



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
Via Washington Luiz, Km. 235 – Caixa Postal 676
Telefax: (016) 260-8305
CEP 13.565-905 – São Carlos – SP – Brasil
Home page: <http://www.ufscar.br/~ppgem/>
E-mail: ppgem@power.ufscar.br



**Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos da
comunidade bacteriana em diferentes escalas trófica e
temporal, em reservatórios.**

FERNANDO PAULO PEREIRA RACY

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

SÃO CARLOS
2004

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

R123an

Racy, Fernando Paulo Pereira.

Aspectos numéricos, morfológicos e morfométricos das comunidades bacterianas em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios / Fernando Paulo Pereira Racy. - São Carlos : UFSCar, 2005.
63 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Efeitos de aspectos específicos do ambiente sobre os organismos. 2. Bactérias. 3. Morfologia. 4. Morfometria. 5. Estado trófico. 6. Densidade. I. Título.

CDD: 574.5222 (20^a)

Profª Drª MIRNA JANUÁRIA LEAL GODINHO – Orientadora

Profª Drª MIRNA HELENA REGALI-SELEGHIM – Co-orientadora

“Nenhum homem é uma ilha”
(E. Hemmingway)

Dedico...

à Julinha – in memoriam – mineirinha guerreira de alma generosa que me deu à luz e nossas vidas;

à Elza – pelos filhos concedidos e pela dedicação de quase toda uma vida;

à Érika, Fabíola, Rodrigo e Flávio, Yara, André – eles genéticos que perpetuar-me-ão pelas gerações futuras – pelo estímulo que representam em cada hora de desencanto, de desalento;

às Mirnas – Januária e Helena – por terem mostrado-me o caminho.

AGRADECIMENTOS

Prof. CARLOS OSÓRIO DE SOUZA CALDAS – quem por primeiro ensinou-me que “*biologia é o estudo da vida*”, mostrou-me o primeiro microscópio e, nele, o primeiro microrganismo que vi: um “chininho” (paramécio);

Prof. Dr. WARWICK ESTEVAM KERR – um mentor,,, um pai científico e político;

Prof^a. Dr^a. CATARINA TAKAHASHI – pelo estímulo e clareza ao indicar-me um caminho adequado ao meu perfil;

Prof^a. Dr^a. TERESA KAZUKO MURAOKA – pela pergunta que transformou-se em realidade: “*Por que você não vai fazer uma pós-graduação em Ecologia?*” e por ter insistido em que fizesse um mini-curso “*sobre rios com o pessoal de São Carlos*” ao invés do sobre transgênicos.

Profs. Drs. JOÃO A. da SILVA SÉ, CARLOS EDUARDO MATHEUS e Prof^a AMÉRICA JACYNTHA – por terem reacendido em mim o amor pela Ecologia através da “*visão holística da bacia hidrográfica*”;

Prof. Dr. IRINEU BIANCHINI JÚNIOR – quem por primeiro – à sua conta e risco – abriu-me as portas à UFSCar, como ouvinte, em sua disciplina na pós-graduação;

Prof^a Dr^a MIRNA JANUÁRIA LEAL GODINHO – pela insana lucidez de aceitar o desafio de orientar-me e a capacidade imensa em me aturar;

Prof^a Dr^a MIRNA HELENA REGALI-SELEGHIM – mais que uma co-orientadora: amiga, companheira e cúmplice;

Prof^a Dr^a ODETE ROCHA – mais uma mineirinha de coração tão grande – ou maior – que seus imensuráveis conhecimentos, pelo afeto, compreensão e auxílio na realização deste trabalho;

Prof^a ANA CAROLINA FERRARI – parceirinha querida que desbravou no nosso laboratório os caminhos que palmilhei e colaborou imensamente em minha preparação para a seleção ao mestrado;

Prof^a Dr^a NELMA REGINA C. BOSSOLAN – parceira e amiga nova que tantos conhecimentos ofereceu e muito contribuiu para a qualidade deste trabalho;

Prof. JOSÉ VALDECI LUCCA – também parceiro e amigo que muito me ensinou e não mediu esforços para ajudar-me a transformar amostras em dados sobre nutrientes;

Prof. Dr. RAMON MASSANA (ICM – Barcelona – ES) - pelo auxílio na solução de problemas relacionados às análises de imagens;

Profs. Drs. JOSÉ E. SANTOS, ARMANDO A. H. VIEIRA e FÁBIO A CHINALIA – membros da Comissão Julgadora de meu Exame de Qualificação – pelas valiosas contribuições ao trabalho;

Prof^ª. Dr^ª. MARISA CHAUD – pela confiança, apoio e estímulo durante a preparação para o exame de seleção e pelo empenho no sentido de ajudar-me a montar um projeto de pesquisa;

Prof. RAFAEL S. PANHOTA e Profa. Dra. MARCELA CUNHA – amigos queridos, pela ajuda na preparação para o exame de seleção ao mestrado.

Sra. DARCI DA CONSOLAÇÃO DINIZ JAVAROTI e Sr. AIRTON SANTO SOARES – mais que técnicos, amigos, que me garantiram a retaguarda e apoio na execução das coletas e análises

Aos amigos do DEBE – UFSCar – Paulo, Inessa, Carla e Raquel pelo companheirismo, trocas de idéias e compartilhamentos no trabalho e na vida;

CPG do PPGERN - UFSCar – pelo fornecimento de um ano de bolsa CAPES e pelo apoio logístico para realização deste trabalho;

Professores do PPGERN – UFSCar – por todos os maravilhosos ensinamentos transmitidos;

Professores da UNIARA – Rosinha, Beth, Marisa, Mariângela, Roberto, João Sé, Alfredo, Rose, Marcelo, Adalberto, Flávia, Paulo - por terem me ajudado a resgatar 30 anos de conhecimentos em 3;

Aos FUNCIONÁRIOS da Secretaria do PPGERN-UFScar – pela atenção, paciência e orientações;

Aos amigos EDNA, VANILDO, DORINHA e CLEUZA – funcionários do DEBE e CCBS pelo suporte para as atividades complementares necessárias ao bom desenvolvimento do trabalho;

Aos companheiros FUNCIONÁRIOS das oficinas de mecânica, marcenaria, vidraria, biblioteca e secretaria de informática – pelo auxílio nas soluções dos problemas relativos às suas respectivas áreas;

À direção do Parque Ecológico de São Carlos, na pessoa de seu diretor Dr. FERNANDO S. MAGNANI pela permissão de uso da área e apoio nas coletas realizadas no ambiente;

Aos amigos: VALDIR e DENISE JANÇANTI; MARIA REGINA C. JACOB e MARIA JÚLIA C. DALL'ACQUA – por todo o apoio e estímulo antes e durante o curso;

A HERMAN HESSE (*Sidarta*) e ROQUE DE ROSA (*O Homem e o Rio*) – por - através de suas obras - terem me ajudado aprender a “ouvir o rio”.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	19
3. JUSTIFICATIVAS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 – Locais de Estudo.....	20
4.2 – Ficha de Campo	22
4.3 – Coletas	22
4.4 – Amostras	23
4.5 – Análises	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 – Variáveis abióticas	28
5.2 – Variáveis bióticas	30
5.3 – Estado trófico	31
5.4 – Bactérias	33
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. ANEXOS	56

ABREVIATURAS

AB	abundância de bactérias
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANFH	abundância de nanoflagelados heterotróficos
ANOVA	análise de variância
AO	laranja de acridina (<i>acridine orange</i>)
C	carbono
CID	carbono inorgânico dissolvido
Cl _a	clorofila <i>a</i>
COD	carbono orgânico dissolvido
COP	carbono orgânico particulado
CV	coeficiente de variação
D	densidade
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol-dihidrocloreto
DP	desvio padrão
DS	disco de Secchi
e.g.	exemplo geral
EM	elo microbiano (<i>microbial loop</i>)
g	grama
IDM	Índice de Diversidade Morfológica
IDT	Índice de Diversidade de Tamanho
IET	Índice de Estado Trófico de Carlson (<i>TSI</i>)
MEF	microscopia de epifluorescência
mg	miligrama
MI	matéria inorgânica
mL	mililitro
MO	matéria orgânica
MOD	matéria orgânica dissolvida
MOP	matéria orgânica particulada
N	nitrogênio
N -NH ₄ ⁺	amônio
NF	nanoflagelados
NFA	nanoflagelados autotróficos
NFH	nanoflagelados heterotróficos
NO ₂ -N	nitrito
NO ₃ - N	nitrato
N _{tot}	nitrogênio total
OD	oxigênio dissolvido
P	fósforo
PI	fosfato inorgânico
PO ₄	fosfato
PTD	fosfato total dissolvido
P _{tot}	fósforo total
<i>r</i>	coeficiente de correlação linear de Pearson
R ²	coeficiente de determinação
V _c	volume celular
μg	micrograma
μm	micrômetro

RESUMO

A análise da morfologia e do tamanho de células bacterianas de três reservatórios em diferentes estados tróficos (Barra Bonita – eutrófico, Broa – mesotrófico e Lagoa Dourada – oligotrófico) foi feita com imagens obtidas por microscopia de epifluorescência (coloração com DAPI). Em cada ambiente foram estimadas as frequências relativas de cada morfotipo estudado (coco, cocobacilo, bacilo, vibrio, filamento e espirilo) assim como dos biovolumes dos organismos.

As frequências relativas dos biovolumes e dos morfotipos foram transformadas em índices de diversidade de tamanho (IDT) e de diversidade morfológica (IDM), respectivamente, calculados pelo índice de Shannon e foram estimadas as densidades populacionais (D). Estes valores foram comparados com os índices de estado trófico médios (IETm) calculados para os ambientes.

Entre as variáveis físicas e químicas, o fósforo total representou o mais claro divisor de estado trófico dos ambientes, no período estudado, enquanto entre as variáveis biológicas a densidade populacional bacteriana foi o indicador mais significativo do estado de trofia dos ambientes. O IDM revelou-se um indicador significativo entre o ambiente eutrófico e o oligotrófico, e entre o mesotrófico e o oligotrófico, mas não tão consistente entre o eutrófico e o mesotrófico, possivelmente devido à proximidade do estado trófico entre eles. O IDT revelou-se um indicador significativo entre o ambiente eutrófico e oligotrófico mas não entre cada um desses e o mesotrófico.

No ambiente oligotrófico constatou-se uma correlação linear negativa, extremamente significativa ($r = - 0,9735$ e $P = 0,001$), entre IET e IDM; esta correlação mostrou-se significativa com a concentração de cloforila *a* e não significativa com os demais componentes do IETm.

ABSTRACT

The morphology and size of bacterial cells taken from three reservoirs in different trophic state (Barra Bonita – eutrophic, Broa – mesotrophic and Lagoa Dourada - oligotrophic), were analysed through images acquired by epifluorescence microscopy (with DAPI fluorescent stain). In these water-bodies, the relative frequencies were calculated for each bacterial morphotype (coccus, coccobacillus, bacillus, vibrio, filament and spirillum) and biovolume.

The relative frequencies of biovolumes and morphotypes were converted into indexes of size diversity (SDI) and morphological diversity (MDI) using the Shannon Index for calculations, and population densities (D) were also estimated. These values were compared with the mean trophic state index (mTSI) calculated for each environment.

Among the physical and chemical variables, total phosphorus discriminated most clearly between different trophic states during the studied period, while among biological variables, bacterial population density was the most significant indicator of the trophic state of the environments. The MDI proved to be significantly different between the eutrophic and oligotrophic environments, as well as between the mesotrophic and oligotrophic reservoirs, but not consistently so between the eutrophic and mesotrophic, possibly because of the similarity of the trophic state in the last two. The SDI was found to differentiate significantly between the eutrophic and oligotrophic environments, but not between either of these and the mesotrophic.

In the oligotrophic environment there was an extremely significant negative linear correlation ($r = - 0.9735$, $p = 0.001$) between mTSI and MDI; this correlation was especially significant with chlorophyll concentration (Chl a) but not significant with the other components of the mTSI.

1 - INTRODUÇÃO

Na história do desenvolvimento da Ecologia e, particularmente, da Limnologia, o papel desempenhado pelos microrganismos tem sido alvo de opiniões muitas vezes contraditórias entre os pesquisadores bem como tem mudado à medida que o desenvolvimento científico cognitivo acompanha o tecnológico.

Desde os primórdios da Ecologia os microrganismos como bactérias e fungos têm sido encarados como responsáveis pela decomposição da matéria orgânica (MO) lábil ou refratária (principalmente os compostos húmicos) em gás carbônico e outras substâncias simples (como a água) e íons (amônia, nitritos, nitratos, fosfatos, etc.), assumindo assim um papel preponderante no retorno de nutrientes aos ecossistemas aquáticos e terrestres. Este enfoque já se mostrava presente no clássico trabalho de LINDEMANN [1942] e continua sendo encontrado em livros textos clássicos de Ecologia [PHILLIPSON, 1969; ODUM, 1988; BEGON *et al.*, 1999] e Limnologia [ESTEVES, 1998]. Entretanto, na análise destes textos observa-se que não mais que algumas linhas são dedicadas ao “papel dos decompositores” (bactérias e fungos). Somente em ODUM [2001] encontra-se uma maior abordagem das contribuições microbianas para os processos de nutrição e energia além de todo um capítulo (20 páginas) dedicado às “Perspectivas em Ecologia Microbiana”.

Só a partir de meados dos anos 70, começou a surgir uma abordagem diferente que passou a atribuir aos microrganismos (particularmente às bactérias) um importante papel nas teias alimentares microbianas em regiões pelágicas, visão esta que foi acrescentada à tradicional, incorporando-se em definitivo aos paradigmas ecológicos nos anos 80 [THOMAZ, 1999]. Na década de 70 já era um postulado básico que, para o entendimento de qualquer ecossistema é indispensável o conhecimento de sua teia alimentar, através da qual a energia e a matéria fluem. Apoiado neste postulado e em observações (de vários pesquisadores da época e de décadas anteriores, principalmente em ecossistemas marinhos) relacionadas com a rota da MO (produção, assimilação por bactérias e degradação), POMEROY [1974] propõe um “novo paradigma” para o papel dos microrganismos aquáticos, no qual além daquele de decompositores, também assumiriam relevante função como rota indireta para re-introdução de matéria orgânica dissolvida (MOD) na teia alimentar, além do de recuperação para esta, de matéria orgânica particulada não viva (MOP).

O “novo paradigma” abria portas ao entendimento de constatações até então não explicadas ou pouco entendidas, tais como: (1) os microrganismos são os maiores consumidores de energia do mar, consumindo mais do que a energia disponibilizada pela produção primária [POMEROY e JOHANNES, 1966]; (2) o consumo direto de MO pode contribuir com 50% da degradação total de MO no oceano [WILLIAMS, 1970]; (3) 50% da matéria orgânica sintetizada pelo fitoplâncton marinho é “perdida” como material dissolvido [ANDERSON & ZEUTSCHEL, 1970; THOMAS, 1971], etc. Foram necessários, no entanto, mais nove anos para que este paradigma ganhasse uma “identidade” que o consolidasse na Ecologia Microbiana. Para tanto, teve fundamental importância o desenvolvimento tecnológico que propiciou, na época, novos métodos de pesquisas.

Até o início dos anos 70, “contagem em placas”, “diluição seriada” e “microscopia de contraste de fase” foram os métodos convencionais usados para estimar-se o número de bactérias marinhas. No transcurso desta década, várias técnicas químicas foram usadas para estimar-se biomassa, tais como ATP [KARL & HOLM-HANSEN, 1975; SOROKIN & LYUTSAREV, 1978], ácido murâmico [FAZIO *et al.*, 1978; MORIARTY, 1977] e lipopolisacarídeos (LPS) [WATSON *et al.*, 1977], técnicas estas que apresentavam – como se verificou mais tarde – resultados muito aquém de valores mais próximos da realidade. Foi neste período que se consagrou o uso da microscopia de epifluorescência (MEF) para a contagem direta de bactérias. A coloração feita com o uso de fluorocromos tais como laranja de acridina (AO) [FRANCISCO *et al.*, 1973; HOBBIIE *et al.*, 1977] e DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol-dihidroclorato) [PORTER & FEIG, 1980] permitiu uma significativa melhoria dos resultados obtidos nas estimativas de biovolumes bacterianos e de biomassas, bem como a estimativa numérica nas amostras. Pelos novos métodos pôde-se constatar que o número de bactérias contadas era 10 a 100 vezes maior que o obtido pelos métodos tradicionais que utilizavam técnicas de cultura (técnica do número mais provável) [HOBBIIE *et al.*, 1977; AZAM *et al.*, 1983].

Como se vê, os anos 70 e 80 foram profícuos no desenvolvimento científico de métodos de observação e análise de microrganismos os quais proporcionaram avanços tanto qualitativos quanto quantitativos. Foram os conhecimentos adquiridos a partir dos novos métodos e técnicas que possibilitaram a AZAM *et al.* [1983] elaborarem a hipótese do “elo microbiano” – *microbial loop* – (EM). Esta hipótese baseou-se

principalmente no fato de bactérias da coluna d'água usarem a MOD de origem principalmente fitoplanctônica como fonte de energia, já que foi estimado que 5 a 50% do carbono fixado pelos autótrofos é liberado como MOD [LARSSON & HAGSTRÖM, 1982] e mais que: (1) a biomassa bacteriana, no mar, está relacionada com a concentração fitoplanctônica [ES & MEYER-REIL, 1982, *appud* AZAM et al, 1983]; (2) as bactérias utilizam 10 a 50% do C fixado na fotossíntese [FUHRMAN & AZAM, 1982]; (3) os organismos tendem a utilizar partículas com uma ordem de magnitude menor que a deles próprios [SHELDON *et al.*, 1972]; (4) o número de bactérias livres é controlado por nanoflagelados heterotróficos (NFH), onipresentes na coluna d'água marinha e que consomem bactérias com eficiência de 60%, sendo os 40% restantes excretados como fezes [FENCHEL, 1982]; (5) os NFH podem filtrar aproximadamente 10^5 (entre 5×10^4 a 10^6) vezes o volume de seu corpo, por hora, ou seja, cerca de 20% (de 10 a 70%) da coluna d'água é filtrada pelos nanoflagelados por dia, para o consumo de bactérias e outros recursos [FENCHEL, 1982]; (6) os flagelados são predados por microzooplâncton possibilitando que alguma energia possa retornar do EM para a teia alimentar convencional [SHELDON *et al.*, 1972; AZAM *et al.*, 1983].

Em resumo, a hipótese propunha um retorno de alguma energia via EM (MOD → bactérias → NFH → microzooplâncton → metazoários) para a teia alimentar planctônica convencional. Estava assim criada a “identidade” do “novo paradigma” de POMEROY. E, curiosamente, POMEROY não está entre os autores citados por AZAM *et al.* [1983]!

Os estudos da época evidenciaram que o comportamento dinâmico do EM é um resultado de várias interações ecológicas: comensalismo (bactérias usam a MOD disponibilizada pelo fitoplâncton e em contrapartida disponibilizam a este nutrientes minerais), competição (entre bactérias e fitoplâncton, pelos nutrientes minerais) e predação (pelos microflagelados sobre bactérias) [AZAM *et al.*, 1983]. Algumas conclusões destes autores promoveram avanços e/ou modificaram concepções da época, tais como: (1) a regeneração de nutrientes minerais resultantes da predação suprirá uma retro-alimentação do fluxo de materiais dentro do EM; (2) os fluxos de carbono e nutrientes minerais no EM são fortemente ligados e (3) a regeneração de nutrientes minerais resultante da predação (flagelados / bactérias) proporciona uma realimentação de alguns dos materiais fluentes dentro do EM, ou seja, como as bactérias seqüestram nutrientes minerais eficientemente e são consumidas por

flagelados (com alta eficiência de assimilação de carbono) [FENCHEL, 1982] e outros componentes do zooplâncton, caberá a esses representar o maior papel na remineralização no mar, visão esta compartilhada por MANN (1982); assim sendo, atualmente grande parte da regeneração de nutrientes é atribuída aos protozoários que consomem as bactérias e liberam o excesso de amônia e fosfato, tanto em ecossistemas aquáticos como terrestres [POMEROY *et al.*, 1988, *appud* THOMAZ, 1999].

A hipótese do EM gerou uma controvérsia (“*link or sink*”) sobre se o EM seria uma fonte de recursos para a teia alimentar dos metazoários ou seria um sumidouro de carbono fixado via perdas respiratórias [DUCKLOW *et al.*, 1986; SHERR *et al.*, 1987]. No modelo conceitual de AZAM *et al.* [1983] para a teia alimentar pelágica, a teia microbiana – incluindo todos os organismos unicelulares, tanto pro como eucariontes – suportaria a teia alimentar metazoária. Mas não se poderia olvidar que a maior parte da produção primária poderia ser respirada dentro da teia alimentar microbiana.

Coube a SHERR & SHERR [1988] a elaboração de um elegante modelo para solução deste impasse. SHERR *et al.* [1986] já haviam chamado a atenção para o fato de que, embora na concepção de AZAM *et al.* [1983] o EM fosse um “processador” de MO não viva, via tomada pelas bactérias e posterior consumo das bactérias por protozoários, haveriam diversas ligações entre algas e microrganismos heterotróficos. Assim sendo, o EM não poderia ser visto de forma independente do restante da teia alimentar microbiana e nem mesmo da teia alimentar dos metazoários.

No modelo de SHERR & SHERR [1988] baseado em SHERR *et al.* [1986] – ver Anexo 1, Fig. A1 – não só o fitoplâncton mas toda a teia microbiana suporta a teia alimentar dos metazoários já que estes (particularmente os micro-crustáceos) estariam usando como recurso flagelados (os quais podem, também, ingerir e assimilar polissacarídeos de alto peso molecular em relativamente baixas concentrações) e ciliados, os quais por suas vez consomem bactérias. A teia alimentar microbiana é o recurso alimentar final para o meta-zooplâncton, mesmo quando a produção primária é respirada dentro da própria teia alimentar microbiana. Este modelo sumarizou os principais conhecimentos existentes na época sobre as relações ecológicas entre seus diversos componentes (estrutura e função), atendendo plenamente os postulados básicos da ecologia, especialmente os relativos aos microrganismos aquáticos. Tanto é

verdade que o mesmo já resiste há 16 anos, estando cada vez mais consolidado como paradigma.

O modelo do EM foi elaborado com base, principalmente, em dados concernentes a ecossistemas marinhos, tendo se revelado eficaz para explicar os processos que deram origem a estes dados e mostrou-se plenamente aplicável, também, aos ecossistemas continentais. A título de exemplo vale lembrar que SANDERS [1992] mostrou que a correlação positiva entre abundância de bactérias e NFH ocorre independentemente da salinidade em ambientes variando de alta oligotrofia à hipereutrofia.

Durante os anos 80 e 90, a quantidade de pesquisas produzidas envolvendo o EM e aspectos concernentes à Ecologia Microbiana é soberba. Tanto aspectos qualitativos como quantitativos foram sendo estudados e conceitos novos surgiram além do aprimoramento dos já existentes.

Entre tais trabalhos podem-se citar as constatações de que: (1) o número de bactérias correlaciona-se fortemente com a quantidade de clorofila disponível no meio [BIRD & KALFF, 1984; COLE *et al.*, 1988], com a de fósforo [CURRIE, 1990], ou MOD em lagos húmicos (de “águas marrons”) [TRANVIK & SIEBURTH, 1989]; (2) o controle predatório sobre o número de bactérias pode ser de menor importância em alguns sistemas e é, talvez, mais importante em ambientes eutróficos do que em oligotróficos [BIRD & KALFF, 1984; COLE *et al.*, 1988]; (3) a densidade e produtividade bacteriana planctônica podem ser representadas por um modelo matemático que considera os controles de recurso e predação atuando simultaneamente [WRIGHT, 1988].

O modelo matemático de WRIGHT [1988] indicou basicamente que: (1) a densidade bacteriana é determinada primariamente pela proporção de entrada de substrato para consumo; (2) a produção bacteriana é balanceada por uma combinação de perdas (respiração, morte e consumo) e ocorre numa proporção dependente da entrada de substrato e o rendimento de crescimento e (3) a concentração de substrato no ambiente é diretamente relacionada com a taxa de consumo [WRIGHT *et al.*, 1987; WEISSE & SCHEFFEL-MÖSER, 1991]. HADAS & BERMAN [1998] evidenciaram que a densidade de bactérias, picofitoplâncton, flagelados e ciliados no EM é controlada pela

combinação do suplemento nutricional (efeito *bottom-up*) e da ação de predadores (efeito *top-down*).

Aos estudos relativos a biovolume, biomassa, produção primária e secundária, fluxo energético, etc., somaram-se outros com enfoques mais direcionados para abundância, diversidade, escala (temporal e espacial), tamanho dos organismos, diversidade genética, entre outros.

Questões como abundância e densidade dos componentes do EM foram objeto de grande interesse na época (como continuam sendo até hoje). GASOL & VAQUÉ [1993], por exemplo, mostraram que a abundância de NFH pode ser regulada pela disponibilidade alimentar (bactérias, algas e possivelmente COD) e/ou pela predação, sendo que cladóceros e copépodes [GÜDE, 1988, 1989; STOECKER & CAPUZO, 1990], rotíferos e ciliados [WEISSE, 1991] são potencialmente importantes predadores e podem controlar a abundância e atividade dos NFH.

Mais, ainda, GASOL & VAQUÉ [1993] mostraram que a abundância de bactérias (AB) é fortemente correlacionada com a abundância de nanoflagelados heterotróficos (ANFH) através de diferentes sistemas aquáticos, sugerindo controle de recurso de ANFH e predatório de AB (interessante verificar o gráfico de THINGSTAD em AZAM, 1983) e constataram que a relação é forte em sistemas com baixa AB e fraca em sistemas ricos em bactérias; a relação mostrou-se realçada em lagos onde a abundância de cladóceros é negativamente relacionada com ANFH e o efeito é forte onde *Daphnia spp* dominam. Determinaram, ainda, que a AB varia de 10^5 a 10^{11} células x mL⁻¹ e que ANFH varia de 10^2 a 10^6 células x mL⁻¹.

A Ecologia Microbiana assumiu o caráter holístico da Ecologia – ainda que por vias reducionistas –, principalmente no entendimento de que a estrutura da comunidade e o fluxo de matéria e de energia através dela dependem do número e do tipo de organismos encontrados na mesma [GASOL & VAQUÉ, 1993]. A análise das comunidades aquáticas, cada vez mais passou a adotar os três critérios principais já utilizados na Ecologia, de forma geral: tamanho, genética e função trófica, isto sem que as questões estruturais e funcionais fossem deixadas de lado e, até mesmo, para buscar explicá-las [GASOL *et al.*, 1997]. Estes autores discutiram os três critérios utilizados para a análise de comunidades aquáticas – com suas vantagens e

desvantagens – e concluíram que tamanho é o critério de agrupamento de organismos vivos mais direto ao nível da comunidade e produz um “espectro de tamanho” que possibilita fácil comparação entre diferentes comunidades. Reconhecem, ainda, que os métodos moleculares estão permitindo significantes avanços, tanto na abordagem genética quanto na trófica, na análise de comunidades. Entretanto, eles entendem que *“tais abordagens ainda estão longe de fornecerem uma descrição total das comunidades e seu uso é um sorvedouro de tempo e não está disponível em todos os laboratórios”*. Para os autores, *“os estudos de diversidade de espécies de bactérias ainda estão na sua infância”*.

Independentemente da visão de GASOL *et al.* (1997) sobre as outras abordagens na análise de comunidades relacionadas ao EM, é interessante lembrar-se que além do fato de tamanho ser uma propriedade possível de ser determinada com relativa facilidade e precisão para cada indivíduo de uma comunidade, ele também está relacionado com interessantes propriedades do organismo, tais como taxa de crescimento, abundância, diversidade, velocidade de afundamento, etc., em ecossistemas pelágicos. A idéia central de que há uma relação direta e exponencial entre uma dada característica biológica e a massa de um organismo, tem se mostrado válida tanto para organismos da escala macro como para os da escala micro. Daí sua aplicabilidade nos estudos ecológicos de microrganismos aquáticos [PETERS, 1987].

A nível macro, a distribuição de tamanho dos organismos constituintes de uma comunidade fornece informações ecológicas (estrutura e função) desta comunidade. Esta abordagem, no entanto, tem sido raramente estendida às bactérias, de forma particular, e/ou aos demais componentes do EM de forma mais geral.

O método mais comumente utilizado para estudos de tamanho médio em assembléias bacterianas é a MEF com coloração por AO e/ou DAPI. No entanto, o tamanho médio de um organismo sumariza todas as medidas individuais em um número (ou dois se uma medida de variabilidade – como o desvio padrão (DP) – é incluída). No entanto, vários casos existem nos quais a distribuição de tamanho muda embora a média permaneça a mesma. Assim, poderiam estar sendo descartadas várias informações importantes se for usado somente o tamanho médio das células [GASOL *et al.*, 1997]. Os autores mostraram que a “distribuição de tamanho” é um caminho que permite a comparação quantitativa das distribuições de tamanho de várias

comunidades, com significado ecológico, e o “*índice de diversidade de tamanho (IDT)* é a inclinação de uma reta obtida após ranquear-se todos os tamanhos obtidos na análise das células de uma determinada amostra e proceder-se a regressão da linha encontrada”.

As principais vantagens desse método são as seguintes: (1) diferenças nas distribuições de tamanhos são imediatamente óbvias; (2) várias distribuições podem ser superpostas na mesma plotagem; (3) não havendo agrupamento de células por morfotipos ou classes arbitrárias, todas as informações reunidas são usadas; (4) é uma apresentação de dados simples e direta; (5) a distribuição pode ser quantificada (o índice de diversidade de tamanho) e ser comparada quantitativamente com outras e (6) os parâmetros estatisticamente estimados têm significado ecológico e, de fato, fornecem uma estimativa da diversidade de tamanho da comunidade que pode ser usado para comparar comunidades inteiras, por uma rota simples [GASOL *et al.*, 1997].

Além do tamanho, uma das expressões genéticas mais facilmente observáveis dos integrantes do EM é o fenótipo morfológico dos microrganismos, principalmente das bactérias. O volume de informações existentes sobre a morfometria bacteriana, na Ecologia Microbiana, ainda não é compatível com o de estudos da variabilidade morfológica nos diferentes ambientes aquáticos. Não se encontra na literatura, por exemplo, uma tentativa de expressar a diversidade morfológica bacteriana através de um indicador, como foi feito para a diversidade morfométrica por GASOL *et al.* [1997], mesmo que os estudos morfológicos já tenham atingido o nível molecular (e.g. estudos sobre os genes de alongamento “*rodA*” e “*mre*” do bastonete *Salmonella typhimurium* [COSTA & ANTÓN, 1999]).

Parece que uma das grandes dificuldades em estudos comparativos da diversidade morfológica de bactérias em ambientes aquáticos tem sido a falta de uma padronização na definição das relações métricas características dos diferentes morfotipos, especialmente entre cocos, cocobacilos e bacilos. Diferentes autores têm usado diferentes critérios para a caracterização destes morfotipos (e.g. BLACKBURN *et al.*, 1998; BÖLTER *et al.*, 1993; FERRARI, 2002; LA FERLA *et al.*, 2004), principalmente quando o método utilizado é o de análise computadorizada de imagens. Esta diversidade de critérios tem inviabilizado comparações quantitativas com dados

oriundos de diferentes estudos e, portanto, o uso de um indicador confiável que facilite tais comparações.

Da mesma maneira que o tamanho, a forma – enquanto expressão gênica – é uma ferramenta interessante para comparação de populações na Ecologia Microbiana e pode oferecer informações valiosas tanto estruturais quanto funcionais sobre as populações bacterianas nos ecossistemas aquáticos, principalmente devido a indícios já detectados de variações morfológicas decorrentes da condição trófica (e.g. STEINBERGER, *et al.*, 2002; FERRARI, 2002; LA FERLA *et al.*, 2004).

Os conhecimentos sobre o EM não param de crescer. Mesmo assim, ainda há muito o que ser determinado e entendido sobre os aspectos ecológicos do mesmo, como mostram, por exemplo, a descoberta de que organismos mixotróficos são comuns e podem ser numerosos em muitos ambientes aquáticos [BERMAN & STONE, 1994; JONES, 2000], assim como o possível envolvimento de bacteriófagos na promoção de um “*mini-loop*” (bactéria → fago → MOD → bactéria) [BERMAN & STONE, 1994; WOMMACK & COLWELL, 2000].

O entendimento da teia alimentar microbiana tem se mostrado importante para a interpretação de processos como o controle do aquecimento global, a poluição costeira ou a qualidade da água em lagos e reservatórios [BERMAN & STONE, 1994].. Com relação a estes últimos, notadamente a eutrofização – em especial a cultural ou antrópica – tem sido uma das grandes preocupações ambientais do fim do século passado que deverá persistir no início deste [ESTEVEZ, 1998; UNEP-IETC, 2001; SALAS & MARTINO, 2001].

Diante do exposto, pode-se observar a complexidade que envolve a teia microbiana como um todo, bem como as dificuldades de estudos de sua estrutura e função. Mas, a despeito destas dificuldades, é muito clara a evidência da importância do conhecimento da mesma, principalmente quando levamos em consideração – como já dito anteriormente – os efeitos das ações antrópicas.

Também se evidenciou a importância dos fatores bióticos e abióticos na estrutura e função do EM. Podemos acreditar, portanto, que alterações tróficas produzirão – em última instância – alterações morfológicas e morfométricas entre os

integrantes do EM, assim como no número de indivíduos das diversas espécies que estarão compondo as comunidades integrantes do mesmo.

Há que se considerar, ainda, que o número de organismos numa área em particular é determinado pela especiação e extinção e pela imigração e perdas locais e que a importância relativa destes processos depende da escala da investigação (global, regional ou local). Não menor será a importância das escalas temporal e espacial de ocorrência dos processos considerados, sobre o número de indivíduos das comunidades estudadas e, por conseguinte, sobre todos os seus subseqüentes (tamanho, forma, densidade, biomassa, etc.) [GODFRAY & LAWTON, 2001].

2 – OBJETIVOS

GERAL

Analisar comparativamente a densidade e as variações morfológica e morfométrica das populações bacterianas em diferentes escalas trófica e temporal, em reservatórios.

ESPECÍFICOS

1 – Confirmar a diferença de estado trófico (IET) entre os ambientes estudados e a variação temporal do índice de cada ambiente;

2 - Estudar comparativamente as populações bacterianas nos ambientes através da determinação de indicadores biológicos (IDTs, IDMs e Ds) na escala temporal e verificação da existência de possíveis correlações entre eles;

3 – Verificar a existência de possíveis correlações entre os índices bacterianos e o de estado trófico, bem como com as outras variáveis estudadas, na escala temporal.

3 - JUSTIFICATIVAS

A eutrofização antrópica (poluição) dos meios aquáticos é um dos grandes problemas ambientais com os quais temos que nos deparar durante este século o qual está intimamente relacionado com a regeneração de nutrientes minerais e fluxo de

carbono, através da incorporação do COD e sua transformação em fração particulada – carbono orgânico particulado (COP) –. Sabendo-se da profunda relação entre tais processos e a teia microbiana (a qual regula em grande parte este fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes nestes ambientes), torna-se visível a necessidade de maior conhecimento dos processos, assim como da teia microbiana como um todo (estrutura) e das mais íntimas relações entre ambos (função), abordagem esta já preconizada por Azam *et al.* [1983].

O EM, que inclui bactérias e protozoários, não pode ser dissociado das teias alimentares microbianas e as bactérias podem ser colocadas na base das teias microbianas, juntamente com o fitoplâncton. Mais, ainda, como o tempo de duplicação das bactérias é relativamente curto, de 15 a 20 minutos [PEDRÓS-ALIÓ & GUERREIRO, 1994], embora este tempo seja geralmente maior que 2 horas na maioria dos ambientes aquáticos [THOMAZ & WETZEL, 1995], a dinâmica operacional do EM torna-se extremamente relevante, principalmente nestes ambientes.

Portanto, conhecer as relações morfológicas e morfométricas dos microrganismos aquáticos, em diversas escalas, parece ser de profunda importância não só para um possível uso futuro como indicador biológico de eutrofização (ou parte de um índice indicador desta) como, até mesmo, para possíveis ações de biorremediação. No mínimo, o conhecimento destas relações permitem um melhor entendimento da teia alimentar aquática como um todo já que a interação da teia alimentar dos metazoários está intimamente relacionada com a teia microbiana e particularmente com o EM como fonte energética, inclusive.

O conhecimento das possíveis relações entre as variáveis físicas, químicas e biológicas (incluindo as populações microbianas e especialmente a bacteriana, base da teia alimentar microbiana) nos ambientes aquáticos poderá, em momento talvez não muito distante, mostrar-se como importante ferramenta para melhoria da qualidade da água em meios lóticos e lênticos, através da adequação de manejo por ações biológicas tais como a biomanipulação e biorremediação.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – LOCAIS DE ESTUDO

Os estudos foram realizados em três reservatórios: Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**), que apresentam distintos estados tróficos, segundo trabalhos anteriores [UNEP-IETC, 2001; TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1995 e POMPÊO, 1991]. Em cada um foi determinado, um ponto de coleta.

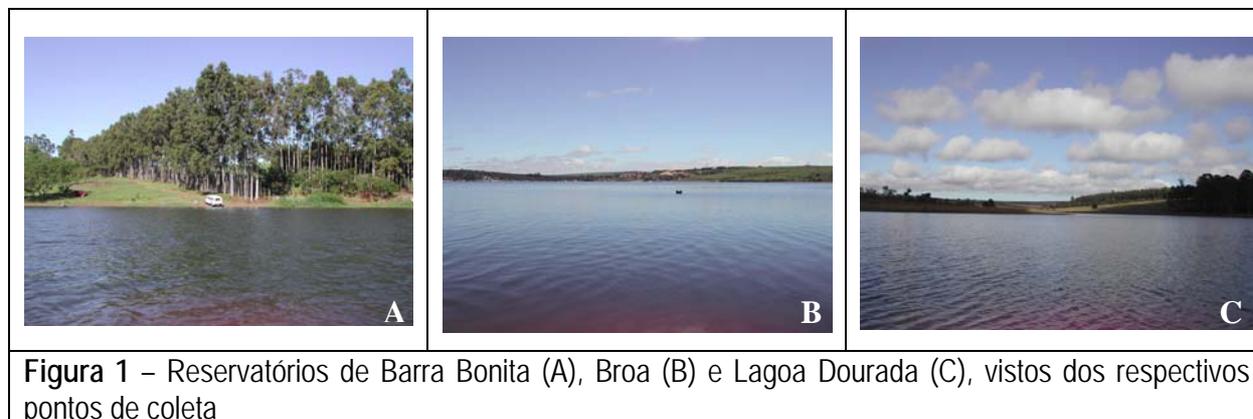


Figura 1 – Reservatórios de Barra Bonita (A), Broa (B) e Lagoa Dourada (C), vistos dos respectivos pontos de coleta

BARRA BONITA – represa situada no município de Barra Bonita (SP), a 466 m de altitude, com 80% da água proveniente dos rios Tietê e Piracicaba, ambos severamente poluídos por resíduos domésticos e industriais [TUNDISI *et al.*, 1998]. A área total da bacia é de 32.330 km², com profundidade média de 10,2 m, comprimento de 287 km, perímetro de 525 km, área da superfície de 325 km², volume estimado em 2.600 km³. O tempo médio de residência anual da represa é de 100 dias, tempo de residência no verão de 30 dias e tempo de residência no inverno de 180 dias [UNEP-IETC, 2001].

As margens correspondentes ao ponto de coletas são ocupadas por atividades de recreação (um clube de campo). A bacia apresenta ocupação e uso do tipo agrícola e de pecuária, com baixa urbanização no entorno do ponto de coletas.

LOBO (ou BROA) – reservatório turbulento e não muito profundo, situado no centro do estado de São Paulo, construído em 1936 (para suprimento energético) é atualmente usado como centro de recreação e de pesquisas. Seu perímetro é de 21 km com comprimento máximo de 8 km e largura máxima de 2 km, com área de superfície de 6,8 km², profundidade máxima de 12 m e média de 3 m. Seu volume é estimado em 22x10⁶ m³. A vegetação predominante original na bacia era a de cerrado, substituída em áreas mais férteis e úmidas por vegetação do tipo floresta de galeria. Encontram-se ainda na bacia áreas de agricultura ocasional e de reflorestamento com *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. [TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1995].

LAGOA DOURADA – pequena represa situada no município de Itirapina (SP), a 715 m de altitude, parte da Bacia do Ribeirão do Lobo. A área total da represa é de 0,079 km², o volume de 208.390,27 m³, o perímetro de 1.560 m, o comprimento máximo de 650 m, a largura máxima 230 m, a profundidade máxima 6,3 m e a profundidade média 2,6 m. Construída em meados de 1980, é utilizada basicamente para recreação. A vegetação predominante na bacia é o cerrado. Às margens da represa observa-se um loteamento residencial, pequena área de pastagem para gado e vegetação de cerrado (remanescente). Grande parte do fundo da represa é recoberta por macrófitas (e.g. *Utricularia gibba*). [POMPÊO, 1991].

4.2 – FICHA DE CAMPO

Nas atividades realizadas em campo foi utilizada uma “Ficha de Campo” (Anexo –2) onde foram anotados todos os dados referentes às coletas, inclusive as características ambientais relevantes, na data da coleta.

4.3 – COLETAS

As coletas foram mensais, de janeiro a junho de 2004 na LD e BR (23/01, 17/02, 16/03, 18/4, 16/5 e 20/6). Em Barra Bonita as coletas foram feitas apenas de fevereiro a junho e sempre no dia anterior às coletas da LD e BR.

Em cada ambiente determinou-se, na primeira coleta, um ponto de coleta, cujas coordenadas geográficas procurou-se manter o mais aproximadamente possível entre as coletas. Latitude e longitude foram anotadas através de equipamento conectável ao sistema de posicionamento global por satélite – GPS - (Garmin®, modelo GPS-12). As coordenadas geográficas médias para os pontos de coletas de cada ambiente estudado foram: BB – de S 22°31'45.3" a S 22°31'76.3" e W 48°31'42.9" a W 48°31'74.0"; BR – de S 22°10'43,8" a S 22°10'82.0" e W 47°53'44.6" a W 47°53'94.1" e LD – de S 22°11'32.2" a S 22°11'54.1" e W 47°54'56.8" a W 47°54'95.8".

Em cada ponto de coleta foram colhidas amostras da coluna d'água na superfície (**S**) - a 0,25 cm da interface ar/água, assim como foram anotadas as variações de profundidade no local, durante o período de estudos. As variáveis físicas e químicas pH, oxigênio dissolvido (OD – em mgO₂/L), temperatura da amostra (Tam – em °C) e condutividade elétrica (Cnd – em μS/cm), foram medidas no momento da

coleta com equipamento multisensor de avaliação de variáveis físicas e químicas da água (Horiba®). A transparência da água foi aferida com um Disco de Secchi (DS – em m) de $\varnothing = 30$ cm.

4.4 – AMOSTRAS

As amostras foram identificadas através do local da coleta (e.g. BB – Barra Bonita) e do mês (e.g. Jan – janeiro) em que ocorreram. Elas foram coletadas com auxílio de garrafa de van Dorn de 2,5 L, dos quais 1,5 L foram recolhidos em frascos plásticos revestidos para proteção contra a luz, e 200 mL em frascos âmbar (de 250 mL); ambos foram transportados até o laboratório sob refrigeração.

Para as **análises de alcalinidade, nutrientes e pigmentos**, dos 1,5 L foram retiradas sub-amostras de 100 mL para determinação da alcalinidade. Do restante foram retiradas sub-amostras (em triplicata) de 60 a 100 mL cada uma, as quais foram filtradas em até 8 h após a coleta em conjunto de filtragem “Manifold” (Millipore®), em filtros de microfibras de vidro GF/F (Whatman®), para posterior extração de pigmentos. O filtrado foi acondicionado em frascos plásticos de 250 mL e o restante da amostra em frascos de 1L. Ambos foram congelados durante até 3 meses para análises de nutrientes minerais.

Para as **análises bacterianas**, os 200 mL de amostra recolhidos em frascos âmbar foram fixados imediatamente após a coleta com solução de formaldeído (pH 7.0 e concentração final de 2%) e mantidos em refrigerador (± 8 °C) até o momento da análise [Sherr & Sherr, 1993].

4.5 – ANÁLISES

4.5.1 – Alcalinidade – a partir das sub-amostras de 100 mL, na chegada ao laboratório após cada coleta, a alcalinidade foi determinada pelo método titulométrico de Gran (WETZEL & LIKENS, 1991), pelo qual após a aferição do pH e temperatura em equipamento próprio (peagômetro Horiba®) foi feita a titulação sob agitação com H_2SO_4 0,01 N padronizado, até que o pH atingisse o valor 4,35. O valor da alcalinidade (Alc – em $\mu eq/L$) foi obtido pela equação:

$$\frac{V_{H_2SO_4} \times N \times 10^6}{V_{amostra}}$$

Onde $V_{H_2SO_4}$ é o volume do ácido utilizado na titulação (L); N é a normalidade do ácido (0,01) e $V_{amostra}$ é o volume da amostra (L).

4.5.2 – Nutrientes – as concentrações das principais formas de N, P e Si foram determinadas nas amostras. Nitrito (NO_2-N), segundo GOLTERMAN *et al.* (1978); nitrato (NO_3-N), segundo MACKERETH *et al.* (1978); amônio ($N-NH_4^+$), segundo KOROLEFF (1983); nitrogênio total (Ntot), segundo VALDERRAMA (1981); fosfato total dissolvido (PTD) e fosfato inorgânico (PI), segundo STRICKLAND & PARSONS (1960); fósforo total (Ptot), segundo VALDERRAMA (1981) e sílica (SiO_2) segundo GOLTERMAN *et al.* (1978). No presente trabalho as concentrações são expressas em $\mu g/L$, com exceção do silicato (mg/L).

4.5.3 – Clorofila a e feofitina – o material filtrado em triplicata foi processado para extração da clorofila a segundo REGALI-SELEGHIM (2001). A acidificação para análise espectrofotométrica foi feita com adição de HCl 1 M, na proporção de 20 μL para cada mL do extrato filtrado a ser acidificado, durante 15 minutos. As concentrações de clorofila a ($\mu g/L$) e feofitina ($\mu g/L$) foram calculadas através da equação proposta por LORENZEN (1967). No processo de extração foram observadas as recomendações de MARKER *et al.* (1980). Para as mensurações foi utilizado um espectrofotômetro Novaspec II ® (Pharmacia Biotech). Para evitar que o equipamento perdesse a calibragem durante as análises, o mesmo foi operado em ambiente refrigerado com temperatura constante, em conformidade com a orientação do fabricante.

Índice de Estado Trófico (IET) – Através dos algoritmos próprios, foram determinados os valores de Índice de Estado Trófico (IET) para clorofila a (C_{la}), fósforo total (P_{tot}) e disco de Secchi (DS), em cada ponto de coleta. [CARLSON, 1977]. A média destes valores foi utilizada para avaliar quantitativamente o estado trófico de cada ambiente, segundo a classificação proposta por KRATZER & BREZONIK [1981], a qual é:

IET	Classificação
0 – 20	Ultraoligotrófico
21 – 40	Oligotrófico
41 – 50	Mesotrófico
51 – 60	Eutrófico
Acima de 60	Hipereutrófico

A quantificação de todas as outras variáveis estudadas feita, também, a partir de amostras tomadas na superfície conferiu maior poder de comparação entre os resultados.

4.5.4 – Bactérias – alíquotas de 0,5 a 2 mL das amostras fixadas foram coradas com DAPI segundo PORTER & FEIG [1980], com concentração final de 1,0 a 5,0 µg/mL [VELJI & ALBRIGHT, 1993]; durante 30 minutos [recomendação pessoal do Dr. Hakumat Rai] e filtradas em membranas (poro = 0,2 µm; Ø = 25 mm) de policarbonato (Nuclepore®) coradas com Sudam Black e apoiadas sobre uma membrana úmida de proteção (Sartorius® AG37070); após a filtração as membranas de policarbonato foram montadas sobre lâminas de vidro para a análise em microscopia de epifluorescência [FERRARI, 2002].

As bactérias foram contadas e medidas em microscópio de epifluorescência Olympus® BH2, com luz de vapor de mercúrio (HBO 100 W - OSRAM®) e conjuntos de filtros para luz ultra violeta Olympus® (DM-400, L435 e U-UG-1), com aumento de 1.250X (objetiva neofluar UVPL 100 1,30 oil - Olympus®). As imagens (4 a 6 campos/lâmina, num total de 200 a 250 células/lâmina) foram capturadas através de câmera CCD (Optronics®) acoplada ao microscópio e tratadas pelo programa Image-Pro Plus® 4.0 (Media Cybernetics®), com o qual foram realizadas as medições (áreas da secção transversal, perímetro, comprimentos e larguras celulares) e contagens [adaptado de MASSANA *et al.*, 1997].

O preparo das imagens para medições e contagens computadorizadas exige a aplicação de filtros para determinação dos contornos celulares. MASSANA *et al.*, (1997) estabeleceram o seguinte protocolo para aplicação dos filtros: 1) filtro Gauss – Kernel 5x5; 2) filtro Laplace – Kernel 5x5; 3) filtro Median – rank 3, passado três vezes. No entanto, o programa utilizado neste trabalho (Image-Pro Plus® 4.0) não dispõe dos filtros Gauss – Kernel 5x5 nem o Median – rank 3. Utilizando-se dos recursos

disponíveis pelo programa, foi implantado no conjunto de filtros do mesmo a matriz referente ao filtro Gauss – Kernel 5x5 (informação pessoal do Dr. Ramon Massana) que possui a seguinte configuração:

1	1	2	1	1
1	2	4	2	1
2	4	8	4	2
1	2	4	2	1
1	1	2	1	1

Para implantação desta matriz no programa, parte-se da barra de menus percorrendo-se o seguinte caminho: process → filters → kernels → edit → filter type → convolution. Ao aparecer a janela da matriz, configura-se a mesma para 5x5 e insere-se os valores indicados acima.

O filtro Median – rank 3 do protocolo original foi substituído pelo Median – enhancement 3x3 do Image-Pro Plus®, que produz um efeito final semelhante ao do programa utilizado por MASSANA *et al.*, (1997).

Densidades bacterianas (D) – foram calculadas segundo JONES (1979), utilizando a equação:

$$D = \frac{Y \times A \times d}{a \times v}$$

onde **D** = densidade numérica (células / mL); **Y** = número médio de células / área de contagem; **A** = área de filtração da membrana (mm²); **d** = diluição; **a** = área do campo de contagem (mm²) e **v** = volume filtrado (mL).

Volumes celulares (Vc) – expressos em μm³, foram calculados pelas medições de comprimento (C) e largura (L) celulares com o uso de algoritmos adequados [BOLTER *et al.*, 1993 e SUN & LIU, 2003] aos diferentes morfotipos (cocos, cocobacilos, bacilos, víbrios, filamentos e espirilos [TORTORA *et al.*, 2003]). Para os cálculos, cocos foram tratados como esferas ou esferóides prolatados; cocobacilos como elipsóides; bacilos, filamentos e espirilos como cilindros com duas capas hemi-

esféricas nas extremidades e víbrios como prismas falciformes. As equações utilizadas foram:

$V = \frac{\pi \times a^3}{6}$
esfera

$V = \frac{\pi \times b^2 \times a}{6}$
esferóide prolatado

$V = \frac{\pi \times a \times b \times c}{6}$
elipsóide

$V = \pi \times b^2 \times \left(\frac{a}{4} - \frac{b}{12} \right)$
cilindro com 2 capas hemi-esféricas

$V \approx \frac{\pi \times a \times b \times c}{4}$
prisma falciforme

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

A estrutura das células bacterianas é tridimensional mas o sistema utilizado para medi-las opera através de figuras bidimensionais. Por isso adotou-se considerar sempre **b = c**. No caso específico de víbrios o valor de **a** corresponde à distância entre as duas extremidades da figura geométrica. As medidas utilizadas para cocos, cocobacilos e bacilos foram tomadas automaticamente pelo sistema; as de filamentos, víbrios e espirilos foram executadas manualmente na imagem, através dos recursos disponíveis pelo sistema.

Morfotipos bacterianos – foram identificados com base no “fator de forma” (R) [ZARITSKY, 1975], expresso pela relação comprimento/largura (Cp/Lg), e através deste valor classificados em: cocos – de 1,0 a 1,25; cocobacilos – de 1,26 a 1,75; bacilos – de 1,76 até 5. Os organismos com R superior a 5 foram classificados neste trabalho como filamentos; víbrios foram identificados pela sua forma (falciforme); espirilos foram identificados pela sua forma em “S”.

Índice de Diversidade de Tamanho (IDT) – os valores dos biovolumes encontrados em cada lâmina foram agrupados em categorias representadas por seus valores numéricos e determinadas as freqüências absolutas e relativas de cada uma, a partir do que se calculou o índice de Shannon para a diversidade de tamanho de cada amostra [ZAR, 1999], o qual passou a ser identificado como Índice de Diversidade de Tamanho (IDT) para a população ali representada [modificado de GASOL *et al.*, 1997].

Índice de Diversidade Morfológica (IDM) – O mesmo procedimento foi aplicado sobre as freqüências de cada morfotipo e o valor do índice de Shannon [ZAR, 1999] encontrado em cada amostra passou a ser utilizado como Índice de Diversidade Morfológica (IDM). Não foi encontrada proposta similar na literatura.

4.5.5 – Comparações – Foram comparadas as variações em escala temporal dos IDTs, IDMs e Ds das diferentes amostras e destes com as dos IETs médios de cada ambiente, assim como com as variáveis (Cla, Ptot e DS) determinantes dos mesmos. As variações dos biovolumes médios e os valores máximos e mínimos dos mesmos também foram comparados. Idêntico tratamento foi dado aos biovolumes dos diferentes morfotipos.

4.5.6 – Análises estatísticas - as análises estatísticas dos dados (testes de correlações lineares de Pearson (r), ANOVA e testes de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para as médias [Zar, 1999; Triola, 1999]) foram feitas com auxílio dos programas GraphPad InStat® 3.0 (1997) e BioEstat 3.0 [AYRES *et al.*, 2003]. Os níveis de significância utilizados são os expressos pelo pacote estatístico GraphPad InStat® 3.0, de acordo com os seguintes limites:

valor de P	enunciação
> 0,05	não significativa
0,01 a 0,05	significante
0,001 a 0,01	muito significativa
<0,001	extremamente significativa

Os limites de significância para o teste de Tukey-Kramer para os “n” utilizados são: $q = 3,702$ e $P < 0,05$. Para o teste de correlação linear de Pearson o limite utilizado foi de $P < 0,05$.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Variáveis abióticas – as Tabs. A1, A2 e A3 (Anexo 3) mostram as variações temporais das variáveis abióticas durante o período estudado. Na Tab. A1 estão agrupadas aquelas variáveis que não são tratadas como “nutrientes” na Limnologia (embora a Alc seja uma função linear de um deles, o carbono inorgânico dissolvido – CID); na Tab. A2, os nutrientes nitrogenados e na Tab. A3 os nutrientes

fosfatados e a sílica (importante na formação da carapaça das diatomáceas [ESTEVEZ, 1998] e espículas de certas esponjas [DUSSART, 1966 *in* MELÃO & ROCHA, 1999]).

Na Tab. A1 observa-se que as médias de profundidade do Disco de Secchi (DS) , pH, condutividade e alcalinidade, distinguem nitidamente os três ambientes estudados. O mesmo não ocorre com as temperaturas das amostras e embora as médias de oxigênio dissolvido (OD) sejam significativamente diferentes, esta diferença não é tão nítida quanto para as variáveis citadas acima. Os coeficientes de variação mostram uma considerável variabilidade temporal de transparência da água (DS) em Barra Bonita, o mesmo não ocorrendo no Broa e na Lagoa Dourada; a variação mensal do pH não é grande em cada um dos ambientes estudados mas observou-se um nítido gradiente de aumento da acidez indo de Barra Bonita para a Lagoa Dourada o qual também foi verificado nos resultados de alcalinidade, com um valor altamente expressivo desta em Barra Bonita.

A variabilidade mensal da concentração de OD é significativa (acima de 20%) em todas as áreas de estudo, com maior expressão em Barra Bonita; a condutividade elétrica variou pouco em Barra Bonita e no Broa mas apresentou um alto coeficiente de variação na Lagoa Dourada, em parte devido aos baixos valores mensais da mesma neste ambiente onde qualquer pequena variação é altamente expressiva diante da média dos valores mensais.

Os valores encontrados para as variáveis físicas e químicas estudadas são condizentes com os estados tróficos dos respectivos ambientes e, diante da variabilidade mensal não muito elevada da maioria destas variáveis, não é exagero dizer-se que estes ambientes são relativamente estáveis, cada um dentro de seu estado trófico característico.

Os resultados dos nutrientes nitrogenados da Tab. A2 indicam, por outro lado, diferenças de médias muito significativas entre os três ambientes estudados, para todas as variáveis mensuradas. Além disto, exceto para o nitrogênio total (N_{tot}), os coeficientes de variação revelam significantes alterações nos valores mensais, indicando o grande fluxo destes nutrientes em cada um dos ambientes.

Situação análoga ocorre com os nutrientes fosfatados e com a sílica, conforme mostra a Tab. A3, com um nítido gradiente de concentrações entre Barra Bonita e Lagoa Dourada, passando pelo Broa e valores de coeficientes de variação

ainda mais expressivos do que aqueles encontrados para os nutrientes nitrogenados o que sugere um fluxo ainda mais substancial do fósforo nestes ambientes.

5.2 – Variáveis bióticas – a concentração de Cla é usada para se estimar a variabilidade espacial e temporal da biomassa fitoplanctônica [TREES *et al.*, 1985]. A feofitina é um dos principais produtos de degradação da Cla [MARKER, 1980]. Então, os valores das concentrações destes pigmentos nos ambientes estudados dão uma idéia da dimensão da produção primária e decomposição nos mesmos.

A Tab. A4 (Anexo 4) mostra as concentrações mensais destes pigmentos nos ambientes estudados. Os valores de Cla na Lagoa Dourada, nos meses de janeiro e maio (marcados com *), não significam necessariamente ausência de clorofila mas sim, bem provavelmente, valores aquém da capacidade de detecção do método e/ou equipamentos utilizados.

Da mesma forma observada para os nutrientes minerais, a concentração média de Cla apresenta um gradiente com valores mais altos em Barra Bonita (\bar{x} = 12,21 $\mu\text{g/L}$) e menores no Broa (\bar{x} = 5,22 $\mu\text{g/L}$) e na Lagoa Dourada (\bar{x} = 2,26 $\mu\text{g/L}$), respectivamente. Os valores de coeficiente de variação mostram uma alta variabilidade mensal na concentração deste pigmento em Barra Bonita (90,76%) e na Lagoa Dourada (62,10%) enquanto no Broa (17,83%) há maior uniformidade. Em alguns meses (abril e maio) o valor obtido no Broa foi maior que em Barra Bonita, durante uma mesma coleta e em todos os meses exceto fevereiro, as concentrações de Cla no Broa foram maiores que a menor concentração observada em Barra Bonita (4,59 $\mu\text{g/L}$ em maio). O menor valor observado para a concentração de Cla foi na Lagoa Dourada (0,00 $\mu\text{g/L}$) nos meses de janeiro e maio e os maior foi em Barra Bonita (31,22 $\mu\text{g/L}$) no mês de março sendo que nesta coleta foi constatada uma nítida floração algal.

Com relação à feofitina, não foi verificada uma diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas nos três ambientes. No entanto, da mesma forma como ocorreu com relação à Cla, a variabilidade mensal é muito maior (CV = 64,92%) em Barra Bonita que na Lagoa Dourada (CV = 35,17%) – ambientes extremos – enquanto no Broa a variabilidade mensal é menor (CV = 12,65%). Estes dados evidenciam a possibilidade de uma consistente atividade decompositora na Lagoa Dourada já que a biomassa planctônica neste ambiente deve ser menor (menor concentração de Cla), possibilidade esta respaldada pelo valor médio de feofitina mais

elevado nesta área. É provável que este fato esteja relacionado com a biomassa não planctônica sésil que compõe o fundo deste reservatório, o qual também é bem mais raso que os demais estudados.

5.3 – Estado trófico – na Tab. 1 estão agrupadas as variações temporais das concentrações de Cla, Ptot e transparência da água (DS).

Tabela 1 – Concentrações mensais superficiais de Cla($\mu\text{g/L}$) e Ptot ($\mu\text{g/L}$) e profundidade DS (m) em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**)

Meses	BB			BR			LD		
	Cla	Ptot	DS	Cla	Ptot	DS	Cla	Ptot	DS
Jan	-	-	-	6,76	15,09	1,90	0,00*	9,87	3,80
Fev	12,66	96,65	2,50	4,21	12,16	1,80	0,87	7,26	3,70
Mar	31,22	65,33	1,20	5,09	17,38	1,90	1,40	9,22	3,70
Abr	5,33	45,43	3,40	5,85	26,19	2,20	3,97	13,46	4,30
Mai	4,59	76,75	3,40	4,68	19,66	1,60	0,00*	11,83	4,40
Jun	7,26	31,73	2,90	4,71	16,40	1,90	2,79	8,89	4,50
\bar{x}	12,21	63,18	2,68	5,22	17,81	1,88	2,26	10,09	4,07
DP	11,1	25,6	0,9	0,9	4,8	0,2	1,4	2,2	0,4
CV (%)	90,8	40,5	33,9	17,8	26,9	10,3	62,1	22,0	9,2

Como mostra a Tab. 1, as concentrações de Cla apresentaram alta variação em Barra Bonita e Lagoa Dourada; as de Ptot variaram mais em Barra Bonita do que nos demais ambientes, no período de coletas; a transparência da água variou muito pouco na Lagoa Dourada, o mesmo acontecendo com o Broa, enquanto em Barra Bonita a variação foi considerável.

A despeito dos valores das médias das concentrações de Cla e Ptot mostrarem um gradiente de Barra Bonita à Lagoa Dourada, a variabilidade significativa dos coeficientes de variação mascara o fato que apenas a concentração mensal de Ptot representa um claro divisor dos três ambientes estudados, em cada mês de coleta, sendo sempre maior em Barra Bonita, menor no Broa e menor ainda na Lagoa Dourada.

Se compararmos os ambientes apenas com relação às médias obtidas para o DS, veremos que o gradiente seria: Lagoa Dourada, Barra Bonita, Broa. Deve-se lembrar, no entanto, que a profundidade média e as dimensões do reservatório são maiores em Barra Bonita que no Broa e que embora estejam ambos na rota dos ventos

o Broa é mais turbulento [TUNDISI & MATSUMURA-TUNDISI, 1995]. A maior turbulência e menor profundidade no Broa facilita um contínuo revolvimento do fundo que pode resultar na menor transparência da água, neste ambiente. Além disto, se considerarmos que o reservatório de Barra Bonita é bem maior e menos turbulento, podemos entender que aí há uma maior dispersão das diversas partículas dissolvidas e/ou suspensas ou até mesmo maior facilidade de afundamento, o que implicaria numa maior transparência da água, como foi verificado.

Estas variações, característica comum aos cálidos ambientes aquáticos tropicais e sub-tropicais, têm incentivado as discussões sobre a aplicabilidade do índice de Carlson na determinação do estado trófico dos mesmos [MERCANTE & TUCCI-MOURA, 1999; SALAS & MARTINO, 2001; SALAS & MARTINO, 1991]. Da mesma forma, há questionamentos sobre as variáveis utilizadas por CARLSON (1977) com proposta da inclusão do uso da concentração de N_{tot} para determinação do IET [KRATZER & BREZONIK, 1981].

Índice de Estado Trófico (IET) – Como o objetivo do presente trabalho é comparar as variações das comunidades bacterianas com o estado trófico dos ambientes estudados, optou-se pela determinação do estado trófico em cada coleta pela média dos valores dos índices obtidos para cada uma das variáveis propostas por CARLSON (1977), já que este ao determinar seus algoritmos para IET(Cl_a), IET(P_{tot}) e IET(DS), partiu de dados (em ambientes temperados) que conduziam a um valor semelhante do IET, independentemente da variável utilizada. As variações dos valores obtidos para os diversos IETs que poderiam conduzir a dúvidas na classificação, principalmente entre Barra Bonita e Broa com relação a Cl_a e DS, compensam-se através das médias de forma que o valor médio do IET torna-se um indicador confiável do estado trófico. Os resultados obtidos são os da Tab. 2.

Em Barra Bonita foram observadas variações do estado trófico durante o período de estudo, Em março, por exemplo, a coleta foi feita durante uma floração algal que resultou no maior IET encontrado nos ambientes. Na Lagoa Dourada, em abril, foram verificados valores para Cl_a e P_{tot} bem maiores do que a média para o ambiente o que resultou num valor de IET que, nesta coleta, colocaria a área de estudo na condição de mesotrofia, mediante a classificação utilizada. O Broa foi o ambiente que mostrou maior uniformidade de IET (CV = 2,8) mas seu estado trófico médio, ainda que

mesotrófico, na maioria das coletas esteve mais próximo de uma situação de eutrofia do que de oligotrofia.

Tabela 2 - Valores mensais dos Índices de Estado Trófico (IET) para Cla, Ptot, DS e médio (IETm) e de estado trófico (ET) em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**)

Meses	BB					BR					LD				
	Cla	Ptot	DS	IETm	ET	Cla	Ptot	DS	IETm	ET	Cla	Ptot	DS	IETm	ET
Jan	-	-	-	-	-	49	43	51	48	M	0	37	41	26	O
Fev	55	70	47	57	E	45	40	52	45	M	29	33	41	34	O
Mar	64	64	57	62	HE	47	45	51	48	M	34	36	41	37	O
Abr	47	59	42	50	M	48	51	49	49	M	44	42	39	42	M
Mai	46	67	42	52	E	46	47	53	49	M	0	40	39	26	O
Jun	50	54	45	50	M	46	45	51	47	M	41	36	38	38	O
\bar{x}	52,5	62,9	46,7	54,0	E	46,7	45,3	50,9	47,6	M	24,6	37,2	39,8	33,9	O
DP	7,6	6,4	6,2	5,5		1,7	3,7	1,5	1,3		19,8	3,2	1,3	6,5	
CV (%)	14,6	10,1	13,4	10,2		3,6	8,2	2,9	2,8		80,3	8,5	3,3	19,2	

O = oligotrófico M = mesotrófico E = eutrófico HE = hipereutrófico
ET segundo KRATZER & BREZONICK [1981]

A consistência das médias obtidas para os diversos IETs, representada por valores dos respectivos CVs relativamente baixos, principalmente em Barra Bonita e no Broa, confirmam a possibilidade de se tratar – de forma genérica e para efeitos comparativos – Barra Bonita como ambiente eutrófico, Broa como mesotrófico e Lagoa Dourada como oligotrófico.

Análises estatísticas dos valores obtidos mostraram que as diferenças entre os valores médios de cada ambiente são extremamente significativas e não são devidas ao acaso ($P < 0,0001$ – ANOVA). O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer mostrou que a diferença é extremamente significativa entre Barra Bonita e Lagoa Dourada ($q = 9,695$, $P < 0.001$) e entre Broa e Lagoa Dourada ($q = 6,907$, $P < 0.001$) mas não é significativa entre Barra Bonita e Broa ($q = 3,110$, $P > 0.05$). Estas análises referendam o fato do estado trófico (ET) do Broa (mesotrófico) estar mais próximo de eutrófico.

5.4 – Bactérias – os principais resultados obtidos nas análises bacterianas foram:

5.4.1 – Densidades bacterianas – as variações mensais das densidades bacterianas (D) foram as mostradas na Tab. 3.

Tabela 3 - Valores mensais das densidades bacterianas ($\times 10^6$ cels/mL) em Barra Bonita (BB), no Broa (BR) e na Lagoa Dourada (LD)

Meses	D		
	BB	BR	LD
Jan	-	8,10	2,48
Fev	9,40	5,98	2,31
Mar	9,60	4,07	2,41
Abr	8,27	4,90	2,45
Mai	9,60	5,83	1,86
Jun	8,17	5,63	2,10
\bar{X}	9,01	5,75	2,27
DP	0,72	1,35	0,24
CV (%)	8,0	23,5	10,7

As densidades bacterianas (n° de indivíduos/mL) revelaram maior variação mensal (maior valor de DP e CV) no Broa, seguida por Lagoa Dourada e Barra Bonita. As diferenças entre as médias são extremamente significantes ($P < 0,0001$ – ANOVA) indicando que as variações entre elas são expressivamente maiores do que aquelas que poderiam decorrer do acaso. O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para as médias [ZAR, 1999; TRIOLA, 1999], mostrou diferenças extremamente significativas entre as médias tanto de Barra Bonita e Broa ($q = 8,378$ e $P < 0,001$) quanto de Barra Bonita e Lagoa Dourada ($q = 17,339$ e $P < 0,001$) e de Broa e Lagoa Dourada ($q = 9,339$ e $P < 0,001$). A maior variabilidade mensal da D no Broa pode estar relacionada com a influência do sedimento na superfície devido à turbulência do ambiente, já mencionada.

Para melhor visualização, os resultados estão expressos na Fig. 2

Tais dados revelam que a densidade populacional é um forte indicador bacteriano do estado de trofia do ambiente estudado. A densidade bacteriana média no Broa mostrou-se cerca de 153% maior que na Lagoa Dourada; em Barra Bonita, cerca de 56% maior que no Broa e 297% que na Lagoa Dourada. Estes dados indicam que, nos ambientes e no período estudados, o aumento da densidade populacional bacteriana é uma clara resposta à eutrofização. Esta manifestação é similar à de populações de organismos eucariontes diante da fartura ou carência de recursos, ou seja, quanto maior a capacidade de suporte do ambiente maior a possibilidade de crescimento populacional [Ricklefs, 2003].

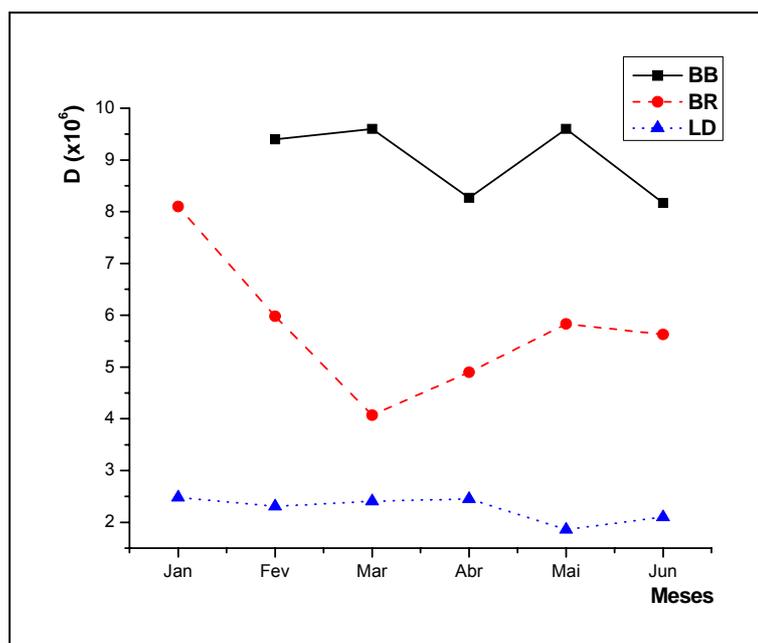


Figura 2 – Densidade (**D**) em número de células x 10⁶/mL em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**) nos meses de coleta

Este resultado é compatível com a literatura, como por exemplo: possível existência de correlação considerável entre clorofila e densidade bacteriana [FUHRMAN, 1980 *appud* AZAM *et al.*, 1983; BIRD e KALFF, 1984; COLE *et al.*, 1988] e desta com concentração de fósforo [CURRIE, 1990]. Alguns autores sugerem, inclusive, que o controle predatório (ao contrário do de recursos) é de menor importância em alguns sistemas, sendo mais importante em sistemas eutróficos do que em oligotróficos [BIRD e KALFF, 1984; COLE *et al.*, 1988].

Apesar da evidência de relação entre estado trófico e D, não se encontrou um resultado significativo nas análises de possíveis correlações lineares entre D e o IET ou qualquer um de seus componentes tanto na Lagoa Dourada ($r = 0,3476$; $P = 0,4996$) quanto no Broa ($r = - 0,1313$; $P = 0,8041$). Em Barra Bonita, uma pequena correlação observada ($r = 0.7296$) não é considerada estatisticamente significativa ($P = 0,1618$) mesmo porque o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,5323$) explica apenas pouco mais que 53% dos resultados obtidos. Assim sendo, a relação observada entre estado trófico e D nos ambientes estudados, não pode ser tratada como uma correlação linear.

Não foram encontradas correlações lineares significativas entre D e as variáveis apresentadas na Tab. A1 (Anexo 3) em Barra Bonita e Broa. Na Lagoa Dourada constatou-se uma correlação considerada estatisticamente não muito significativa ($r = 0,7861$, $P = 0,0637$) entre D e condutividade e entre D e temperatura da amostra ($r = 0,7444$, $P = 0,0897$). Entre os nutrientes estudados também foi encontrada apenas uma correlação estatisticamente não muito significativa entre D e o fosfato total (PO_4tot) na Lagoa Dourada. Em Barra Bonita observou-se apenas uma correlação negativa não muito significativa ($r = -0,8585$, $P = 0,0625$) entre D e N-NH_4^+ . No Broa não foi encontrada nenhuma correlação linear entre D e os nutrientes estudados.

5.4.2 – Volumes celulares – os volumes celulares (V_c) foram calculados (em μm^3) conforme descrito em Material e Métodos e tabelados por seus valores máximos, mínimos, médias, desvios padrão e coeficientes de variação, para cada ambiente estudado, na escala temporal. Os resultados são apresentados na Tab. A5 (Anexo 5).

Numa primeira análise nota-se um claro gradiente de tamanho (biovolume) médio entre Lagoa Dourada (maior valor) e Barra Bonita (menor valor). As diferenças entre as médias são muito significantes ($P = 0,0021$ – ANOVA); as variações entre elas são expressivamente maiores do que aquelas que poderiam decorrer do acaso. O teste de comparações múltiplas mostrou diferenças muito significantes entre Lagoa Dourada e Broa ($q = 5,374$ e $P < 0,01$) e entre Lagoa Dourada e Barra Bonita ($q = 5,465$ e $P < 0,01$) mas a diferença entre as médias de Broa e Barra Bonita não são estatisticamente significantes ($q = 0,3419$ e $P > 0,05$), para os limites de significância do teste indicados em Material e Métodos, provavelmente devido ao fato já citado da proximidade de estado trófico entre Barra Bonita e Broa.

Estes resultados contrariam a expectativa “lógica” decorrente da maior abundância de nutrientes e clorofila em Barra Bonita mas, possivelmente confirmam as observações de BIRD & KALFF [1984] e COLE *et al.* [1988] no que diz respeito à maior importância do controle predatório em ambientes eutróficos - o que parece ser o caso - principalmente se lembrarmos, por exemplo, que nem todas as bactérias são igualmente pastadas (como por nanoflagelados heterotróficos (NFH) os quais preferem as maiores e as em crescimento) [GONZÁLEZ *et al.*, 1990].

Outro fator que pode estar relacionado com o menor tamanho médio dos organismos no ambiente eutrófico é a própria D muito maior neste ambiente, o que implica em processo reprodutivo muito mais intenso, com células se dividindo com maior frequência do que no ambiente oligotrófico (menor D) e, por conseguinte, tendo um tamanho médio menor já que há uma tendência da célula bacteriana em se dividir quando seu comprimento atinge o dobro do comprimento inicial [GROVER, *et al.*, 1977 *appud* BLACKBURN *et al.*, 1998].

A relação entre biovolume bacteriano e estado trófico do ambiente assemelha-se ao verificado com a D, embora em ordem inversa. Considerando-se que o IET do Broa esteve mais próximo do estado eutrófico do que do oligotrófico, a maior proximidade da média dos biovolumes bacterianos neste ambiente mesotrófico com as das células do ambiente eutrófico do que com aquelas do ambiente oligotrófico, fortalece a percepção desta relação.

No entanto, assim como ocorreu com a D, também não foi encontrada uma correlação linear entre IET e os Vcs na Lagoa Dourada ($r = 0,05919$ e $P = 0,9113$) e Broa ($r = -0,2368$ e $P = 0,6515$) mas, uma consistente correlação linear foi verificada em Barra Bonita ($r = 0,9093$ e $P = 0,0323$ com $R^2 = 0,8268$). Testados os componentes do IET, verificou-se que esta correlação é devida basicamente à Cla ($r = 0,9559$ e $P = 0,0110$ com $R^2 = 0,9138$) o que parece fortalecer a hipótese de que os menores valores de Vcs neste ambiente devam-se a uma maior atividade reprodutiva, quando a produção primária também tende a aumentar.

A maior variabilidade das médias (CV) na Lagoa Dourada do que no Broa e em Barra Bonita já sugere maior uniformidade de tamanho bacteriano nesses ambientes, possivelmente devido à maior disponibilidade de recursos, ainda que para uma população numericamente bem maior.

O organismo de maior tamanho ($V_c = 13,928 \mu\text{m}^3$) encontrado foi um filamento observado na Lagoa Dourada, em janeiro. O menor ($V_c = 0,006 \mu\text{m}^3$) foi no Broa em março. É importante notar-se que os Vcs mínimos são bastante semelhantes em todos os ambientes estudados. Verificou-se que comprimento destes organismos menores ($V_c \approx 0,007 \mu\text{m}^3$) foi sempre um valor próximo a $0,2 \mu\text{m}$. Tal fato deveu-se ao critério adotado na análise automatizada das imagens, pelo qual células com tamanho

menor que o poro da membrana utilizada na filtração das amostras, após a coloração, para captura dos organismos, foram desconsideradas [MASSANA *et al.*, 1997]. Esta observação sugere que o espectro de tamanho da população não está totalmente amostrado; as bactérias que estariam compondo o fentoplâncton, possivelmente não foram detectadas através do método utilizado.

Em Barra Bonita, a maior média mensal de biovolumes foi obtida numa coleta realizada durante uma floração algal (março) o que pode indicar não só um período de maior direcionamento do metabolismo bacteriano para o crescimento (a D também atinge um pico neste mês) como também menor pastagem de predadores que poderiam estar se utilizando, neste momento, de outros recursos com uma relação custo/benefício mais compensatória ou, ainda, tais predadores não teriam tido tempo suficiente para aumentar suas densidades de forma a exercerem um efeito “*top down*” suficiente para responder ao aumento da densidade bacteriana. Na Lagoa Dourada observa-se que o avanço na escala temporal em direção aos meses mais secos foi acompanhado por um aumento nos Vcs médios. No Broa observa-se uma tendência inversa.

Nos ambientes e período estudados, o Vc médio mostrou-se um possível indicador de diferenciação entre os ambientes oligotrófico e eutrófico.

Quando comparados os Vcs médios com as variações dos nutrientes estudados, em Barra Bonita encontrou-se apenas uma correlação linear negativa não muito significativa ($r = -0,8552$, $P = 0,0647$) com nitrogênio total (Ntot). No Broa não foi encontrada nenhuma correlação com nutrientes. Na Lagoa Dourada foram encontradas correlações não muito significativas com $\text{NO}_2\text{-N}$ ($r = 0,7727$, $P = 0,0716$) e com Ptot ($r = 0,7614$, $P = 0,0786$). Uma correlação linear significativa ($r = 0,8616$, $P = 0,0274$) foi constatada com fosfato inorgânico (PI) e uma negativa também significativa ($r = -0,8981$, $P = 0,0151$) com SiO_2 .

5.4.3 – Variações morfotípicas – a análise das imagens obtidas nos ambientes estudados revela, de imediato, a considerável variabilidade da composição morfotípica bacteriana em cada um deles. A Fig. 2 mostra imagens típicas dos três ambientes.



Figura 2 – Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência (coloração com DAPI) de diferentes volumes de amostras (Vam) das populações bacterianas na Lagoa Dourada (A) – Vam = 2 mL, Broa (B) – Vam = 1 mL e Barra Bonita (C) – Vam = 0.5 mL

Os valores mensais dos Vcs médios de cada morfotipo, em cada um dos ambientes, são mostrados na Tab. A6 (Anexo 6). Uma primeira observação desta tabela mostra que o único ambiente onde todos os morfotipos estiveram representados em todas as amostras é a Lagoa Dourada. Em Barra Bonita, em fevereiro, março e junho não foram encontrados espirilos. No Broa, não foram encontrados filamentos em março, abril e maio nem espirilos em janeiro, março, abril e junho.

As análises comparativas dos valores mostrados revelaram que, para cocos as diferenças entre as médias não são significativamente maiores do que o esperado pelo acaso ($P = 0,1601$ – ANOVA) o mesmo se constatando com relação a víbrios ($P = 0,2413$ – ANOVA), filamentos ($P = 0,7644$ - ANOVA) e espirilos ($P = 0,6113$ - ANOVA) o que permite a conclusão de que entre as diferentes populações estudadas os tamanhos médios de cocos, víbrios, filamentos e espirilos, não são significativamente diferentes.

Por outro lado, foi constatado que as diferenças das médias dos Vcs de cocobacilos são muito significativas ($P = 0,0022$ – ANOVA). O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer mostrou que a diferença não é significativa entre Barra Bonita e Broa ($q = 1,459$ e $P > 0,05$) mas é significativa entre Broa e Lagoa Dourada ($q = 4,638$ e $P < 0,05$) e muito significativa entre Barra Bonita e Lagoa Dourada ($q = 5,881$ e $P < 0,01$), para os limites de significância indicados em Material e Métodos. Para bacilos, a análise de variâncias mostrou que as diferenças entre as médias são maiores que aquelas decorrentes do acaso ($P = 0,0459$) mas o teste de Tukey-Kramer não detectou diferenças significativas entre os três ambientes, talvez porque os desvios padrão (DP) não são estatisticamente diferentes (teste de Bartlett = 0,1364, $P =$

0,9341). Cocobacilos e bacilos são, portanto, os morfotipos que mostraram maiores diferenças de tamanho nos ambientes e período estudados.

Os resultados obtidos no teste de comparações múltiplas para cocobacilos aproximam-se daqueles obtidos para os Vcs médios das populações amostradas (item 5.4.2), sugerindo que possivelmente as diferenças de tamanhos celulares entre os ambientes sejam devidas principalmente a estes. Os organismos que apresentaram maior CV foram os espirilos (117.69%) na Lagoa Dourada e os com menor CV foram os cocos (16.57%) no Broa. Os CVs de filamentos foram consideravelmente altos nos três ambientes.

Foram analisadas, ainda, as freqüências relativas de cada morfotipo nos ambientes e período estudados. Os resultados estão expressos na Tab. A7 (Anexo 6). As médias das freqüências foram testadas estatisticamente e verificou-se que as diferenças observadas na tabela não são maiores do que aquelas devidas ao acaso para cocos ($P = 0,1578$ – ANOVA), vibrios ($P = 0,1744$) e filamentos ($P = 0,1186$). As diferenças entre as médias de freqüências relativas de espirilos mostraram-se maiores do que aquelas decorrentes do acaso mas o teste de Tukey-Kramer não detectou diferenças significativas entre os três ambientes ($P > 0,05$). Não foi possível aplicar-se o teste de Bartlett para os DPs porque $n < 5$.

Foi constatada uma diferença extremamente significativa entre as médias das freqüências relativas de cocobacilos ($P < 0,0001$ – ANOVA) a qual se observou ser extremamente significativa entre Barra Bonita e Lagoa Dourada ($q = 11,855$, $P < 0,001$) e entre Lagoa Dourada e Broa ($q = 8,894$, $P < 0,001$) mas não significativa entre Barra Bonita e Broa ($q = 3,375$, $P > 0,05$), resultados estes consideravelmente compatíveis com aqueles encontrados para os IETs.

As maiores variações (CVs) nas freqüências relativas morfotípicas ocorreram com os filamentos de Barra Bonita e as menores com os cocobacilos na Lagoa Dourada. As análises morfológicas dos ambientes estudados revelaram que as freqüências relativas (%) de cocos e cocobacilos somadas representam sempre a maior parte dos morfotipos, podendo chegar a 80% das populações (Barra Bonita) e são tão maiores quanto maior o nível trófico do ambiente. As freqüências relativas de bacilos, vibrios, filamentos e espirilos juntas representam, na média, 19,07% das

populações bacterianas em Barra Bonita, 26,51% no Broa e na Lagoa Dourada este valor atinge a marca de 43,36%

Estes dados sugerem, numa primeira análise, possível relação entre a forma celular e a disponibilidade de recursos e, por conseguinte, a atividade metabólica dos organismos. Os organismos com as formas geométricas estudadas tendem a ter uma relação superfície/volume (S/V) tanto maior quanto menor forem seus tamanhos. Cocos e cocobacilos apresentam formas celulares esféricas, esféricas prolatadas ou esferóides e os dados sugerem que em ambientes com maior disponibilidade de recursos (eutróficos) a atividade metabólica dos organismos com estas formas seria facilitada tanto pela quantidade de alimentos disponíveis no ambiente quanto pela facilidade em conduzi-los para o interior das células. Este fato poderia estar promovendo o crescimento rápido assim como a rápida reprodução (estratégia “*r*”) o que resultaria numa maior densidade, como foi observado.

Por outro lado, bacilos, espirilos, víbrios e filamentos apresentam formas celulares que podem ser interpretadas como um cilindro com duas capas hemiesféricas nas extremidades [MASSANA *et al.*, 1997]. Os organismos com tais configurações (especialmente os filamentos) mostraram-se, em média, maiores (biovolumes) do que cocos e cocobacilos. No entanto, quando se considera organismos com um mesmo biovolume, a relação S/V para os de forma cilíndrica é maior do que aquela de esferas, esferas prolatadas ou esferóides.

As freqüências relativas dos organismos com forma geométrica mais cilíndrica mostraram-se maiores no ambiente com menor disponibilidade de recursos (oligotrófico) onde, também, a densidade populacional é bem menor. Como a taxa específica de metabolismo diminui com o aumento da massa celular [PETERS, 1987], e essa aumenta com o biovolume, estes resultados sugerem que as bactérias estariam se adaptando à oligotrofia diminuindo sua atividade metabólica através de um aumento do biovolume com a mudança da forma e sem o custo do dispendioso mecanismo de reprodução (estratégia “*k*”), hipótese esta compatível com a baixa densidade no ambiente, o que, ao mesmo tempo que lhes possibilitaria menor atividade metabólica, também aumentaria a área de contato de suas superfícies com o meio, possibilitando uma maior chance de captação dos poucos recursos disponíveis. Ocorrência similar foi observada por STEINBERGER *et al.* [2002] em biofilmes insaturados.

5.4.3 – IDT e IDM – A proposta de GASOL *et al.* [1997] do uso de um índice de tamanho para a comparação de populações bacterianas está plenamente justificada na introdução deste trabalho. A forma (método) utilizada pelos autores, merece alguma discussão.

Ao proporem o IDT (*SDI*), os autores partiram do uso de esferas de látex com diâmetro nominal de 0,47 μm . As “caudas” (inferior e superior) obtidas na plotagem dos dados foram atribuídas a “erros de manufatura” e ao “processo de medição”. Eles transportaram este entendimento para o “*rank-size*” bacteriano que não é composto por produtos “manufaturados” mas sim apresentam uma abundância e uniformidade naturais decorrentes das condições ambientais que promovem uma variabilidade considerável, não decorrente de “erro de manufatura” ou “processo de medição”.

Ao descartar as “caudas” dos gráficos obtidos a partir dos dados de amostras ambientais, excluíram parte significativa da população amostrada. Os menores biovolumes, particularmente, muitas vezes representam categorias de tamanho dominantes nos ambientes ou, pelo menos, nas amostras. Da mesma forma, mesmo que os maiores biovolumes possam não apresentar alta frequência, têm peso considerável no desvio padrão da média amostral. Além disto, o uso da denominada “amostragem de conveniência” assumida pelos autores, é estatisticamente desaconselhado [TRIOLA, 1999].

Estas justificativas conduziram à opção do uso do Índice de Shannon para cálculo da diversidade de tamanho, tendo em vista que este contempla tanto a abundância de todas as categorias quanto a uniformidade das mesmas, o que não ocorre na forma proposta por GASOL *et al.* [1997].

O Índice de Diversidade Morfológica está sendo proposto no presente trabalho como forma de obtenção de eventuais dados complementares sobre a composição morfológica das populações bacterianas estudadas e uma comparação direta com o IET. Da mesma forma que para o IDT, optou-se pelo uso do índice de Shannon para caracterização da diversidade morfológica por contemplar tanto a abundância dos morfotipos quanto a uniformidade de distribuição dos mesmos.

Os valores de IDT e IDM obtidos para bactérias estão expressos na Tab. 4. As variações mensais dos IDTs de cada ambiente são pequenas, conforme mostram os valores baixos de desvio padrão (DP) e CV mas as diferenças entre as médias dos mesmos são significativas ($P = 0,0172$ – ANOVA) e não decorrentes do acaso. O teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer identificou as diferenças entre as médias de Barra Bonita e Lagoa Dourada (ambientes extremos quanto ao estado trófico) como as mais significativas ($q = 4,528$ e $P < 0,05$) enquanto entre Barra Bonita e Broa ($q = 1,433$ e $P > 0,05$) e entre Broa e Lagoa Dourada ($q = 3,246$ e $P > 0,05$) as diferenças não são significativas.

Tabela 4 - Valores mensais dos Índices de Diversidade de Tamanho (IDT) e de Diversidade Morfológica (IDM) para bactérias em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**)

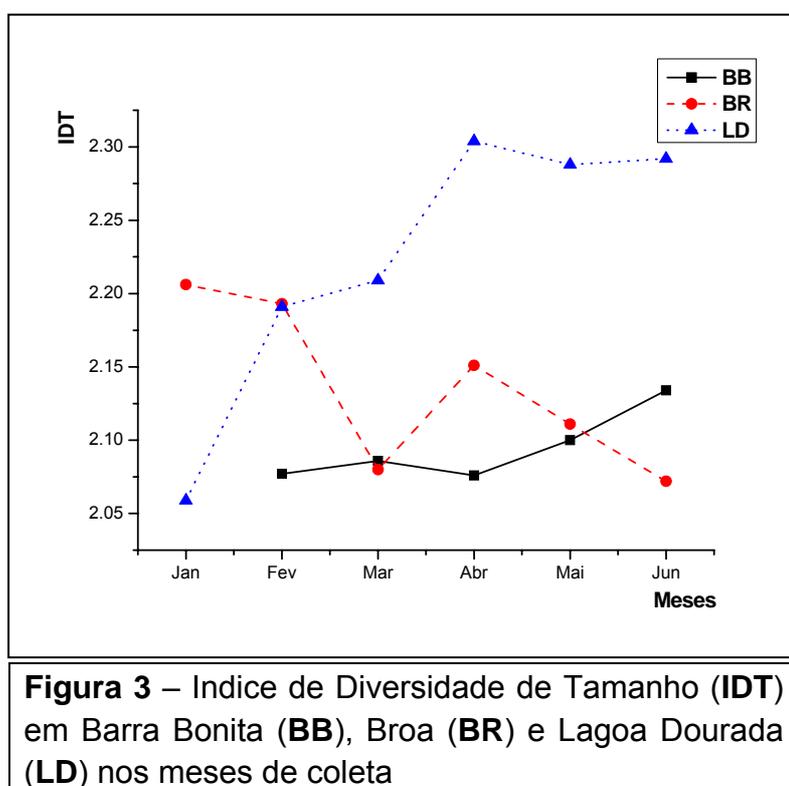
Meses	BB		BR		LD	
	IDT	IDM	IDT	IDM	IDT	IDM
Jan	-	-	2,206	0,545	2,059	0,618
Fev	2,077	0,495	2,193	0,571	2,191	0,575
Mar	2,086	0,535	2,080	0,536	2,209	0,570
Abr	2,076	0,497	2,151	0,530	2,304	0,546
Mai	2,100	0,553	2,111	0,545	2,288	0,604
Jun	2,134	0,509	2,072	0,486	2,292	0,571
\bar{x}	2,09	0,52	2,14	0,54	2,22	0,58
DP	0,02	0,03	0,06	0,03	0,09	0,03
CV (%)	1,2	4,9	2,7	5,2	4,2	4,5

Esta é uma primeira sugestão de que o IDT (abundância e uniformidade de biovolumes) bacteriano pode ser um indicador de nível de trofia para os ambientes eutrófico e oligotrófico nas áreas e períodos estudados, mas não é um indicador consistente para o ambiente mesotrófico. O IDT se mostrou mais elevado no ambiente oligotrófico e menos nos ambientes mesotrófico e eutrófico.

Na análise dos valores mensais dos IDMs, também as variações são pequenas (baixos valores de DP e CV) mas as diferenças entre as médias não são casuais ($P = 0,0040$ – ANOVA). O valor bem menor de P (da ordem de 10^{-1} , aproximadamente) para o IDM revela ser este um indicador mais consistente que o IDT, ao menos quando se pretende compará-los a diferentes níveis de trofia dos ambientes. Aqui também o teste de comparações múltiplas revelou não haver diferença

significativa entre as médias de Barra Bonita e Broa ($q = 1,557$ e $P > 0,05$). Em contrapartida, constatou-se uma diferença significativa ($q = 4,168$ e $P < 0,05$) entre as médias de Broa e Lagoa Dourada e muito significativa ($q = 5,531$ e $P < 0,01$) entre as de Barra Bonita e Lagoa Dourada.

A comparação entre as variações mensais de IDT e IDM não revelou qualquer correlação significativa entre ambos. As Figs. 3 e 4 mostram as variações de IDT e IDM nos ambientes estudados. Nestas constatam-se as nítidas diferenças de variações de IDT e IDM entre Barra Bonita e Lagoa Dourada enquanto os valores obtidos para o Broa oscilam entre estes dois limites.



Os valores de IETm (Tab. 2) de cada um dos ambientes foram comparados com os valores de IDT e IDM (Tab. 4) para análises de eventuais correlações lineares através do teste de correlação linear de Pearson (r) [ZAR, 1999; TRIOLA, 1999].

Os valores de " r " obtidos não indicaram correlação entre IETm e os IDTs e IDMs dos ambientes, com exceção do IDM para a Lagoa Dourada onde se encontrou um valor de $r = - 0,9735$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9477$ e um valor bicaudal de $P = 0,001$ o que evidencia uma correlação linear negativa extremamente

significante entre os dois índices considerados. Esta correlação está expressa na Fig. 5.

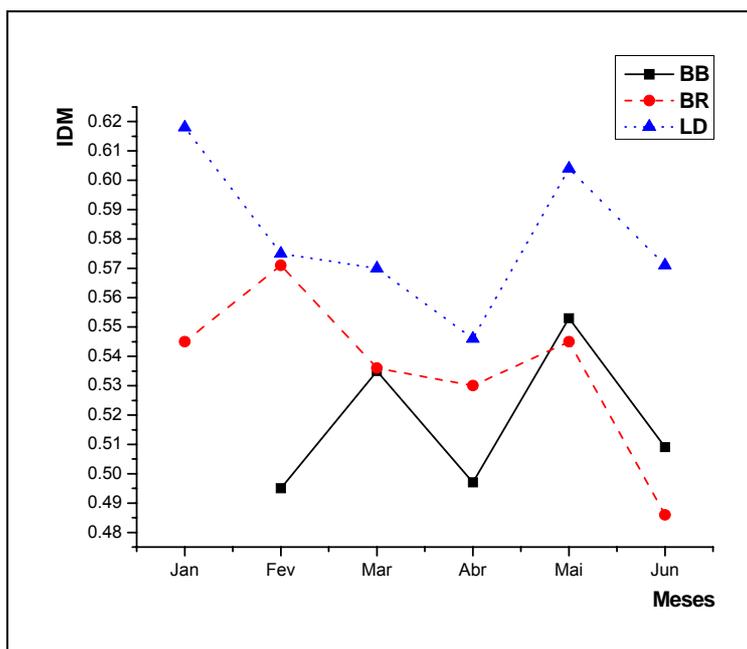


Figura 4 – Índice de Diversidade Morfológica (IDM) em Barra Bonita (BB), Broa (BR) e Lagoa Dourada (LD) nos meses de coleta.

Para identificação de qual dos componentes do IETm (IET[Cla], IET[Ptot] ou IET[DS]) seria o principal responsável pela correlação observada, foram analisadas as possíveis correlações lineares entre o IDM e cada IET separadamente. Não foram encontrados resultados significativos que correlacionassem o IDM com o IET[Ptot] ou o IET[DS] mas um valor de $r = -0,9506$ com $R^2 = 0,9037$ e um valor bicaudal de $P = 0,0036$ evidenciaram que o principal componente do IETm da Lagoa Dourada na correlação do mesmo com o IDM é a concentração de Cla. Esta correlação está expressa na Fig. 6.

O IDM é uma expressão da abundância e uniformidade dos morfotipos estudados. Para os três ambientes a abundância é similar, já que os morfotipos estudados foram os mesmos nestes ambientes. Assim, as variações no IDM serão decorrentes principalmente da maior ou menor uniformidade (frequências relativas) de cada morfotipo. A soma das frequências relativas de bacilos, vibrios, filamentos e espirilos, mais alta na Lagoa Dourada, sugere que a maior diversidade morfológica no

ambiente oligotrófico pode estar diretamente relacionada com as frequências destes morfotipos de geometria mais próxima de uma figura cilíndrica.

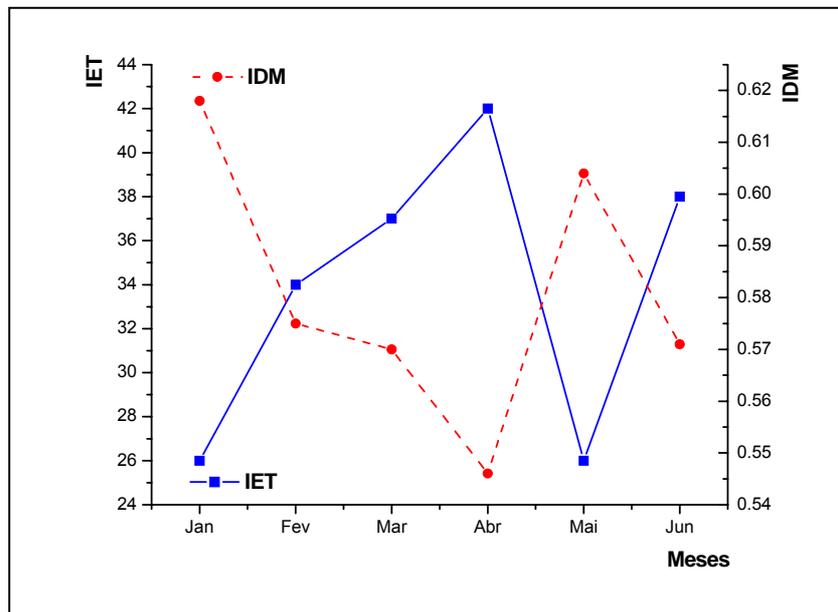


Figura 5 – Correlação entre IET e IDM na Lagoa Dourada (LD) nos meses de coleta.

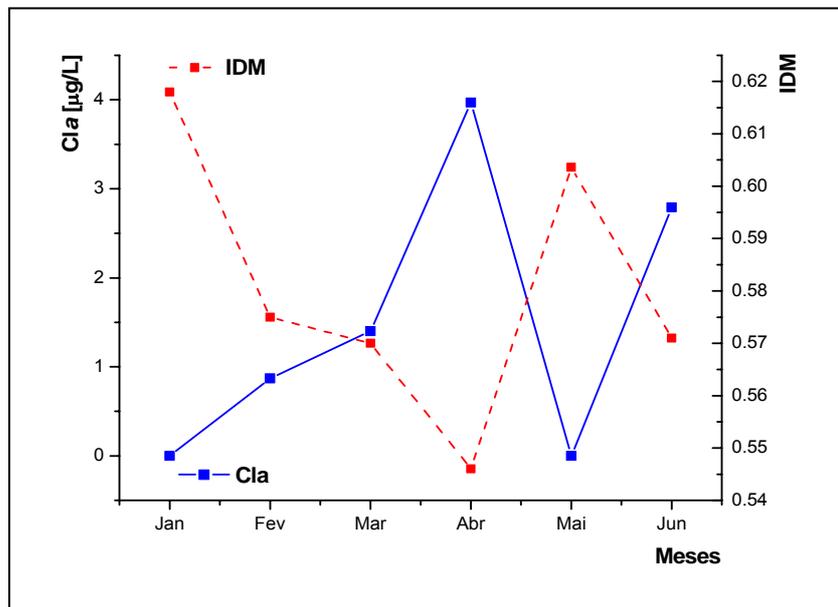


Figura 6 – Correlação entre IDM e Cla na Lagoa Dourada (LD) nos meses de coleta.

Várias hipóteses podem tentar explicar a forte correlação entre Cla e IDM na Lagoa Dourada. A primeira, com respaldo na ecologia de populações [RICKLEFS, 2003;

ODUM, 2001]., seria a da existência neste tipo de ambiente de espécies “*K*” estrategistas que teriam predominantemente formas próximas à cilíndrica e espécies “*r*” estrategistas que teriam formas predominantes próximas à esférica, esférica prolatada ou esferóide. Nos momentos em que a concentração de Cla fosse maior, a maior disponibilidade de recursos favoreceria o desenvolvimento das espécies “*r*” estrategistas enquanto nos momentos de menor concentração de Cla no ambiente, as espécies “*K*” estrategistas apresentariam maior facilidade de adaptação, o que alteraria as freqüências morfológicas e por conseguinte o valor do IDM.

Outra explicação possível envolveria a relação superfície/volume e disponibilidade de recursos. A despeito de um entendimento generalizado de que as bactérias planctônicas respondem à privação alimentar diminuindo seu tamanho (formas esféricas ou próximas dela) aumentando assim sua relação S/V, STEINBERGER *et al.* (2002) mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* respondem á privação de nutrientes em biofilmes insaturados, alongando-se. Através desta adaptação o organismo consegue aumentar sua área superficial proporcionando maior contato com o meio e, por conseguinte, maiores possibilidades de captação dos poucos recursos disponíveis. Portanto, não seria descartável nas condições da Lagoa Dourada, a possibilidade de pleomorfismo de uma ou mais espécies típicas deste ambiente.

A hipótese que nos parece mais provável para explicar o fato, seria a presença neste ambiente de organismos mixotróficos que, em baixas condições de nutrientes (como o P_{tot}) agiriam de forma heterotrófica aumentando a pastagem sobre alguns tipos de bactérias (especialmente cocos e cocobacilos), diminuindo suas freqüências relativas (efeito “*top down*” - [GASOL & VAQUÉ, 1993]) e, por conseguinte, aumentando a diversidade morfológica. Esta hipótese encontra forte respaldo em várias observações sobre o comportamento nutricional dos mixotrófos (especialmente em ambientes oligotróficos) [TITTEL *et al.*, 2003; JONES, 2000; ROBERTS & LAYBOURN-PARRY, 1999; ROTHHAUPT, 1996a; 1996b]. Na Lagoa Dourada já foi observada [TALAMONI, 1995] a presença de dinoflagelados (*Peridinium spp*) com comportamento nutricional mixotrófico [HITCHMAN & JONES, 2000].

6 – CONCLUSÕES

- P_{tot} representou o mais claro divisor de estado trófico dos ambientes, no período estudado;
- Densidade populacional bacteriana foi o indicador mais significativo do estado trófico dos ambientes no período de estudos
- IDM revelou-se um indicador significativo, pelas diferenças das médias, entre o ambiente eutrófico e o oligotrófico, assim como entre o mesotrófico e o oligotrófico mas não tão consistente entre o eutrófico e o mesotrófico, possivelmente devido à proximidade do IET entre estes últimos
- IDT revelou-se um indicador significativo, pelas diferenças das médias, entre o ambiente eutrófico e oligotrófico mas não entre o mesotrófico e estes
- No ambiente oligotrófico constatou-se uma correlação negativa de primeira grandeza, extremamente significativa, entre IET e IDM; esta correlação mostrou-se significativa com a concentração de Cl_a e não significativa com os demais componentes do IET_m, provavelmente devido ou à presença no ambiente de organismos “*K*” estrategistas, ou de organismos pleomórficos ou ainda à presença de organismos mixotróficos, não se podendo excluir a possibilidade de existência dos três tipos.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, G. C. e Zeutschel, R. P. **1970** *Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore áreas of the northeast Pacific Ocean*. *Limnol. Oceanogr.*; **15** :402-407
- AYRES, M; Ayres Jr., M; Ayres, kD. L. e Santos, A. S. **2003** *BioEStat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 290pp Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq. Belém – Brasil
- AZAM, F.; Fenchel, T.; Field, J. G.; Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. e Thingstad, F. **1983** *The ecological role of water-column microbes in the sea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10** :257-263
- BEGON, M.; Harper, J. L. e Townsend, C. R. **1999** *Ecology*. 3ª ed. 1068pp. Blackwell Science. Oxford – UK
- BERMAN, T. e Stone, L. **1994** *Musings on the microbial loop: twenty years after* *Microb. Ecol.* **28** :251-253
- BIRD, D. F. e Kalff, J. **1984** *Empirical relationship between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **41** :1015-1023
- BLACKBURN, N.; Hagström, A.; Wikner, J.; Cuadros-Hansson, R. e Bjørnsen, P. K. **1998** *Rapid determination of bacterial abundance, biovolume, morphology, and growth by neural network-based image analysis*. *App. Environ. Microbiol.* **64** (9) :3246-3255
- BÖLTER, M.; Möller, R. e Dzomla, W. **1993** *Determination of bacterial biovolume with epifluorescence microscopy: comparison of size distribution from image analysis and size classifications*. *Mircon* **1** :31-40
- CARLSON, R. E. **1977** *A trophic state index for lakes*. *Limnol. Oceanogr.* **22**(2) :361-380
- COLE, J. J.; Findlay, S. e Pace, M. L. **1988** *Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43** :1-10
- COSTA, C. S. e Antón, D. N. **1999** *Conditional lethality of cell shape mutation of Salmonella typhimurium: rodA and mre mutants are lethal on solid but not in liquid medium*. *Curr. Microbiol.* **38** :137-142
- CURRIE, D. J. **1990** *Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorus*. *Limnol. Oceanogr.* **35** :1437-1455
- DUCKLOW, H. W.; Purdie, D. A.; Williams, P. J. LeB. E Davis, J. M. **1986** *Bacterioplankton: a sink for carbon in a coastal marine plankton community*. *Science* **232** :865-867
- ESTEVEES, F. DE A. **1998** *Fundamentos de Limnologia*. 2ª ed. 602pp. Edit. Interciência Ltda. Rio de Janeiro – Brasil.
- FAZIO, S. D.; Mayberry, W. R. e White, D. C. **1978** *Muramic acid assay in sediments*. *Mar. Biol.* **48** :185-197

- FENCHEL, T. 1982** *Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth.* Mar. Ecol. Prog. Ser. **8**(3) :225-231
- FERRARI, A. C. 2002** *Comunidade de bactérias e nanoflagelados ao longo de um gradiente trófico em ambientes subtropicais rasos.* 117pp. Dissertação [Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais] - Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – Brasil
- FHURMAN, J. A. e Azam, F. 1982** *Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results.* Mar. Biol. **66** :109-120
- FRANCISCO, D. E.; Mah, R. A. e Rabin, A. C. 1973** *Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria.* Trans. Am. Micros. Soc. **92**(3) :416-421
- GASOL, J. M. e Vaqué, D. 1993** *Lack of coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria: a general phenomenon across aquatic systems?* Limnol. Oceanogr. **38**(3) :657-665
- GASOL, J. M.; R. Massana e C. Pedrós-Alió 1997** *Bacterial size structure as a method to analyze communities* In: Martins, M.T.; Sato, M.I.Z.; Tiedje, J. M.; Hagler, L. C. N.; Döbreiner, J.; Sanchez, P. S. (eds) *Progress in Microbial Ecology.* Brazilian Society for Microbiology. Santos – Brasil.
- GODFRAY, H. C. J. e Lawton, J. H. 2001** *Scale and species numbers.* Trends in Ecol. & Evol. **16**(7) :400-404
- GOLTERMAN, H. L., Clymo, R. S. e Ohnstad, M. A. N. 1978** *Methods for physical and chemical analysis of fresh water* IBP Handbook n° 8, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 2nd ed., 214 pp
- GONZÁLEZ, J. M.; Sherr, E. B. e Sherr, B. F. 1990** *Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates.* Appl. Environ. Microbiol. **56** :583-589
- GÜDE, H. 1988** *Direct and indirect influences of crustacean zooplankton on bacterioplankton of Lake Constance.* Hydrobiologia: **159** :63-73
- GÜDE, H. 1989** *The role of grazing on bacteria in plankton succession,* pp. 337-364. In Sommer, U. (ed.), *Plankton Ecology.* Springer
- HADAS, O. e Berman, T. 1998** *Seasonal abundance and vertical distribution of protozoa (flagellates, ciliates) and bacteria in Lake Kinneret, Israel.* Aquat. Microb. Ecol. **14** :161-170
- HITCHMAN, R. e Jones, H. L. J. 2000** *The role of mixotrophic protists in the population dynamics of the microbial food web in a small artificial pond.* Freshw. Biol. **43** : 231-241
- HOBBIE, J. E.; Daley, R. J. e Jasper, S. 1977** *Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy.* Appl. and Environm. Microbiol. **33**(5) :1225-1228
- JONES, J. G. 1979** *A guide to methods for estimation microbial numbers and biomass in freshwater.* Scient. Publ. Freshwat. Biol. Ass n. 39
- JONES, R. I. 2000** *Mixotrophy in planktonic protists: an overview* Fresh. Biol. **45** :219-226

- KARL**, D. M. e Holm-Hansen, O. **1975** *Methodology and measurement of adenylate energy charge ratios in environmental samples*. Mar. Biol. **48**: 185-197
- KOROLEFF**, K. **1983** *Determination of phosphorus*. In Grasshoff, K.; Erhardt, M. E Kremling, K. (eds) *Methods of seawater analysis*. 2nd ed., Verlag Chemie, Weinheim, **9**(1) :125-39
- KRATZER**, C. R. e Brezonik, P. L. **1981** *A Carlson-type trophic state index for nitrogen in Florida lakes*. Wat. Res. Bul.; **17**(4) :713-715
- LA FERLA**, R; Lo Giudice, A. e Maimone, G. **2004** *Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea*. Sc. Marin. **68**(1) 23-31
- LARSSON**, U. e Hagström, A. **1982** *Fractionated phytoplankton primary production, exudate release, and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient*. Mar. Biol. **67** :57-70
- LINDEMANN**, R. L. **1942** *The trophic-dynamic aspect of ecology*. Ecology **23** :399-418
- LORENZEN**, C. J. **1967** *Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations*. Limnol. Oceanogr. **12** :343-346
- MACKERETH**, F. J. H.; Heron, J. e Talling, J. F. **1978** *Water analysis* Sci. Publ. Fresh. Biol. Ass. **36**
- MANN**, K. H. **1982** *The ecology of coastal waters: a systems approach*. Blackwell. Oxford – UK.
- MARKER**, A. F. H.; Nusch, E. A., Rai, H. e Riemann, B. **1980** *The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations*. Arch. Hydrobiol. Beih. **14**: 91-106
- MASSANA**, R.; Gasol, J. M., Bjørnsen, P. K.; Black-Burn, N.; Hagström, A; Hietanen, S.; Hygum, B. H.; Kuparinen, J. e Pedrós-Alió, C **1997** *Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems*. Sci. Mar. **61**(3) :397-407
- MELÃO**, M. G. G. e Rocha, O. **1999** *Biomass and productivity of the freshwater sponge Metania spinata (Carter, 1991) (Demospongiae: Metaniidae) in a Brazilian reservoir*. Hydrobiologia **390** :1-10
- MERCANTE**, C. T. J. e Tucci-Moura, A. **1999** *Comparação entre os índices de Carlson e de Carlson modificado aplicados a dois ambientes aquáticos subtropicais, São Paulo, SP*. Acta Limn. Bras. **11**(1) :1-14
- MORIARTI**, D. J. W. **1977** *Improved method using muramic acid to estimate biomass of bacteria in sediments*. Oecologia **26** :317-323
- ODUM**, E. P. **1988** *Ecologia*. 1^a ed. 434pp. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro – RJ.
- ODUM**, E. P. **2001** *Fundamentos de Ecologia* 6^a ed. 927pp. Edit. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa – Portugal

- PEDRÓS-ALIÓ, C. e Guerreiro, R. 1994** *Prokaryotology for the limnologist*. In Margalef, R. (ed.). *Limnology now. A paradigm of planetary problems*. Amsterdam: Elsevier. :37-57
- PETERS, R. H. 1987** *The ecological implications of body size*. 1ª ed. (reimpressão). 328pp. Cambridge University Press. New York – USA.
- PHILLIPSON, John 1969** *Ecologia Energética*. 93pp. 2ª ed. Companhia Editora Nacional. São Paulo – SP
- POMEROY, L. R. 1974** *The ocean's food web, a changing paradigm*. *BioScience* **24**(9) :499-504
- POMEROY, L. R. e Johannes, R. E. 1966** *Total plankton respiration*. *Deep Sea Res.* **13** :971-973
- POMPÊO, M. L. M 1991** *Aspectos ecológicos da “Lagoa Dourada” (Itirapina – SP), com ênfase na produtividade primária do fitoplâncton, perifíton e da macrófita aquática Utricularia gibba*. São Carlos, USP, 207pp (Dissertação)
- PORTER, K. G. e Feig, Y. S. 1980** *The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora*. *Limnol. Oceanogr.* **25**(5) :943-948
- REGALI-SELEGHIM, M. H. 2001** *Rede trófica microbiana em um sistema eutrófico raso (reservatório do Monjolinho – São Carlos – SP) – estrutura e função*. 92pp. Tese [Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais] - Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP
- RICKLEFS, R. E. 2003** *A economia da natureza*. 5ª ed. 503pp. Edit. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro – Brasil.
- ROBERTS, E. C. e Laybourn-Parry, J. 1999** *Mixotrophic cryptophytes and their predators in the Dry Valley lakes of Antarctica*. *Fresh. Biol.* **41** :737-746
- ROTHHAUPT, K. O. 1996a** *Utilization of substitutable carbon and phosphorus sources by the mixotrophic chrysophyte Ochromonas sp.* *Ecology* **77**(3) :706-715
- ROTHHAUPT, K. O. 1996b** *Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligately photoautotrophic and phototrophic competitors*. *Ecology* **77**(3) :716-724
- SALAS, H. J. e Martino, P. 1991** *A simplified phosphorus trophic state model for warm-water tropical lakes*. *Wat. Res.* **25**(3) :341-350
- SALAS, H. J. e Martino, P. 2001** *Metodologias simplificadas para la evaluación de eutroficación em lagos cálidos tropicales*. Relatório CEPIS. 60pp
- SANDERS, R. W.; Caron, D. A. e Berninger, U-G 1992** *Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86** :1-14
- SHELDON, R. W.; Prakash, A. e Sutcliffe, W. H. 1972** *The size distribution of particles in the ocean*. *Limnol. Oceanogr.* **17** :327-340
- SHERR, E. B. e Sherr, B. F. 1988** *Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept*. *Limnol. Oceanogr.* **33**(5) :1225-1227

- SHERR, E. B. e Sherr, B. F. 1993** *Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists*. In: Kemp, P. F.; Sherr, E.; Sherr, B. e Cole, J. J. (eds.). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers. Florida – USA.
- SHERR, E. B.;** Sherr, B. F. e Albright, L. J. **1987** *Bacteria: link or sink?* *Science* **235** :88-89
- SHERR, E. B.;** Sherr, B. F. e Paffenhöffer, G-A. **1986** *Phagotrophic protozoa as food for metazoans: a “missing” trophic link in marine pelagic food webs?* *Mar. Microb. Food Webs* **1** :61-80
- SOROKIN, Y. I. e Lyutsarev, S. V. 1978** *A comparative evaluation of two methods for determining the biomass of planktonic microflagellates*. *Oceanol. Acad. Sci. USSR* **18** :232-236
- STEINBERGER, R. E.;** Allen, A. R.; Hansma, H. G. E Holden, P. A. **2002** *Elongation correlates with nutrient deprivation in Pseudomonas aeruginosa – unsaturated biofilms* *Microb. Ecol.* **43** :416-423
- STOECKER, D. K. e Capuzzo, J. McD. 1990** *Predation on protozoa: its importance to zooplankton*. *J. Plankton Res.* **12** :891-908
- STRICKLAND, J. D. H. e Parsons, T. R. 1968** *A practical handbook of seawater analysis*. 1st ed., J. Fish. Res. Bd. Can., bull n° 138
- SUN, J. e Liu, D. 2003** *Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplakton*. *J. Plank. Res.* **25**(11) :1331-1346
- TALAMONI, J. L. B. 1995** *Estudo comparativo das comunidades planctônicas de lagos de diferentes graus de trofia e uma análise do efeito de Microcystis aeruginosa (Cyanophyceae) sobre algumas espécies de microcrustáceos*. 305pp. Tese [Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais] - Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – Brasil
- THOMAS, J. P. 1971** *Release of dissolved organic matter from natural population of marine phytoplankton*. *Mar. Biol.* **11** : 311-323
- THOMAZ, S. M. 1999** *O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos*. In: Pompêo, M. L. M. (Ed.) *Perspectivas da Limnologia no Brasil*; São Luis: Gráfica e Editora União :147-167
- THOMAZ, S. M. e Wetzel, R. G. 1995** [³H] *Leucine incorporation methodology to estimate epiphytic bacterial biomass production*. *Microb. Ecol.* **29** :63-70
- TITTEL, J.;** Bissinger, V.; Zippel, B.; Gaedke, U.; Bell, E.; Lorke, A. e Kamjunke, N. **2003** *Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs*. *PNAS* **100**(22) – 12776-12781
- TORTORA, G. J.;** Funke, B. R. e Case, C. L. **2003** *Microbiologia*. 6ª ed. 827pp. Edit. Artmed Editora S.A. Porto Alegre – Brasil
- TRANVIK, L. J. e Sieburth, J. Mcn. 1989** *Effects of flocculated humic matter on free and attached pelagic microorganisms*. *Limnol. Oceanogr.* **34** :688-699

- TREES, C. C.; Kennicutt, M. C. e Brooks, J. M. 1985** *Errors associated with the standard fluorimetric determination of chlorophylls and phaeopigments*. Mar. Chem. **17** 1-12
- TRIOLA, M. F. 1999** *Introdução à estatística*. 7ª ed. 410pp. Edit. LTC-Livros Técnicos e Cient. Ltda. Rio de Janeiro – Brasil
- TUNDISI, J. G. e Matsumura-Tundisi, T. 1995** *The Lobo-Broa ecosystem research*. In: Tundisi, J. G.; Bicudo, C. E. M. e Matsumura-Tundisi, T. (eds.) *Limnology in Brazil*. ABC/SBL – Rio de Janeiro – Brasil
- TUNDISI, J. G.; Rocha, O.; Matsumura-Tundisi, T. e Braga, B. 1998** *Reservoir management in South America*. Water Res. Devel. **14**(2) :141-155
- UNEP-IETC 2001** *Planejamento e gerenciamento de lagos e reservatórios: uma abordagem integrada ao problema da eutrofização*. Edit. Resp. pela edição portuguesa: Prof. Dr. José Galizia Tundisi. 385pp
- VALDERRAMA, J. C. 1981** *The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters*. Mar. Chem. **10** :109-122
- VELJI, M. I. e Albright, L. J. 1993** *Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria*. In: Kemp, P. F., Sherr, B. F., Sherr, E. B. e Cole, J. J. (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. 1ª ed. 777pp. Edit. Lewis Publishers – USA.
- WATSON, S. W.; Nivitsky, J. A.; Quinby, H. L. e Valois, F. W. 1977** *Determination of bacterial number and biomass in the marine environment*. Appl. and Environm. Microbiol. **33** :940-947
- WEISSE, T. 1991** *The annual cycle of heterotrophic freshwater nanoflagellates: role of bottom-up versus top-down control*. J. Plankton Res. **13**(1) :167-185
- WEISSE, T. e Scheffel-Möser, U. 1991** *Uncoupling the microbial loop: growth and grazing loss rates of bacteria and heterotrophic nanoflagellates in the North Atlantic*. Mar. Ecol. Prog. Ser. **71** :195-205
- WETZEL, R. G. e Likens, G. E 1991** *Limnological Analyses*. 2ª ed. 391pp. Springer-Verlag. New York – USA.
- WILLIAMS, P. J. leB. 1970** *Heterotrophic utilization of dissolved organic compounds in the sea. I. Size distribution of population and relationship between respiration and incorporation of growth substrates*. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. **50** :859-870
- WOMMACK, K. E. e Colwell, R. R. 2000** *Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems* Microb. Molec. Biol. Rev. **64**(1) :69-114
- WRIGHT, R. T. 1988** *A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing*. Hydrobiologia **159** :111-117
- WRIGHT, R. T.; Coffin, R. B. e Lebo, M. E. 1987** *Dynamics of planktonic bacteria and heterotrophic microflagellates in the Parker estuary, northern Massachusetts*. Cont. Shel Res. **7** :1383-1397

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

ZARITSKY, A. 1975 *On dimensional determination of rod-shaped bacteria*. *J. Theor. Biol.* **54**:243-248

ANEXOS

ANEXO 1 – Modelo do elo microbiano (*microbial loop*)

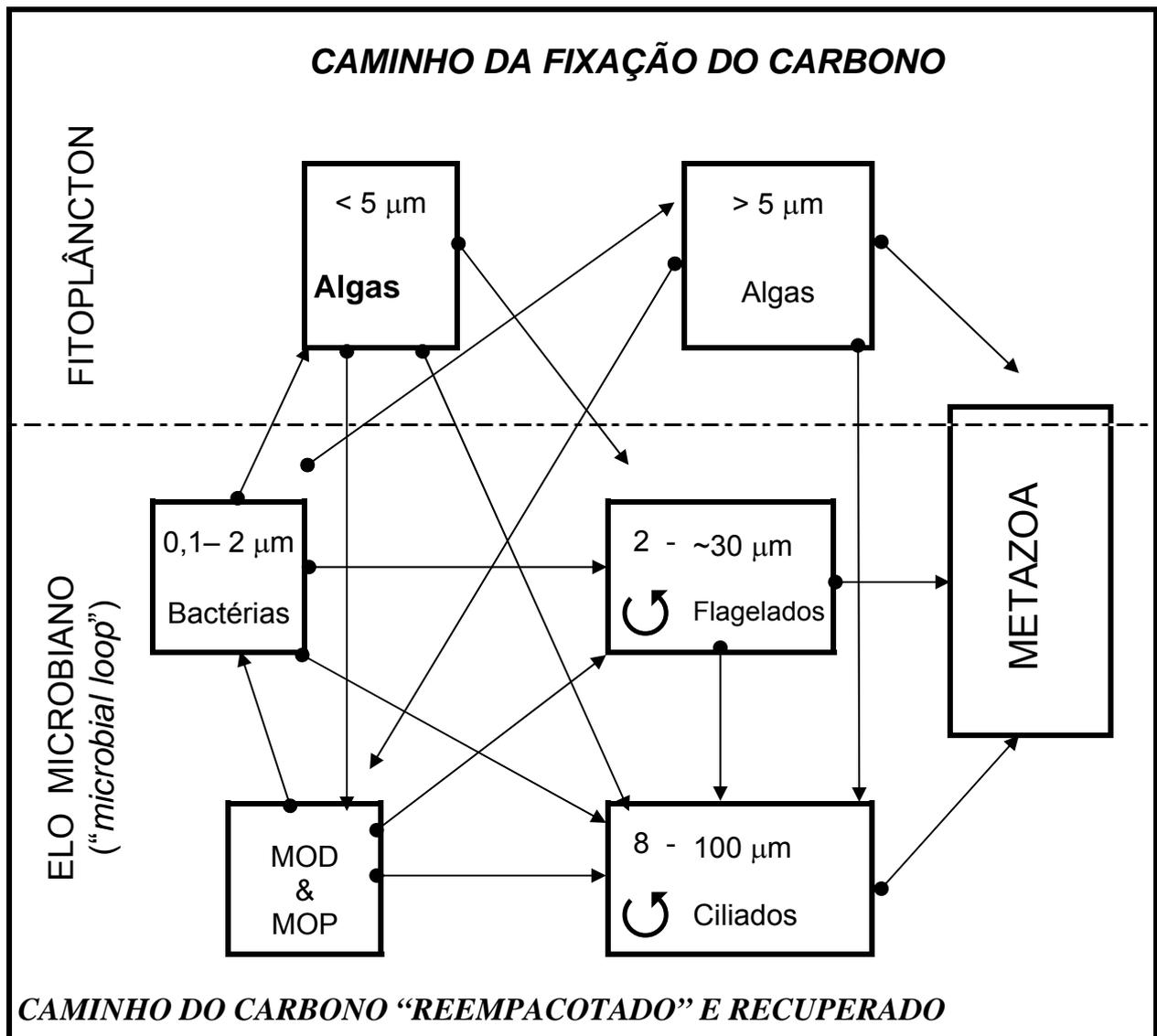


Figura A1 – Principais elos da teia alimentar microbiana e sua relação com os metazoários. A teia alimentar microbiana está separada em fitoplâncton e elo microbiano (EM). As flechas curvas nos compartimentos de flagelados e ciliados indicam possíveis interações dentro destas amplas classes de organismos. Neste modelo, a produção de algas <math> < 5 \mu\text{m}</math> só é acessível aos metazoários após ter sido "reempacotada" em células de grandes protozoários (segundo SHERR & SHERR, 1988).

ANEXO 2 – Modelo da Ficha de Atividades de Campo

UFSCar - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PPGERN – Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais

FICHA DE ATIVIDADES DE CAMPO

PROJETO:		
Responsáveis pela coleta:		
Local:	Ponto (GPS)	Tipo de Coleta: () Lago
Data:		() Represa () Rio
Hora:		() Efluente industrial
() Coluna d'água () Sedimento		() E fluente doméstico
Profundidade =	m	Profund. Amostra = m
		Altitude = m

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	Amostra	Volume =	ml
Temperatura do ar =	°C	pH =	
Temperatura da amostra =	°C	Condutividade =	µS cm ⁻¹
Transparência da água (Secchi) =	m	Turbidez =	Salinidade =
Obs.: pH, OD, Condutividade e Turbidez coletados por equipamento Horiba			
Destinação da Amostra:			
Fixador utilizado:			

CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS RELEVANTES		
() Cor	() Odor	() Não chove há mais de 15 dias
() Presença de "blooms" de algas		() Não chove há mais de 1 mês
() Presença de peixes ou outros animais mortos		() Dia ensolarado
		() Dia nublado
() Vento forte nas últimas 24 horas		() Ocorrência de desmatamento
() Vento fraco nas últimas 24 horas		() Presença de mata ciliar
() Vento moderado nas últimas 24 horas		() Atividade mineradora a montante do ponto de coleta
() Chuva forte nas últimas 24 horas		
() Chuva fraca nas últimas 24 horas		() Presença de "lixões" na proximidade
() Chuva moderada nas últimas 24 hs.		() Presença de afluentes
() Não chove há mais de 1 semana		() Presença de macrófitas
Direção do vento:		
Observações:		

OCUPAÇÃO E USOS DA BACIA HIDROGRÁFICA	
() Tipo de agricultura	() Moderada urbanização
() Tipo de pecuária	() Baixa urbanização
() Intensa urbanização	()
Observações:	

ANEXO 3 – Tabelas dos valores mensais das variáveis abióticas

Tabela A1 - Valores mensais de DS (m), Tam (°C), pH, OD (mgO₂/L), Cond (μS/cm) e Alc (μeq/L) em Barra Bonita (BB), Broa (BR) e Lagoa Dourada (LD)

Meses	BB						BR						LD					
	DS	Tam	pH	OD	Cond	Alc	DS	Tam	pH	OD	Cond	Alc	DS	Tam	pH	OD	Cond	Alc
Jan	-	-	-	-	-	-	1,9	25,1	5,74	7,60	0,008	75,5	3,8	25,4	5,09	7,08	0,002	43,0
Fev	2,5	26,2	6,77	2,06	0,186	684	1,8	27,4	5,34	8,38	0,006	78,0	3,7	28,7	5,53	8,45	0,002	55,0
Mar	1,2	27,6	9,32	13,33	0,180	629	1,9	25,5	6,03	7,67	0,008	54,0	3,7	24,7	5,68	7,30	0,003	37,0
Abr	3,4	25,6	6,88	5,17	0,173	691	2,2	26,5	6,34	5,10	0,008	75,0	4,3	24,2	5,54	1,56	0,002	52,0
Mai	3,4	22,9	7,07	7,33	0,173	700	1,6	20	5,38	4,45	0,007	77,0	4,4	18,8	5,03	5,70	0,001	40,0
Jun	2,9	19,2	6,98	5,03	0,179	734	1,9	18,4	5,45	7,60	0,007	61,0	4,5	17,4	5,42	7,54	0,001	45,0
\bar{X}	2,7	24,3	7,40	6,58	0,178	688	1,9	23,8	5,71	6,80	0,007	70,1	4,07	23,2	5,38	6,272	0,002	45,3
DP	0,91	3,32	1,08	4,21	0,005	38	0,19	3,70	0,40	1,61	0,001	10,1	0,37	4,27	0,26	2,474	0,001	6,95
CV (%)	33,93	13,67	14,54	63,97	3,06	5,52	10,31	15,53	7,06	23,66	11,13	14,34	9,16	18,4	4,89	39,44	41,06	15,33

DS = disco de Secchi Tam = temperatura da amostra OD = oxigênio dissolvido Cnd = condutividade Alc = alcalinidade

Tabela A2 - Valores mensais das concentrações (em μg/L) dos nutrientes nitrogenados em Barra Bonita (BB), Broa (BR) e Lagoa Dourada (LD)

Meses	BB				BR				LD			
	NO ₂ -N	NO ₃ -N	N-NH ₄ ⁺	Ntot	NO ₂ -N	NO ₃ -N	N-NH ₄ ⁺	Ntot	NO ₂ -N	NO ₃ -N	N-NH ₄ ⁺	Ntot
Jan	-	-	-	-	0,87	15,52	25,20	261,25	0,24	1,35	6,54	168,62
Fev	43,67	1648,47	41,52	2134,66	1,04	28,27	24,42	233,20	0,41	3,71	15,87	145,14
Mar	14,83	693,63	8,88	1547,59	1,04	18,35	11,21	299,74	0,07	2,77	3,43	152,97
Abr	23,57	771,07	97,49	1867,21	1,72	8,90	41,52	287,99	0,87	6,54	24,42	182,97
Mai	22,95	698,82	24,42	1997,67	1,83	40,54	30,64	258,64	0,70	3,71	11,21	188,19
Jun	30,78	1634,30	58,63	2330,35	1,15	93,90	26,75	396,28	0,47	5,13	14,32	224,07
\bar{X}	27,16	1089,26	46,19	1975,49	1,28	34,25	26,63	289,52	0,46	3,87	12,63	176,99
DP	10,82	504,97	34,19	294,35	0,40	31,24	9,83	57,32	0,29	1,81	7,43	28,42
CV (%)	39,83	46,36	74,01	14,90	31,40	91,23	36,90	19,80	62,89	46,77	58,82	16,06

NO₂-N = nitrito NO₃-N = nitrato N-NH₄⁺ = amônio Ntot = nitrogênio total

Tabela A3 - Valores mensais das concentrações (em µg/L) dos nutrientes fosfatados e da sílica (em mg/L) em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**)

Meses	BB					BR					LD				
	PI	PTD	PO _{4 tot}	P _{tot}	SiO ₂	PI	PTD	PO _{4 tot}	P _{tot}	SiO ₂	PI	PTD	PO _{4 tot}	P _{tot}	SiO ₂
Jan	-	-	-	-	-	3,32	2,11	1,21	15,09	2,50	5,45	1,82	3,64	9,87	1,57
Fev	80,32	72,77	7,56	96,65	3,79	7,90	2,70	5,20	12,16	1,42	3,93	2,11	1,82	7,26	1,19
Mar	36,01	23,81	12,21	65,33	6,07	5,15	2,40	2,75	17,38	1,71	3,62	1,52	2,10	9,22	1,31
Abr	30,21	19,70	10,51	45,43	3,62	17,37	10,90	6,47	26,19	0,99	9,73	5,63	4,10	13,46	0,75
Mai	40,90	24,98	15,92	76,75	4,21	15,84	4,45	11,39	19,66	0,96	8,82	1,82	7,00	11,83	0,56
Jun	23,22	8,52	31,73	47,72	4,93	3,58	9,21	12,79	16,40	1,68	5,92	2,28	8,20	8,89	1,21
\bar{x}	42,13	29,95	15,59	66,38	4,52	8,86	5,30	6,63	17,81	1,54	6,24	2,53	4,48	10,09	1,10
DP	22,35	24,80	9,52	21,28	1,00	6,24	3,82	4,63	4,80	0,57	2,52	1,54	2,60	2,22	0,37
CV (%)	53,04	82,80	61,09	32,07	22,11	70,42	72,04	69,79	26,94	36,99	40,36	60,91	58,11	21,99	33,96

PI = fosfato inorgânico PTD = fosfato total dissolvido PO_{4 tot} = fosfato total P_{tot} = fósforo total SiO₂ = sílica

ANEXO 4 – Tabela dos valores mensais das variáveis bióticas

Tabela A4 - Concentrações mensais de clorofila *a* (Cla µg/L) e feofitina (Feo µg/L) em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BR**) e Lagoa Dourada (**LD**)

Meses	BB		BR		LD	
	Cla	Feo	Cla	Feo	Cla	Feo
Jan	-	-	6,76	1,70	0,00*	3,67
Fev	12,66	1,61	4,21	1,69	0,87	2,46
Mar	31,22	3,91	5,09	2,04	1,40	2,91
Abr	5,33	2,13	5,85	2,34	3,97	3,15
Mai	4,59	1,84	4,68	1,87	0,00*	3,96
Jun	7,26	0,36	4,71	1,89	2,79	1,12
\bar{x}	12,21	1,97	5,22	1,92	2,26	2,88
DP	11,09	1,28	0,93	0,24	1,40	1,01
CV (%)	90,76	64,92	17,83	12,65	62,10	35,17

ANEXO 5 – Tabela dos valores mensais dos volumes celulares

Tabela A5 - Valores mensais dos volumes celulares (Vc em μm^3) máximos (**Max**), mínimos (**Min**) e médios (\bar{x}) em Barra Bonita (**BB**), Broa (**BB**) e Lagoa Dourada (**LD**)

Meses	BB					BR					LD				
	Max	Min	\bar{x}	DP	CV(%)	Max	Min	\bar{x}	DP	CV(%)	Max	Min	\bar{x}	DP	CV(%)
Jan	-	-	-	-	-	5,895	0,007	0,274	0,468	170,446	13,928	0,008	0,242	0,981	405,672
Fev	3,111	0,007	0,155	0,267	172,292	1,585	0,007	0,208	0,218	104,894	7,011	0,008	0,233	0,514	220,934
Mar	2,589	0,007	0,229	0,379	165,243	1,772	0,006	0,137	0,194	142,353	5,154	0,007	0,303	0,532	175,788
Abr	2,858	0,007	0,144	0,261	181,205	1,342	0,007	0,150	0,171	114,281	3,742	0,007	0,474	0,500	105,363
Mai	1,280	0,008	0,152	0,202	133,154	4,476	0,008	0,154	0,313	203,885	4,058	0,008	0,560	0,771	137,517
Jun	1,688	0,007	0,133	0,187	140,584	1,195	0,007	0,130	0,177	135,821	2,914	0,008	0,401	0,446	111,025
\bar{x}	2,305	0,007	0,163			2,711	0,007	0,175			6,135	0,007	0,369		
DP	0,79	0,0002	0,04			1,98	0,0005	0,06			4,07	0,0002	0,13		
CV (%)	34,07	2,41	23,57			72,99	6,42	31,78			66,37	2,70	35,94		

ANEXO 6 – Tabelas dos valores mensais dos Vcs e freqüências relativas dos morfotipos estudados

Tabela A6 - Valores mensais dos volumes celulares (Vc em μm^3) médios dos morfotipos bacterianos em Barra Bonita (BB), Broa (BR) e Lagoa Dourada (LD)

Meses	BB						BR						LD					
	C	CB	B	V	F	E	C	CB	B	V	F	E	C	CB	B	V	F	E
Jan	-	-	-	-	-	-	0,088	0,230	0,504	0,177	1,575	-	0,121	0,140	0,508	0,223	1,474	0,161
Fev	0,130	0,118	0,400	0,199	1,001	-	0,185	0,216	0,237	0,167	0,124	0,239	0,125	0,275	0,266	0,179	0,476	0,425
Mar	0,171	0,122	0,227	0,246	1,363	-	0,099	0,123	0,219	0,163	-	-	0,100	0,250	0,412	0,175	2,768	0,465
Abr	0,143	0,110	0,111	0,130	1,292	0,155	0,088	0,136	0,253	0,183	-	-	0,212	0,323	0,405	0,186	1,403	2,103
Mai	0,137	0,106	0,316	0,104	1,162	0,197	0,096	0,170	0,271	0,152	-	0,269	0,165	0,309	0,355	0,584	0,585	0,360
Jun	0,108	0,200	0,144	0,105	0,092	-	0,111	0,128	0,178	0,114	0,903	-	0,242	0,360	0,543	0,167	0,619	0,228
\bar{X}	0,138	0,131	0,240	0,157	0,982	0,176	0,111	0,167	0,277	0,159	0,867	0,254	0,161	0,276	0,415	0,252	1,221	0,624
DP	0,023	0,039	0,12	0,063	0,516	0,03	0,04	0,05	0,12	0,02	0,73	0,02	0,06	0,08	0,10	0,16	0,87	0,73
CV (%)	16,57	29,67	49,97	40,26	52,58	17,1	33,63	27,86	41,81	15,58	83,71	8,35	35,01	27,83	24,34	64,90	71,53	117,69

C = cocos CB = cocobacilos B = bacilos V = vibrios F = filamentos E = espirilos

Tabela A7 - Valores mensais das freqüências relativas dos diferentes morfotipos bacterianos em Barra Bonita (BB), Broa (BR) e Lagoa Dourada (LD)

Meses	BB						BR						LD					
	C	CB	B	V	F	E	C	CB	B	V	F	E	C	CB	B	V	F	E
Jan	-	-	-	-	-	-	0,218	0,440	0,267	0,070	0,004	-	0,367	0,335	0,157	0,093	0,032	0,016
Fev	0,370	0,472	0,081	0,072	0,004	-	0,285	0,389	0,238	0,079	0,004	0,004	0,268	0,355	0,312	0,039	0,013	0,013
Mar	0,267	0,513	0,133	0,058	0,029	-	0,275	0,459	0,176	0,090	-	-	0,257	0,307	0,373	0,037	0,012	0,012
Abr	0,399	0,468	0,052	0,056	0,016	0,008	0,269	0,457	0,204	0,069	-	-	0,200	0,286	0,457	0,033	0,012	0,012
Mai	0,250	0,483	0,167	0,088	0,008	0,004	0,395	0,378	0,133	0,086	-	0,009	0,192	0,327	0,373	0,062	0,035	0,012
Jun	0,343	0,482	0,090	0,078	0,008	-	0,347	0,498	0,102	0,049	0,004	-	0,198	0,306	0,413	0,063	0,012	0,008
\bar{X}	0,326	0,484	0,105	0,070	0,013	0,006	0,298	0,437	0,187	0,074	0,004	0,006	0,247	0,319	0,348	0,054	0,019	0,012
DP	0,065	0,017	0,045	0,013	0,010	0,003	0,063	0,046	0,063	0,015	0,000	0,003	0,067	0,025	0,105	0,023	0,011	0,003
CV (%)	19,95	3,61	43,24	18,61	75,00	45,07	21,05	10,44	33,53	20,05	4,09	48,73	27,14	7,72	30,20	41,92	56,14	21,58

C = cocos CB = cocobacilos B = bacilos V = vibrios F = filamentos E = espirilos