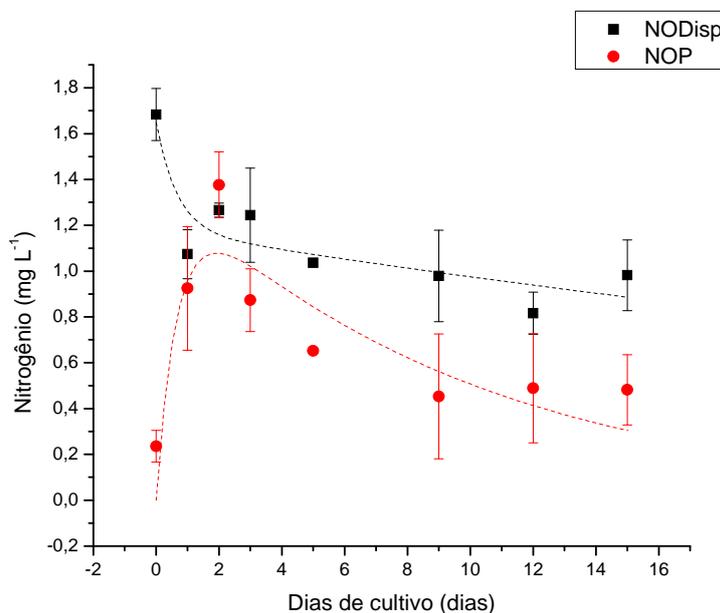
A Figura 5 apresenta o decaimento do carbono orgânico dissolvido presente na MOD devido à degradação bacteriana, assim como a fração particulada desse elemento, referente à biomassa bacteriana na cultura experimental.



**Figura 5.** Curvas de decaimento do carbono orgânico disponível (CODisp) e de incorporação e decaimento do carbono orgânico particulado (COP) em relação à duração da cultura experimental (em dias), juntamente com o modelo cinético de primeira ordem aplicado. A barra de erros corresponde ao desvio padrão, com  $n=3$  (réplicas de cultura).  $R^2=0,90409$  (CODisp) e  $R^2=0,42482$  (COP).

A degradação do carbono disponível, neste experimento correspondente ao COD, apresentou uma taxa de decaimento ( $k_T$ ) de  $0,62 \text{ dia}^{-1}$ , com tempo de meia-vida de 1,118 dia. Segundo o modelo adotado, não foi possível observar a mineralização da fração lábil. O valor teórico encontrado para a fração refratária  $COD_R$  foi de  $7,115 \text{ mg L}^{-1}$ , e o coeficiente de mineralização ( $k_3$ ) dessa fração foi de  $0,01413 \text{ dia}^{-1}$ . O valor máximo encontrado para o COP no modelo teórico foi de  $11,9 \text{ mg L}^{-1}$ , e o coeficiente de mineralização dessa fração ( $k_5$ ) foi  $0,477 \text{ dia}^{-1}$ .

O nitrogênio orgânico apresentou padrão de decaimento (Figura 6) similar ao do carbono (Tabela 3). Nessa figura também está apresentada a curva de formação e degradação do nitrogênio particulado (biomassa bacteriana).



**Figura 6.** Concentração de nitrogênio orgânico, desvio padrão (com  $n=3$ ), e ajuste cinético das curvas de decaimento do NODisp e assimilação e decaimento do nitrogênio nas células bacterianas (NOP) em uma cultura com MOD de *P. agardhii*. Valores expressos em  $\text{mg L}^{-1}$  em relação à duração da cultura em dias.

Para o modelo cinético de degradação ajustado para o nitrogênio orgânico, foi encontrada uma taxa de decaimento de  $1,5 \text{ dia}^{-1}$ , com tempo de meia vida de 0,46 dia para esse composto. As constantes encontradas para as diferentes etapas da curva de degradação, assim como o tempo de meia-vida e a eficiência de assimilação e degradação estão expostas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resumo dos parâmetros obtidos pela aplicação do modelo cinético da degradação do carbono orgânico dissolvido e nitrogênio orgânico dissolvido, nas culturas experimentais com MOD de *P. agardhii*. [MODisp]<sub>i</sub> = concentração inicial de carbono ou nitrogênio orgânico disponível; MOD<sub>R</sub> = carbono ou nitrogênio orgânico residual na cultura; MOP = carbono ou nitrogênio orgânico particulado bacteriano;  $k_T$  = coeficiente de decaimento do MODisp;  $k_3$  = coeficiente de mineralização do MOD<sub>R</sub>;  $k_5$  = coeficiente de mineralização do MOP;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $R^2$  = coeficiente de determinação.

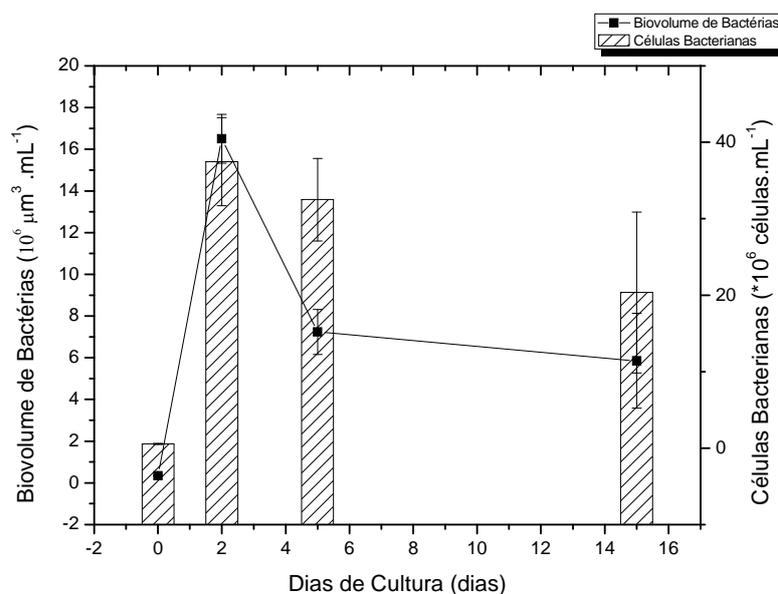
Recurso	[MODisp] <sub>i</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	$k_T$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	MOD <sub>R</sub> (%)	$k_3$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	$r^2$	MOP (%)	$k_5$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	$r^2$
CODisp	19,034	0,62	1,12	37,4	0,01413	49	0,09049	62,5	0,47722	1,45	0,42482
NODisp	1,65	1,5	0,46	70	0,019	36	0,81869	79 <sup>†</sup>	0,10211 <sup>†</sup>	6,78 <sup>†</sup>	0,72034 <sup>†</sup>

\* Parâmetros obtidos segundo o modelo cinético, descrito no item *modelo cinético* da seção Material e Métodos

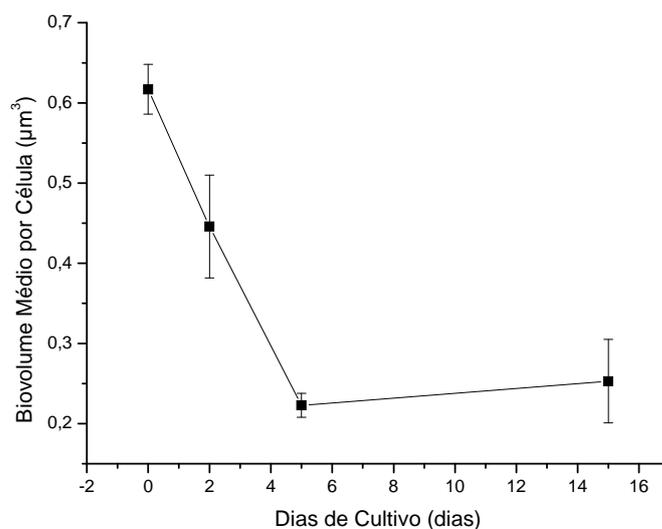
<sup>†</sup> A aplicação do modelo cinético para a assimilação e degradação do NOP apresentou problemas de acoplamento, discutidos posteriormente.



A concentração de células bacterianas, assim como o biovolume total das células bacterianas por mL de cultura, em relação ao tempo de duração das culturas experimentais podem ser observados na Figura 7. O pico em número de células ocorreu durante o dia 2, com  $37,48 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Ocorreu, durante o experimento, uma redução acentuada no biovolume médio por célula bacteriana (Figura 8), que decresceu de  $0,617 \pm 0,031 \mu\text{m}^3$  (média  $\pm$  DP) no início da cultura, para o valor médio de  $0,253 \pm 0,052 \mu\text{m}^3$  aos 15 dias de cultura. Assim, analisando-se o biovolume total das células bacterianas, é possível verificar uma queda mais abrupta a partir do quinto dia de cultura, enquanto a densidade celular demonstrou uma queda menos acentuada.

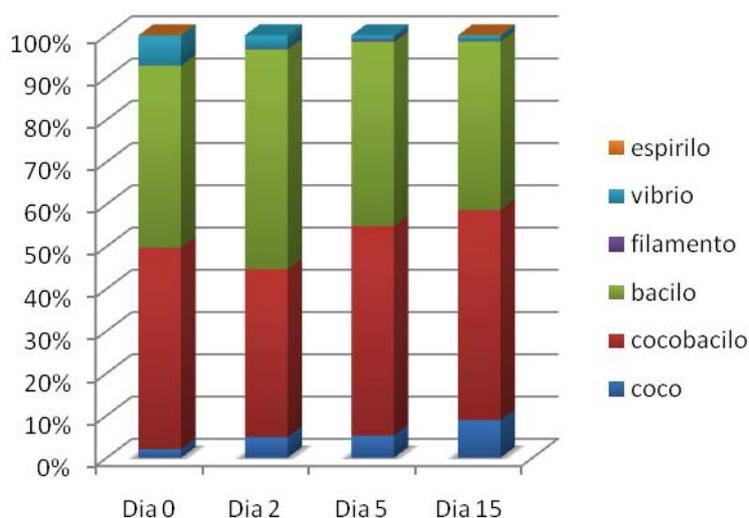


**Figura 7.** Concentração de células bacterianas ( $\pm$  DP; em células por  $\text{mL}^{-1}$ ) e biovolume bacteriano total ( $\pm$  DP, em  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) na cultura experimental com MOD de *P. agardhii* em relação ao tempo de duração do experimento (em dias).



**Figura 8.** Biovolume médio ( $\pm$  DP, em  $\mu\text{m}^3$ ) obtido para células bacterianas presentes nas culturas experimentais com MOD de *P. agardhii* como fonte de carbono e nitrogênio, em relação ao tempo de duração dos experimentos (em dias).

A análise da comunidade bacteriana por frequência relativa de morfotipos não apresentou grandes variações nas culturas com MOD (Figura 9). Foram dominantes, durante toda a cultura, os bacilos e cocobacilos, com valores aproximadamente semelhantes. Pode ser observada, entretanto em proporções relativamente menores, uma ligeira redução na proporção de víbrios correspondente a um ligeiro aumento na proporção de cocos, ao longo da duração das culturas. Entretanto, como verificado na figura 8, a redução no volume das células foi evidente, representando um aumento na razão superfície-volume.



**Figura 9.** Frequências relativas dos morfotipos encontrados para as culturas experimentais da comunidade bacteriana em MOD liberada por *P. agardhii* nos diferentes dias de amostragem.

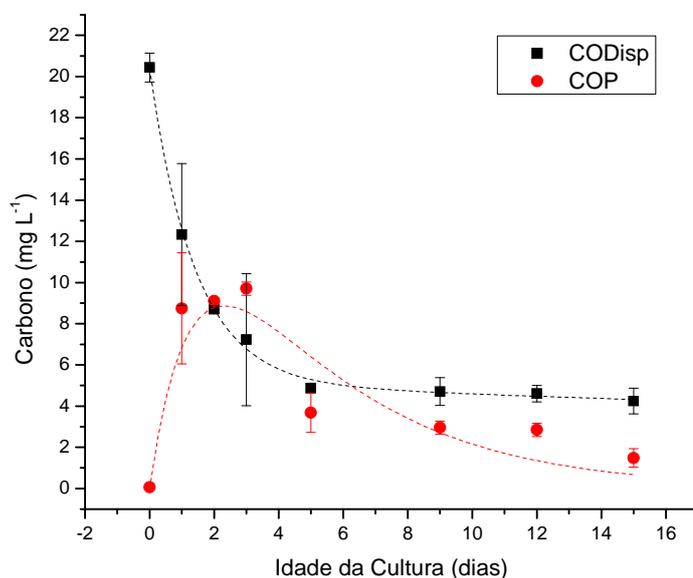
#### 4.3. Índice de Conversão Biovolume – Biomassa Bacteriana

O valor encontrado para o índice de conversão entre biovolume e biomassa de carbono bacteriana, utilizando os dados obtidos para a degradação de MOD de *P. agardhii* foi de  $0,355 \text{ pg C} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ . Para o nitrogênio, foi obtido, seguindo a mesma metodologia o índice de  $0,0853 \text{ pg N} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ .

#### 4.4. Experimento II: Degradação da biomassa fitoplanctônica de *P. agardhii*

A figura 10 apresenta a curva de decaimento, assim como o ajuste ao modelo cinético adotado, do carbono orgânico originário das células da cianobactéria e disponível (CODisp) para a degradação bacteriana. A fração particulada (COP)

correspondente às células bacterianas está representada na curva de formação e degradação dessa fração, juntamente com o ajuste ao modelo cinético.



**Figura 10.** Concentração de carbono ( $\text{mg L}^{-1}$ ) com desvio padrão ( $n=3$ ) e ajuste cinético da curva de decaimento do CODisp e de formação e degradação do COP em relação à duração da cultura experimental (em dias) utilizando com substrato o conteúdo intracelular (biomassa) de *P. agardhii*.  $R^2=0,99789$  (CODisp) e  $R^2=0,84$  (COP).

O CODisp, neste experimento, compreende a fração dissolvida (liberada pela lise das células durante o congelamento) somada a parte correspondente às células e/ou detritos da cianobactéria da fração particulada. A partir do terceiro dia de cultura, a participação em biomassa fitoplanctônica para a fração particulada foi considerada inexistente, sendo a partir desse momento, o carbono orgânico disponível igual ao carbono orgânico dissolvido. A fração particulada correspondente às células bacterianas

---

está representada na curva de formação e degradação dessa fração, juntamente com o ajuste ao modelo cinético (figura 10).

Foi possível observar um acentuado decaimento inicial do CODisp, com taxa ( $k_T$ ) de  $0,71 \text{ dia}^{-1}$ , gerando portanto um tempo de meia-vida de 0,97 dias. Considerando-se o tempo de amostragem, o processo de mineralização da fração lábil não pode ser completamente esclarecido, sendo visualizado, pelo modelo cinético, um aproveitamento maior da fração que correspondeu ao COP (biomassa bacteriana). A concentração de carbono residual (refratária; COD<sub>R</sub>) foi de  $5,07 \text{ mg L}^{-1}$ , ou seja, aproximadamente 24,9% da concentração inicial de carbono ( $20,37 \text{ mg L}^{-1}$ ). O coeficiente de mineralização da fração refratária ( $k_3$ ) é de  $0,01182 \text{ dia}^{-1}$ , com tempo de meia vida de 58,6 dias. A concentração máxima teórica de carbono encontrada para a fração particulada foi de  $15,31 \text{ mg L}^{-1}$ , e a taxa de decaimento ( $k_5$ ) encontrada para essa fração foi de  $0,235 \text{ dia}^{-1}$ .

As curvas de degradação do NODisp (cujo valor foi calculado de maneira similar à apresentada para o carbono orgânico disponível) e formação e degradação do NOP, juntamente com o ajuste matemático estão apresentados na Figura 11. Os parâmetros utilizados nos ajustes cinéticos e os valores das constantes encontrados estão disponíveis na Tabela 4, juntamente com o tempo de meia-vida e a eficiência dos processos analisados.

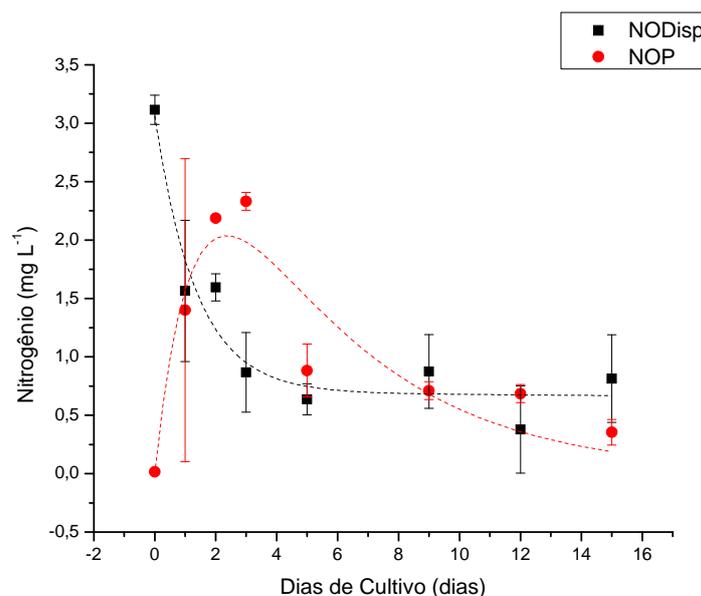
**Tabela 4.** Parâmetros obtidos na aplicação do modelo cinético da degradação do carbono orgânico disponível e nitrogênio orgânico disponível, nas culturas experimentais com biomassa de *P. agardhii*. [MODisp]<sub>i</sub> = concentração inicial de carbono ou nitrogênio orgânico disponível; MOD<sub>R</sub> = carbono ou nitrogênio orgânico residual na cultura; MOP = carbono ou nitrogênio orgânico particulado bacteriano;  $k_T$  = coeficiente de decaimento do MODisp;  $k_3$  = coeficiente de mineralização do MOD<sub>R</sub>;  $k_5$  = coeficiente de mineralização do MOP;  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida;  $R^2$  = coeficiente de determinação.

Recurso	[MODisp] <sub>i</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	$k_T$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	MOD <sub>R</sub> (%)	$k_3$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	$r^2$	MOP (%)	$k_5$ * (dias <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (dias)	$r^2$
CODisp	20,378	0,71	0,98	24,9	0,01182	58	0,99789	75,1	0,23515	2,95	0,84
NODisp	3,06	0,74	0,94	22,7	0,00275	252	0,93088	110 <sup>†</sup>	0,21553 <sup>†</sup>	3,22 <sup>†</sup>	0,85512 <sup>†</sup>

\* Parâmetros obtidos segundo o modelo cinético, descrito no item *modelo cinético* da seção Material e Métodos

<sup>†</sup> A aplicação do modelo cinético para a assimilação e degradação da NOP apresentou problemas de acoplamento das equações, discutidos posteriormente.

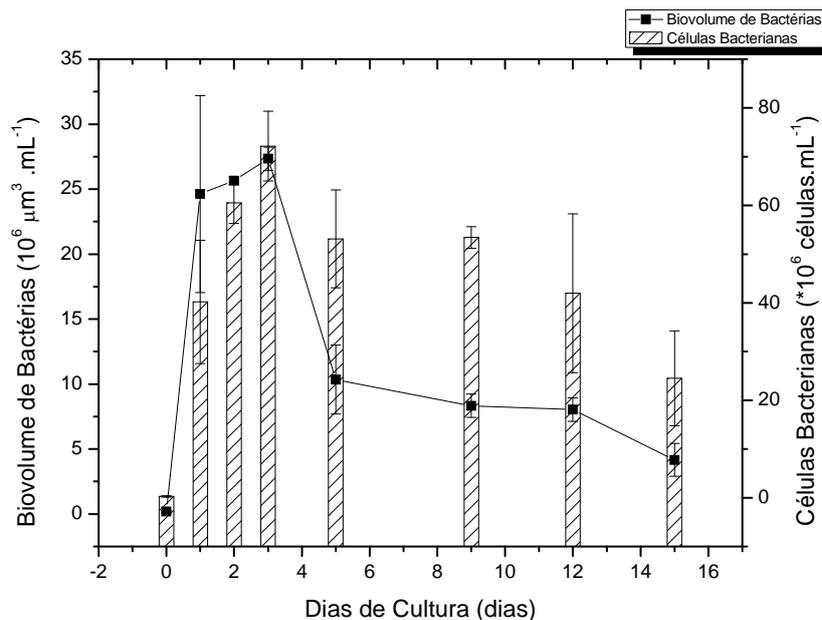




**Figura 11.** Curva de decaimento do NODisp nas culturas com biomassa de *P. agardhii* e formação e decaimento do produto intermediário (NOP). Os ajustes foram realizados de acordo com o modelo cinético adotado. Valores expressos em  $\text{mg L}^{-1}$ , com desvio padrão ( $n=3$ ) em relação à duração da cultura em dias.

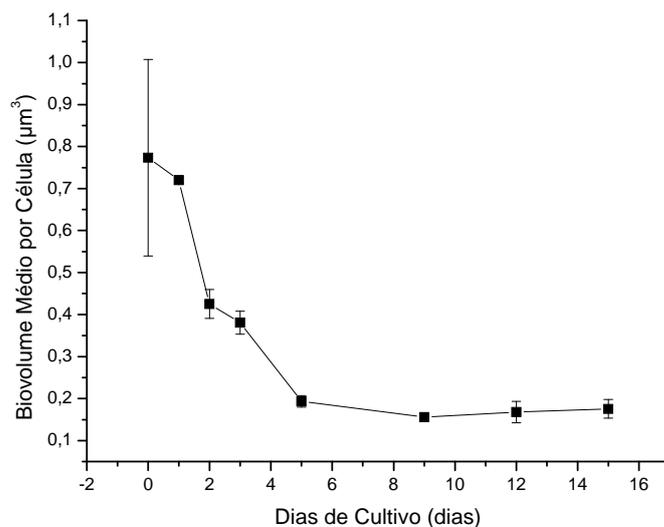
A degradação do nitrogênio orgânico disponível (NODisp, figura 11) neste experimento apresentou um padrão muito semelhante ao verificado para a degradação do CODisp, com  $(k_T)$  de  $0,74 \text{ dia}^{-1}$ , gerando portanto um tempo de meia-vida de 0,94 dias.

De acordo com os dados de contagem de células bacterianas, como apresentados na figura 12, juntamente com biovolume total estimado por mL da cultura, foi possível observar um pico na comunidade bacteriana no dia 2 de cultura, alcançando o valor máximo de  $7,2 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , seguido de um declínio moderado no número de células, mais acentuado quando analisado o biovolume total.



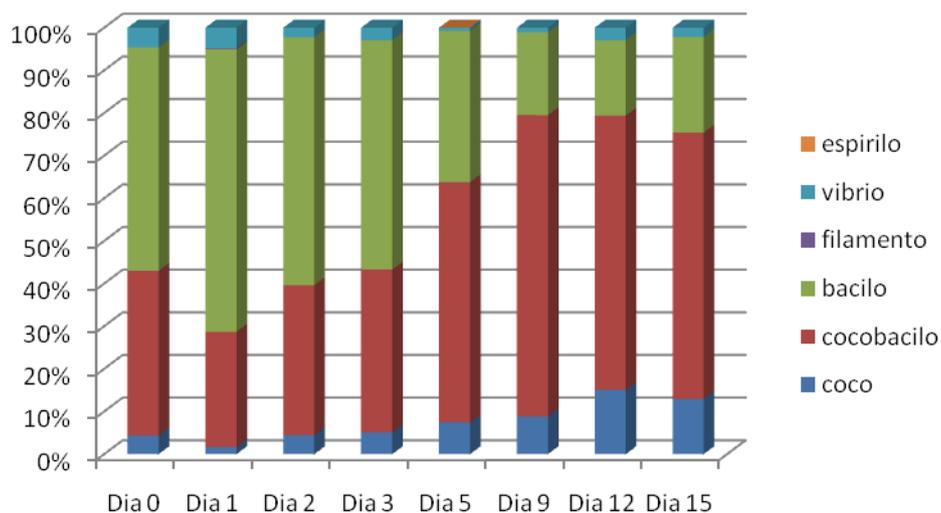
**Figura 12.** Concentração de células bacterianas (células  $\text{mL}^{-1}$ ) e biovolume total por mL (em  $\mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) na cultura experimental com biomassa de *P. agardhii* como fonte de carbono e nitrogênio em relação ao tempo de duração do experimento (em dias).

A redução no biovolume total das amostras está relacionada à redução verificada no biovolume médio por célula bacteriana nas culturas (figura 13), que reduziu de  $0,774 \pm 0,234 \mu\text{m}^3$  (média  $\pm$  DP) no início da cultura, para  $0,175 \pm 0,022 \mu\text{m}^3$  após os 15 dias de duração da cultura experimental.



**Figura 13.** Biovolume médio ( $\pm$  DP, em  $\mu\text{m}^3$ ) obtido para células bacterianas presentes nas culturas experimentais com o conteúdo intracelular de *P. agardhii* como substrato, em relação ao tempo de duração dos experimentos (em dias).

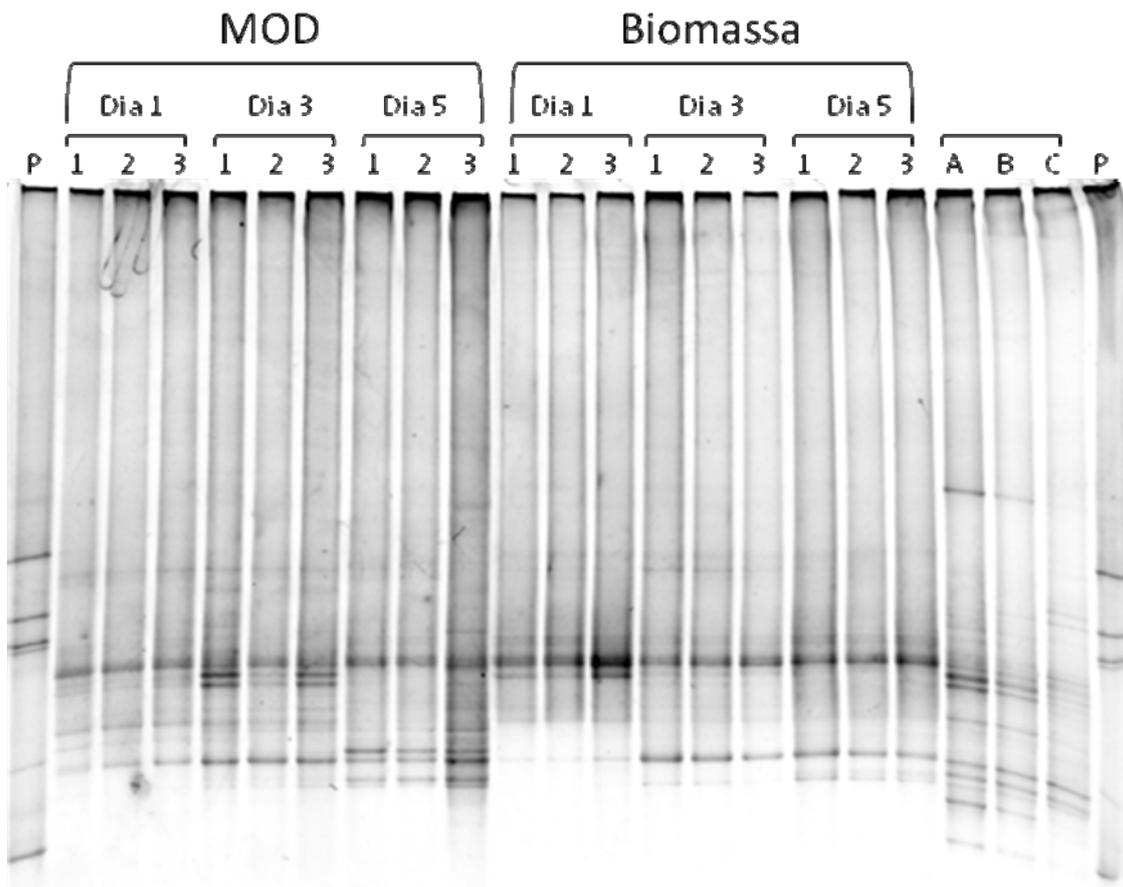
Diferentemente do observado para a degradação da MOD, durante a degradação da biomassa celular de *P. agardhii* foi possível notar uma alteração nas freqüências relativas dos morfotipos encontrados (figura 14), com um aumento dos cocobacilos e cocos em detrimento dos bacilos, ao decorrer dos 15 dias de experimento.



**Figura 14.** Frequências relativas dos morfotipos encontrados para as culturas experimentais da comunidade bacteriana em biomassa de *P. agardhii* nos diferentes dias de amostragem.

#### 4.5. Genética da comunidade bacteriana

Foi possível observar, com base na Figura 15, diferentes padrões de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e quantidades quando comparados os dias 1, 3 e 5 de cultura experimental, o que ocorreu para as culturas com MOD e para as culturas com biomassa. Cada UTO pode vir a ser identificada como uma espécie ou gênero diferente presente na comunidade bacteriana. Para as culturas com MOD, a maior diversidade de UTOs ocorreu no dia 3, apresentando, porém, padrões diferentes bem visíveis entre os dias. Para as culturas com biomassa algal, também é possível verificar diferenças entre as UTOs nos dias 1, 3 e 5, porém as diferenças são menos evidentes que as encontradas para a MOD. Entre as réplicas de cultura, de um mesmo dia de experimento, os padrões do gel foram semelhantes.



**Figura 15.** Gel de DGGE da comunidade bacteriana para os dias 1, 3 e 5 de amostragem, nas culturas experimentais com MOD e Biomassa como substrato. P = padrão; 1, 2 e 3 representam as réplicas de cultura em cada dia de amostragem; A, B e C representam, respectivamente, dias 1, 3 e 5 de uma cultura controle, onde não estavam presentes fontes de nitrogênio.



## 5. DISCUSSÃO

A caracterização parcial dos substratos utilizados para a montagem do experimento permitiu um levantamento dos nutrientes disponíveis para o estabelecimento da comunidade bacteriana, verificando as diferenças entre esses grupos e como poderiam afetar o estabelecimento dos diferentes grupos. Podem ser ressaltados os valores elevados de fosfato disponível, em ambas as soluções. Esses estão relacionados, no caso da matéria orgânica dissolvida, aos resíduos de fosfato presentes no meio de cultura disponibilizado para o crescimento de *P. agardhii*. Entretanto, na solução com conteúdo celular de *P. agardhii*, esses valores podem estar relacionados com o acúmulo de polifosfato, que é característico de algumas cianobactérias (Jensen, 1969; Grillo e Gibson, 1979).

A degradação do carbono orgânico em ambos os experimentos (MOD e biomassa), de acordo com o modelo cinético, apresentou duas fases distintas: uma fase inicial de rápido decaimento da concentração do COD<sub>Disp</sub>, indicada pelos altos valores de  $k_T$  obtidos (tabelas 3 e 4) e conseqüentemente baixos valores de meia-vida (1,12 dia para MOD e 0,97 dia para biomassa), seguida de uma fase lenta de degradação do COD<sub>R</sub>, refletida pelos valores mais baixos de  $k_3$ . Pode ser observada uma representativa quantidade de carbono residual nas culturas (37,4% e 24,9%, nas culturas com MOD e biomassa, respectivamente), o que justifica a constante ocorrência de altas concentrações de carbono disponíveis naturalmente no reservatório de Barra Bonita (Bittar, 2010). Esse carbono residual está provavelmente relacionado a uma menor disponibilidade dos compostos, devido, provavelmente, à maior dificuldade de degradação pela comunidade bacteriana, visto que compostos diferentes, como polissacarídeos, podem ser mais ou menos degradáveis por bactérias (Giroldo, 2003), ou ainda a alguma especificidade a grupos bacterianos adaptados (Bell, 1984;

Fallowfield e Daft, 1988). Entretanto, a própria degradação bacteriana pode produzir compostos refratários, como observado para MOD de *Microcystis aeruginosa* (Bittar, 2010). Esse carbono residual pode alcançar o fundo do reservatório e tornar-se temporariamente indisponível na ciclagem de nutrientes. Entretanto, devido à operacionalidade da usina hidrelétrica de Barra Bonita, e ao alto tempo de retenção desses compostos refratários (49 e 58 dias para MOD e biomassa, respectivamente) esses compostos residuais podem ser importantes inclusive para áreas a jusante do reservatório, pela possível exportação dos compostos.

Os valores de  $R^2$  encontrados para ambas as curvas de decaimento ( $R^2 = 0,9049$  para as culturas com MOD e  $R^2 = 0,99789$  para biomassa) oferecem embasamento para a boa aplicabilidade do modelo adotado nos dados obtidos experimentalmente. As respostas obtidas são similares aquelas obtidas por Moreira *et al.* (no prelo) para a degradação da fração menor que 3 KDa da MOD de *Microcystis aeruginosa*, cujos dados foram ajustados segundo o mesmo modelo cinético, em que os autores obtiveram os valores de  $k_T = 0,736 \text{ dia}^{-1}$  e  $k_3 = 0,008 \text{ dia}^{-1}$ .

A incorporação do carbono orgânico à biomassa bacteriana mostrou-se bastante eficiente, chegando a 62% nas culturas com MOD de *P. agardhii* e 75% nas culturas com biomassa fitoplanctônica. Estudos realizados por Jensen (1983), em laboratório, também encontraram que até 91% do COD liberado pelo fitoplâncton foi incorporado pela comunidade bacteriana em um experimento com duração de horas. A assimilação bacteriana do carbono é interessante por permitir a entrada na cadeia alimentar aquática desses compostos, além da possível reintrodução dos nutrientes nas transferências energéticas, com base nas vias alternativas, no processo conhecido como ‘*microbial loop*’ (Azam *et al.*, 1983). As taxas de mineralização do carbono particulado (bacteriano) apresentaram uma sensível diferença entre os experimentos, com o valor de

$k_5=0,23515 \text{ dia}^{-1}$  para a biomassa de células e de  $k_5=0,47722 \text{ dia}^{-1}$  para o COP da MOD, o que pode refletir diretamente diferenças nas comunidades bacterianas em questão, ou ainda pode estar relacionada à adequabilidade do modelo aplicado, visto os valores de  $R^2$  ( $R^2=0,425$  para MOD e  $R^2=0,84$  para biomassa). Pode-se ainda citar uma possível especificidade de grupos da comunidade bacteriana, que possuem maior ou menor habilidade para decomposição dos produtos intermediários da degradação, devido à especificidade da relação bactéria-substrato (Sugita *et al.*, 1987; Jannasch, 1967; Giroldo, 2003), ou podem ainda estar ligados às baixas concentrações de nitrogênio disponível, exigindo grupos bacterianos mais adaptados à captura de nutrientes em baixas concentrações, como verificado por Bell (1984), que verificou o favorecimento de grupos específicos adaptados quando os nutrientes se encontram em baixas concentrações, o que é facilmente revertido quando os nutrientes são oferecidos em quantidades maiores. (Jannasch, 1967; Bell, 1984)

Comparando-se os dois substratos utilizados para a degradação, MOD e biomassa da cianobactéria, foram encontradas taxas relativamente semelhantes na degradação, com uma utilização muito rápida (primeiros 3 dias) do estoque de carbono mais disponível e uma segunda fase, com decaimento lento, gerando tempo de meia-vida até 60x maior. Ambas as fontes de carbono mostraram-se interessantes para a comunidade bacteriana do reservatório de Barra Bonita, o que pode ser entendido como a presença de indivíduos mais generalistas, ou ainda, adaptados às constantes florações, visto a constante ocorrência dessa cianobactéria no reservatório de Barra Bonita (Dellamano-Oliveira, 2006). Torna-se interessante ressaltar, entretanto, que o processo de montagem do experimento com a biomassa bacteriana pode ter levado à lise de parte das células devido ao processo de congelamento acelerando a disponibilidade imediata dos compostos para o consumo bacteriano.

A degradação do nitrogênio orgânico em ambos os experimentos foi ajustada para o mesmo modelo cinético empregado para a degradação do carbono. Entretanto, houve uma diferença perceptível entre a degradação da MOD e da biomassa fitoplanctônica em termos de coeficientes de decaimento, influenciando no tempo de meia-vida e no aproveitamento dos processos. Nas culturas com MOD de *P. agardhii* a taxa de decaimento encontrada foi alta, quando comparada à degradação do carbono ( $k_T=1,5 \text{ dia}^{-1}$ ), gerando um tempo de meia vida de 0,46 dia. Entretanto, foi observada a formação de grande concentração de  $\text{NOD}_R$ , chegando a 70% do valor inicial disponível. Por outro lado, no experimento com a biomassa fitoplanctônica, as taxas de decaimento ( $k_T = 0,73667 \text{ dia}^{-1}$ ) e a eficiência de formação de  $\text{NOD}_R$  (22,7%) foram semelhantes às encontradas para o decaimento do carbono orgânico nessas culturas. Houve ainda grande diferença nos coeficientes de mineralização ( $k_3$ ) dos compostos nitrogenados residuais ( $\text{NOD}_R$ ) nos experimentos, com uma variação do tempo de meia-vida, que foi de 36 dias nas culturas com MOD para 252 dias nas culturas de degradação da biomassa fitoplanctônica. Essas diferenças podem estar refletindo uma variação na natureza desses compostos, demonstrando maior ou menor acessibilidade para as bactérias responsáveis pela mineralização, assim como a disponibilidade da utilização desses compostos como fonte única de nitrogênio nas culturas, visto que a concentração oferecida foi diferente entre os experimentos, e que quantidades limitantes de nutrientes podem favorecer um grupo, em detrimento de outros, menos adaptados (Bell, 1984; Jannasch, 1967). O processo exato da decomposição/assimilação dos compostos nitrogenados não foi corretamente previsto pelo modelo cinético adotado devido provavelmente, ao rápido “turnover” que pode ocorrer entre as diferentes populações bacterianas, onde os compostos são liberados e rapidamente captados por outras populações bacterianas, inclusive em períodos menores que os utilizados entre as

amostragens. Assim, o modelo considera a captação desses nutrientes mais de uma vez, gerando um desacoplamento entre a quantidade disponível inicialmente e a quantidade utilizada pelos organismos. Portanto, as eficiências exatas de produção e mineralização da fração particulada do nitrogênio orgânico não foram completamente esclarecidas, sendo necessárias verificações de modelos matemáticos mais adaptados aos dados disponíveis, ou de períodos de amostragens diferentes para melhor abrangência desses processos.

É importante notar, visto que o material empregado nesses experimentos é originário de uma cultura axênica, que não houve nenhuma manipulação anterior à inserção da comunidade bacteriana experimental, tornando possível analisar o processo de degradação desses compostos desde o início da sua disponibilidade, simulando a liberação desse material no reservatório pela população desta cianobactéria e a sua utilização pela comunidade heterotrófica de bactérias, o que é comum nos períodos de floração. Deve-se ressaltar, entretanto, que em um reservatório são diversas as fontes, autóctones e alóctones, de carbono e nitrogênio orgânico (Dellamano-Oliveira *et al.*, 2007; Tundisi *et al.*, 2008), mantendo uma oferta contínua e variada de altas concentrações desses compostos, o que pode estar relacionado inclusive com a seleção de espécies bacterianas adaptadas às diferentes fontes, tópico que será discutido nos próximos itens.

Analisando a concentração de células bacterianas, apresentadas nas Figuras 7 e 12, são verificados picos no segundo e terceiro dias de cultura, em ambos os experimentos, alcançando os maiores valores nas culturas com biomassa fitoplanctônica, e a partir do quinto dia de cultura tornou-se clara uma redução na abundância de células bacterianas na cultura. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Chróst *et al.* (1989) em experimentos com amostras ambientais de

matéria orgânica proveniente de um lago temperado eutrofizado, e por Moreira et al (no prelo), em experimentos de degradação da MOD de diferentes classes de tamanho, obtida de culturas de *Microcystis aeruginosa*. É necessário ressaltar que embora os picos sejam apresentados no mesmo momento das culturas, as concentrações encontradas nos experimentos com biomassa foram até duas vezes maiores que as encontradas nos experimentos com MOD. Visto que a oferta de carbono orgânico inicial foi semelhante em ambos os experimentos, e que o mesmo pode ser argumentado sobre a disponibilidade de fósforo (Tabela 2), essa diferença pode ser atribuída à qualidade e à quantidade do nitrogênio orgânico disponível (única fonte desse elemento oferecida nesses experimentos). Não se pode descartar, entretanto, uma possível especificidade das espécies bacterianas com o substrato apresentado nas culturas de biomassa fitoplanctônica, visto que alguns trabalhos já mostraram que ocorre seleção de bactérias que se associam aos polissacarídeos das cápsulas de espécies de cianobactérias (Caldwell e Caldwell, 1978; Paerl, 1992; Kapustina, 2006; Bagatini, 2008).

O biovolume total de células na cultura bacteriana, apesar do pico conjunto com o da concentração de células no segundo dia de experimento, apresentou um comportamento diferente nos dias subsequentes, apresentando uma queda mais acentuada em função do tempo de cultivo, que está relacionada à contínua redução, ao longo do experimento, do biovolume médio por célula bacteriana. O comportamento do tamanho das células acompanhando a redução na disponibilidade de nutrientes é um fato já descrito para espécies fitoplanctônicas (Lewis Jr, 1976; Asknes e Egge, 1991) e para bactérias (Kjelleberg e Hermansson, 1984), visto que uma redução no tamanho das bactérias está ligada ao aumento na razão superfície:volume, o que aumenta a capacidade de captura (encontro) dos nutrientes em ambientes limitantes.

Considerando-se os morfotipos bacterianos nas culturas experimentais com MOD, não foi possível evidenciar um processo de sucessão, pois foi mantida uma predominância dos cocobacilos e bacilos, em proporções semelhantes, durante todo o experimento, em proporções semelhantes. Foi observado apenas um ligeiro aumento no número de cocos, além da redução no biovolume médio por células, como já discutido anteriormente, o que ainda pode ser um importante indicativo da sucessão. A ausência de variações nos morfotipos também pode ser indicativa de uma comunidade bacteriana já especializada nos substratos de *P. agardhii* pelos constantes influxos desse material no reservatório ao longo do ano.

Para as culturas com biomassa fitoplanctônica como substrato, entretanto, foi verificada uma dominância inicial dos bacilos (com frequências entre 52 e 66%) até o terceiro dia de experimento, que foram gradualmente substituídos por cocobacilos e cocos, que chegam a representar em conjunto, 80% da comunidade bacteriana total no 12º dia de cultura. Esses dados estão de acordo com a mudança nos substratos disponíveis para a degradação bacteriana nessas culturas, quando os compostos particulados já foram liberados pelas células fitoplanctônicas, restando somente os compostos dissolvidos para a degradação. Na literatura, os diferentes morfotipos celulares podem ser relacionados a atividades fisiológicas preferencialmente desempenhadas pelos grupos (Cottrell e Kirchman, 2004; Nielsen *et al.*, 2006) tornando-os especialistas na degradação de diferentes compostos orgânicos. Assim, as diferenças entre os morfotipos celulares bacterianos podem ser importantes indicativos da ocorrência de um processo sucessional na comunidade, que poderá ser confirmado pela análise genética das amostras, com DGGE, e posterior seqüenciamento do DNA para identificação dos organismos.

A análise genética por DGGE da comunidade bacteriana encontrada nas culturas experimentais com MOD parece demonstrar a existência de um evento de sucessão na comunidade bacteriana, visto que podem ser identificados padrões diferentes de distribuição das UTOs nos diferentes dias de cultura. Essas alterações na comunidade podem estar relacionadas a alterações nas formas disponíveis de carbono e nitrogênio na cultura, evento que pode selecionar grupos mais ou menos específicos a um substrato disponível, ou que ainda pode favorecer competitivamente um grupo em relação ao restante da comunidade. Para a comunidade bacteriana das culturas experimentais com biomassa também é possível observar padrões diferentes de distribuição das UTOs no gel, embora estes sejam menos evidentes que os encontrados nas culturas com MOD.

Embora a identificação das bactérias não tenha sido completa, foi possível verificar, pela análise da imagem do gel de DGGE, diferenças nas comunidades bacterianas apresentadas para as culturas com MOD e biomassa como substrato, o que pode ser indicativo do favorecimento, pelos compostos presentes nas culturas, ao desenvolvimento de algumas espécies em detrimento de outras, demonstrando especificidade ao substrato.

Os dados obtidos nesse estudo permitem simular os efeitos de uma floração de *P. agardhii* no reservatório de Barra Bonita, quantificando o consumo da MOD (carbono e nitrogênio) disponível pelo bacterioplâncton, a eficiência de incorporação desses compostos à biomassa bacteriana e projetar ainda efeitos a jusante do reservatório, pela possível exportação dos compostos refratários formados. Entretanto, em reservatórios, o acúmulo de nutrientes é um fator maior que a exportação dos mesmo, e assim, a dinâmica da degradação e os substratos e sua relação com a determinação da comunidade bacteriana do ambiente foram fatores importantes, verificando-se inclusive um possível processo de sucessão.

## 6. CONCLUSÕES

O carbono e o nitrogênio orgânicos provenientes da cultura de *Planktothrix agardhii*, apresentados na MOD ou na biomassa, mostraram-se fontes viáveis desses compostos para a comunidade bacteriana do reservatório de Barra Bonita, visto que populações diversas foram mantidas.

A degradação dos compostos ocorreu de forma rápida (primeiros 3 dias), demonstrando uma biodisponibilidade imediata desses compostos, porém, uma fração residual foi constatada, com coeficiente de degradação mais lento, o que pode ter implicações para ambientes a jusante do reservatório após os eventos de florações, devido à possibilidade de exportação desses compostos.

As análises de morfotipos bacterianos, combinadas com uma análise preliminar de um gel de DGGE (embora ainda seja necessário o seqüenciamento das bandas para identificação dos grupos) sugeriram evidências de um processo de sucessão bacteriana, que pode estar ligado à biodisponibilidade dos compostos presentes, e portanto, diretamente acoplado ao processo de degradação.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSNES, D.L.; EGGE, J.K. 1991. A theoretical model for nutrient uptake in phytoplankton. *Mar. ECOL. Prog. Ser.*, 70: 65-72.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMAREK, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3 -- Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. Suppl. 80, Algological Studies*.

ANTIA, N. J.; HARRISON, P. J.; OLIVEIRA, L. 1991. Phycological reviews: the role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology, and ecology. *Phycologia* 30: 1-89

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 10: 257-263

BAGATINI, I. L. 2008. Associação de Bactérias à Cápsula de *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) em cultura. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 70 pp

BELL, R.T.; KUPARINEN, J. 1984. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden. *Applied Environmental Microbiology* 48: 1221-1230

BELL, W. H. 1984. Bacterial adaptation to low nutrient conditions as studied with algal extracellular products. *Microbial Ecology* 10 (3): 217-230

BELL, W. H.; MITCHELL, R. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin* 143: 265-277

BELL, W. H.; SAKSHAUG, E. 1980. Bacterial utilization of algae products. II: a kinetic study of natural population. *Limnology and Oceanography* 19: 833-839.

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: 506-518

BITTAR, T.B. 2010. Fotorreatividade e biodisponibilidade da matéria orgânica dissolvida produzida por *Microcystis aeruginosa*. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

BROCK, T. D.; CLYNE, J. 1984. Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 47: 731-734

BRONK, D. A. 2002. Dynamics of dissolved organic nitrogen. In: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Eds. Hansell, D. A. and Carlson, C. A. p. 153-247

BRONK, D. A.; GILBERT, P. M.; WARD, B. B. 1994. Nitrogen uptake, dissolved organic nitrogen release, and new production. *Science* 265: 1843-1846.

BRONK, D. A.; WARD, B. B. 1999. Gross and net nitrogen uptake and DON release in the euphotic zone of Monterey Bay, California. *Limnology and Oceanography* 44: 573-585.

CALDWELL, D. E; CALDWELL, S. J. 1978. A *Zoogloea* sp. associated with blooms of *Anabaena flos-aquae*. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 922-931

CHRÓST, R. J.; MIINSTER, U.; RAI, H.; ALBRECHT, D.; WITZEL, P. K.; 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.

COLE, J. J.; LIKENS, G. E.; STRAYER, D. L. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography* 27: 1080-1090.

COLOMBO, V. 2006. Polissacarídeos Extracelulares e atividade enzimática das glicosidases no reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil. *Tese Doutorado*. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 103p.

COLOMBO, V.; VIEIRA, A. A. H.; MORAES, G. 2004. Activity of glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on the degradation of extracellular polysaccharides produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). *Revista de Microbiologia* 35: 110-116

COTTRELL, M.T.; KIRCHMAN, D.L. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnology and Oceanography* 48 (1): 168-178.

DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; COLOMBO-CORBI, V. ; VIEIRA, A.A.H. 2007. Dissolved carbohydrates from Barra Bonita Reservoir (São Paulo State, Brazil) and its relationships with phytoplanktonic abundant algae. *Biota Neotropica* 7(2): 59-66

DELLAMANO-OLIVEIRA, M. J. 2006. Comunidade fitoplanctônica do reservatório de Barra Bonita e sua relação com a composição e concentração de polissacarídeos extracelulares e agregados gelatinosos. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São-Carlos, São-Carlos, SP, 99 p.

DIAZ, F.; RAIMBAULT, P. 2000. Nitrogen regeneration and dissolved organic nitrogen release during spring in the north-western Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions): Implications for the estimation of new production. *Marine Ecology Progress Series 197*: 53-66.

DUCKLOW, H. W.; CARLSON, C. A. 1992. Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology 12*: 113-181

FALLOWFIELD, H. J.; DAFT, M. J. 1988. The extracellular release of dissolved organic carbon by freshwater bacteria and algae and the interaction with *Lysobacter* CP-1. *European Journal of Phycology 23* (4): 317-326

FOGG, G. E. 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina 26*: 3-14

GIROLDO, D. 2003. Especificidade em associações alga/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados por três espécies fitoplanctônicas de um reservatório tropical eutrófico do estado de São Paulo (Barra Bonita). *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 152 pp.

GRILLO, J. R.; GIBSON, J. 1979. Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. *Journal of Bact.* 140: 508-517.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U. T.; KIM, W. K. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie 15*: 769-780.

GUILLARD, R. R. L.; WANGERSKY, P. J. 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography 4*: 449-454

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. 1997. Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied Environmental Microbiology* 63:3233-3241.

JANNASCH, H. W. 1967. Enrichments of aquatic bacteria in continuous culture. *Arch. Mikrobiol.* 59:165–173.

JENSEN, L. M. 1983. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight composition, and bacterial assimilation. *Marine Ecology Progress Series* 11 (1): 39-48.

JENSEN, T. E. 1969. Fine structure of developing polyphosphate bodies in a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *Archives für Mikrobiologie* 67: 328-338.

KAPUSTINA, L. L. 2006 Experimental study of *Microcystis*-associated and free-living bacteria. *Microbiology* 75: 606-610

KJELLEBERG, S.; HERMANSSON, M. 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Applied Environmental Microbiology* 48:497–503.

LEE, D. Y.; RHEE, G. Y. 1997. Kinetics of cell death in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* and the production of dissolved organic carbon. *Journal of Phycology* 33: 991-998.

LEWIS JR, W. R. 1976. Surface/volume ratio: Implications for phytoplankton morphology. *Science* 192:885-887.

LOWRY, O. H.; ROSENBOUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

MACKERETH, F. J. H., HERON, J.; TALLING, J. F. 1978. Water analysis: Some revised methods for limnologists. *Freshwater Biological Association*. Scientific Association. Kendall: Titus Wilson & Son Ltd. 117p.

MAGUE, T. H.; FRIBERG, E.; HUGHES, D. J.; MORRIS, I. 1980 Extracellular release of carbon by marine phytoplankton: a physiological approach. *Limnology and Oceanography* 25: 262-279

MATSUMURA-TUNDISI, T.; TUNDISI, J. G. 2005. Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). *Hydrobiologia* 542: 367-378.

MEFFERT, M.E.; ZIMMERMANN-TELSCHOW, H. 1979. Net release of nitrogenous compounds by axenic and bacteria-containing cultures of *Oscillatoria redekei* (Cyanophyta). *Archiv für Hydrobiologie*, vol. 87, p. 125-138.

MOREIRA, I. C.; VIEIRA, A. A. H.; BIANCHINI JR, I. (no prelo) Degradation of dissolved organic matter released by *Microcystis aeruginosa* and morphological characterization of bacterial community. *Brazilian Journal of Biology*

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. *Applied Environmental Microbiology* 59: 695-700

- MUYZER, G.; SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141
- NEWELL, R. C.; LUCAS, M. I.; LINLEY, E. A. S. 1981. Rate of degradation and efficiency of conversion of phytoplankton debris by marine microorganisms. *Marine Ecology Progress Series* 4: 1-7
- NIELSEN, J. L.; KLAUSEN, C.; NIELSEN, P. H.; BURFORD, M.; JÖRGENSEN, N. O. G. 2006. Detection of activity among uncultured *Actinobacteria* in a drinking water reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 432-438.
- OLIVEIRA, V. M.; FANTINATTI, F.; MANFIO, G. P.; DESTÉFANO, S. A. L.; PIZA, F. F. 2000 Métodos moleculares para a caracterização de diversidade microbiana. *Apostila Teórica de curso de treinamento*, Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil.
- PAERL, H. W. 1992. Epi-and endobiotic interactions of cyanobacteria. In: REISSER, W. (ed) *Algae and Simbioses: Plants, Animals. Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Biopress, England, pp 537–565.
- PERET, A. M.; BIANCHINI JR, I. 2004. Stoichiometry of aerobic mineralization (O/C) of aquatic macrophytes leachate from a tropical lagoon (São Paulo - Brazil). *Hydrobiologia* 528: 167-178.
- PORTER, K. G.; FEIG, T. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.
- PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P. 1993. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, New York, 994 p.

PUDDU, A.; ZOPPINI, A.; FAZI, S.; ROSATI, M.; AMALFITANO, S.; MAGALETTI, E. 2003. Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbial Ecology* 46: 257-268.

RACY, F.; GODINHO, M. J. L.; REGALI-SELEGHIM, M. H.; BOSSOLAN, N. R. S.; FERRARI, A. C.; LUCCA, J. V. 2005. Assessment of the applicability of morphological and size diversity indices to bacterial populations of reservoirs in different trophic states. *Acta Limnologica Brasiliensia* 17 (4): 395-408.

REYNOLDS, C. S. 1999. Phytoplankton assemblages in reservoirs. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. (Eds.) *Theoretical reservoir ecology and its applications*. Brazilian Academy of Sciences, International Institute of Ecology/Backhuys Publishers, p. 439-456

RIEMANN, B.; SØNDERGAARD, M.; SCHIERUP, H. H.; BOSSELMANN, S.; CHRISTENSEN, G.; HANSEN, J.; NIELSEN, B. 1982. Carbon metabolism during a spring diatom bloom in the eutrophic Lake Mossø. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* 67: 145-185

SOLORZANO, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite methods. *Limnology and Oceanography* 14: 799-801

SØNDERGAARD, M.; JENSEN, L. M. 1986. Phytoplankton. In Riemann, B; Søndergaard, M. [eds.], *Carbon dynamics in eutrophic temperate lakes*. Elsevier, p. 27-112.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. 1960. A manual of seawater analysis. *Bull. Fisheries Res. Board Can.*, 125: 185 p.

SUGITA, H.; OSHIMA, K.; FUSHIRO, T.; DEGUCHI, Y. 1987. Substrate specificity of heterotrophic bacteria in the water and sediment of a carp culture pond. *Aquaculture* 64(1): 39-46.

SUN, J.; LIU, D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331-1346

THOMAS, J. D. 1997. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* 38: 1-36

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; ABE, D. S. 2008. A dinâmica ecológica da represa de Barra Bonita: as implicações na sua biodiversidade. *Brazilian Journal of Biology* 68 (4): 1079-1098

VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T.; SARTORI, A. L. 1998. Release of dissolved organic matter in a tropical strain of *Synura petersenii* (Chrysophyceae) grown under high irradiances. *Phycologia* 37: 357-362

VISSER, P. M.; IBELINGS, B. W.; MUR, L. R.; WALSBY, A. E. 2005. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. In: *Harmful Cyanobacteria*, Springer, 2005 (Ed. Por Huisman, J.; Matthijs, H. C. P.; Visser, P. M.), pp. 109-142, Netherlands.

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

WOOD, A. M.; VAN HALEN, L. M. 1990. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine Microbial Food Webs* 4: 103-116