

**RESPOSTAS RELACIONAIS ENTRE NITRATO, ORTOFOSFATO E  
BIOMASSA FITOPLANCTÔNICA DA LAGOA DE CIMA (RJ):  
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

**MARIANNA DE QUEIROZ LOURO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES  
FEVEREIRO - 2011**

**RESPOSTAS RELACIONAIS ENTRE NITRATO, ORTOFOSFATO E  
BIOMASSA FITOPLANCTÔNICA DA LAGOA DE CIMA (RJ):  
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

**MARIANNA DE QUEIROZ LOURO**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Pedrosa**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO DE 2011**

**RESPOSTAS RELACIONAIS ENTRE NITRATO, ORTOFOSFATO E  
BIOMASSA FITOPLANCTÔNICA DA LAGOA DE CIMA (RJ):  
UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Ecologia e Recursos Naturais

Aprovada em 11 de fevereiro de 2011.

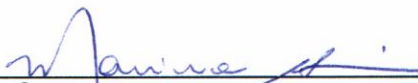
Comissão Examinadora:



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Ferragut - Instituto de Botânica do Jardim Botânico de São Paulo



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Silva Soares - UFJF



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Satika Suzuki - UENF



Prof. Dr. Paulo Pedrosa (orientador) - UENF

*Dedico este estudo aquele que foi muito importante em minha vida e formação: ao meu pai Paulo Louro.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao Deus Triúno por toda ajuda e consolo em todos os momentos da minha vida. Obrigada.

A minha mãe Isabel, meus irmãos Paulo e Paula, e toda a minha família por sempre me apoiarem e entenderem a minha dedicação aos estudos durante esta etapa da minha vida.

Ao prof. Paulo Pedrosa, que participou até o presente momento de toda a minha formação acadêmica. Se hoje eu estou indo um pouco adiante, em grande parte é fruto do seu trabalho. Muito obrigada por tudo.

As grandes amigas que fiz durante esta etapa e que levarei por toda a minha vida: Albany, Aline, Andréia, Bruna, Carol, Lili, Maria Angélica e Rita.

Aos meus irmãos de laboratório: Anna, Clara, Juliana e Thiago.

A turma “Canarinhos”.

As professoras Marina Suzuki e Sílvia Nascimento por participarem do Comitê de Acompanhamento. E a banca examinadora externa, Carla Ferragut e Maria Carolina Soares por terem aceitado o convite de participar da avaliação deste trabalho.

A todo corpo técnico do LCA.

A UENF e a CAPES pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Comunidade fitoplanctônica.....	1
1.2. N e P natural e antropogênico.....	2
1.2.1. N.....	2
1.2.2. P.....	5
1.3. Limitação nutricional ao fitoplâncton.....	6
1.4. Fitoplâncton da Lagoa de Cima.....	11
<b>2. Objetivo</b> .....	14
<b>3. Material e Métodos</b> .....	15
3.1. Área de estudo.....	15
3.2. Desenho experimental.....	17
3.3. Análises.....	21
3.3.1. Clorofila-a.....	21
3.3.2. Fósforo na fração particulada.....	21
3.3.3. Nitrogênio e fósforo na fração dissolvida.....	21
3.4. Tratamento dos dados.....	22
<b>4. Resultados</b> .....	23
4.1. Clorofila-a – período úmido.....	23
4.2. Clorofila-a – período seco.....	25
4.3. Nitrato – período úmido.....	27
4.4. Nitrato – período seco.....	28
4.5. Ortofosfato – período úmido.....	30
4.6. Ortofosfato – período seco.....	31
4.7. Fósforo particulado – período úmido .....	32
4.8. Fósforo particulado – período seco.....	33
4.9. Integração dos resultados.....	34
4.9.1. Clorofila-a.....	34
4.9.2. Nitrato.....	35
4.9.3. Ortofosfato.....	36
4.9.4. Razão P-particulado:clorofila-a.....	37
4.10. Parâmetros de crescimento populacional aplicado à comunidade fitoplanctônica.....	38
4.11. Diminuição de nitrato e ortofosfato por clorofila-a.....	40
<b>5. Discussão</b> .....	46
5.1. Delineamento experimental.....	46
5.2. Respostas do fitoplâncton as adições de nutrientes.....	47
5.3. Conexões com o sistema Lagoa de Cima.....	49
5.4. Razão ótima de diminuição N:P.....	54
<b>6. Conclusão</b> .....	57
<b>7. Referencias bibliográficas</b> .....	58
<b>8. Apêndice</b> .....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama do ciclo do nitrogênio.....	3
<b>Figura 2.</b> Diagrama do ciclo do fósforo.....	5
<b>Figura 3.</b> Localização geográfica da Lagoa de Cima, mostrando o local de amostragem (seta).....	16
<b>Figura 4.</b> Exemplo de bioensaio realizado mostrando o conjunto de frascos (n=18) dispostos em bancada de laboratório.....	18
<b>Figura 5:</b> Fluxo esquemático indicando os principais procedimentos realizados desde a chegada da amostra ao laboratório até o seu processamento final para análise de variáveis específicas.....	20
<b>Figura 6.</b> Concentrações de clorofila-a referentes aos bioensaios (n=6) do período úmido sob diferentes condições de enriquecimento nutricional. ....	23
<b>Figura 7.</b> Concentrações de clorofila-a referentes aos bioensaios (n=6) do período seco sob diferentes condições de enriquecimento nutricional. ....	27
<b>Figura 8.</b> Média e desvio padrão de nitrato para as dez condições experimentais referentes ao período úmido.....	28
<b>Figura 9.</b> Média e desvio padrão de nitrato para as dez condições experimentais referentes ao período seco.....	29
<b>Figura 10.</b> Média e desvio padrão de ortofosfato para as dez condições experimentais referentes ao período úmido.....	30
<b>Figura 11.</b> Média e desvio padrão de ortofosfato para as dez condições. Observa-se uma diminuição da concentração de P com a adição de N nas condições P10, N1P10 e N10P10.....	31
<b>Figura 12.</b> Média e desvio padrão da razão P-particulado/Chl-a para as dez condições experimentais referentes ao período úmido.....	32
<b>Figura 13.</b> Média e desvio padrão da razão P-particulado/Chl-a para as dez condições experimentais referentes ao período seco.....	33
<b>Figura 14.</b> Diminuição de nitrato/Chl-a, a linha tracejada é referente às condições com adição de 8 $\mu\text{M NO}_3^-$ (N1), adicionados individual e combinadamente as adições de fosfato de 0,5 (P1) e 5 (P10) $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ . A linha sólida é referente às condições com adições de 80 $\mu\text{M NO}_3^-$ (N10), individual e combinadamente com as adições de $\text{PO}_4^{3-}$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição Ct <sub>0</sub> ).....	41
<b>Figura 15.</b> Diminuição de fosfato/Chl-a, a linha sólida é referente às condições com adição de 5 $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ (P10) adicionados individual e combinadamente as adições de nitrato de 8 (N1) e 80	

(N10)  $\mu\text{M NO}_3^-$ . A linha tracejada é referente à condição com adições de  $0,5 \mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P1), individual e combinadamente com as adições de  $\text{NO}_3^-$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa ( $\text{Ct}_0$ )..... 41

**Figura 16.** Diminuição de nitrato/Chl-a, a linha sólida é referente às condições com adição de  $+5 \mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P10) adicionados individual e combinadamente com as adições de nitrato de 8 (N1) e 80 (N10)  $\mu\text{M NO}_3^-$ . A linha tracejada é referente às condições com adições de  $0,5 \mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P1), individual e combinadamente com as adições de  $\text{NO}_3^-$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição  $\text{Ct}_0$ )..... 42

**Figura 17.** Diminuição de fosfato/Chl-a, a linha tracejada é referente às condições com adição de  $8 \mu\text{M NO}_3^-$  (N1), adicionados individual e combinadamente com as adições de  $0,5$  e  $5 \mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P1 e P10). A linha sólida é referente às condições com adições de  $80 \mu\text{M NO}_3^-$  (N10) adicionado individual e combinadamente com as concentrações de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição  $\text{Ct}_0$ )..... 43

**Figura 18.** No eixo y-primário é representada a diminuição de nitrato+N-amoniaco por clorofila-a produzida, e no eixo y-secundário é apresentada a diminuição de ortofosfato por clorofila-a para as condições combinadas N1P1, N1P10, N10P1 e N10P10. Observa-se a partir do ponto de cruzamento entre as absorções dos nutrientes (setas) que a razão ótima de diminuição dos nutrientes para o crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima neste período de estudo é de 5,5:1, abaixo da razão de 16:1 prevista por Redfield (1958)..... 45



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição dos enriquecimentos nutricionais (N e P) utilizados nos bioensaios contendo 400 mL de amostra de água da Lagoa de Cima (RJ). .....	19
<b>Tabela 2.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de clorofila-a associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10, no período úmido.....	25
<b>Tabela 3.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de clorofila-a associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.....	27
<b>Tabela 4.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de nitrato associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período úmido.....	28
<b>Tabela 5.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de nitrato associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.....	29
<b>Tabela 6.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de ortofosfato associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período úmido.....	30
<b>Tabela 7.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de ortofosfato associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.....	31
<b>Tabela 8.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias da razão P-particulado/Chl-a associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período úmido.....	33
<b>Tabela 9.</b> Matriz dos valores de significância, $P < 0,05$ (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias da razão P-particulado/Chl-a associadas às condições experimentais $Ct_0$ $Ct_{10}$ N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.....	34
<b>Tabela 10.</b> Padrões observados nas concentrações de clorofila-a para ambos os períodos de estudo. ....	35
<b>Tabela 11.</b> Padrões observados nas concentrações de nitrato para ambos os períodos de estudo. ....	36
<b>Tabela 12.</b> Padrões observados para as concentrações de ortofosfato para ambos os períodos de estudo.....	37
<b>Tabela 13.</b> Padrões observados nas razões de P-particulado: Chl-a observadas para ambos os períodos de estudo.....	37

<b>Tabela 14:</b> Parâmetros de crescimento populacional, mas aplicados às comunidades fitoplanctônicas da Lagoa de Cima (RJ), submetidas à bioensaios tipo 'batch', período úmido.....	39
<b>Tabela 15:</b> Parâmetros de crescimento populacional, mas aplicados às comunidades fitoplanctônicas da Lagoa de Cima (RJ), submetidas à bioensaios tipo 'batch', período seco.....	39
<b>Tabela 16.</b> Variação das concentrações médias de clorofila-a das condições experimentais em relação ao $Ct_0$ , e o efeito sinérgico das adições combinadas em relação aos nutrientes nitrato e fosfato.....	48
<b>Tabela 17.</b> Classificação do Estado Trófico segundo Índice de Carlson (1977) modificado por Toledo (1990). Valores de $IET \leq 44$ caracterizam um estado oligotrófico; $44 < IET \leq 54$ estado mesotrófico; $54 < IET \leq 74$ estado eutrófico; e $IET > 74$ estado hipereutrófico.....	51

## RESUMO

Os organismos fitoplanctônicos são os principais responsáveis pela produção primária na Lagoa de Cima, e estes dependem de diferentes condições e recursos para sobreviverem. Estudos anteriores realizados neste ecossistema, não indicaram resultados inteiramente convergentes no que se refere a qual macronutriente, se N, P ou ambos, parece ser limitante ao crescimento fitoplanctônico. Dessa forma, este estudo buscou diagnosticar, através de um protocolo experimental repetitivo, usando bioensaios tipo 'batch' (sem renovação do meio hídrico), sinais de suficiência/deficiência nutricional por N e/ou P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Foram trabalhados enriquecimentos individualizados e combinados em concentrações finais de +0,5  $\mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  e +5  $\mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  e de +8  $\mu\text{M } \text{NO}_3^-$  e +80  $\mu\text{M } \text{NO}_3^-$ , respectivamente, codificados como P1 e P10 e N1 e N10. Os enriquecimentos combinados, N1P1, N1P10, N10P1 e N10P10, equivaleram, conforme o caso, proporções N:P iguais a 1,6:1, 16:1 e 160:1. Este estudo foi realizado durante o período úmido e seco de 2009. Os resultados obtidos mostraram limitação de nitrogênio no sistema, mas o aumento artificial da proporção N:P nas amostras de água parece ter induzido uma limitação por fósforo ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Assume-se que esses resultados contribuam ao manejo e à conservação do ecossistema Lagoa de Cima com vistas às possibilidades de eutrofização e oligotrofização e seus efeitos sobre a qualidade da água.

Palavras-chave: comunidade fitoplanctônica, limitação nutricional, nutrientes, nitrogênio, fósforo, eutrofização, bioensaios, Lagoa de Cima.

## ABSTRACT

The phytoplankters are primarily responsible for primary production in Lagoa de Cima. These organisms, as any other one, depend on different conditions and resources to survive. Previous studies in Lagoa de Cima, did not present fully convergent results with respect of which macronutrient, whether N, P or both, appears to be limiting of the phytoplankton growth. Regarding such inconsistency, this study sought through an experimental and repetitive protocol, using a bioassay (batch culture) approach, to find evidence of N and/or P sufficiency-deficiency of phytoplankton growth from Lagoa de Cima. Enrichment bioassays were worked at individual concentrations with +0,5  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  and +5  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  and of +8  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  and +80  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , respectively, named as P1, P10, N1 and N10, and also at combined enrichments as N1P1, N1P10, N10P1 and N10P10. From these combined enrichments, N:P proportions equaled to 1,6:1, 16:1 and 160:1. This study was carried out during the wet and dry period of 2009. The results showed limitation by nitrogen for the phytoplankton growth in the system, but the artificial increase in the proportion N:P in the water samples induced a limitation of phytoplankton growth by phosphorus in Lagoa de Cima phytoplankton. The importance of these results for the management and conservation of the ecosystem Lagoa de Cima in which concerns eutrophication and oligotrophication is pointed out.

Key-words: phytoplankton community, nutritional limitation, nutrient, nitrogen, phosphorus, eutrophication, bioassays, Lagoa de Cima.

## **1- Introdução**

### **1.1. Comunidade fitoplanctônica**

A comunidade fitoplanctônica é composta por microrganismos fotoautotróficos, solitários ou coloniais, que vivem em suspensão na coluna d' água (Reynolds, 1997). Segundo Falkowski & Raven (2006), o fitoplâncton é responsável por 60% da produção primária global. Com efeito, parte significativa dos ciclos biogeoquímicos é mediada por esse compartimento biológico. Nos ecossistemas aquáticos, uma complexidade de processos interativos, físicos, químicos e biológicos afetam a distribuição qualitativa e quantitativa desses organismos. Dessa forma, os regimes climáticos associados à radiação solar, temperatura, ventos, chuvas, e as interações consumidor-recurso, *bottom up* e *top down*, associadas, respectivamente, aos efeitos de aportes nutricionais e à predação herbivórica constituem os principais fatores responsáveis para se entender a ecologia do fitoplâncton. As estratégias adaptativas à vida em suspensão incluem, portanto, uma ampla gama de respostas morfológicas, biométricas, metabólicas e fisiológicas referentes a variações de tamanho (ex. picofitoplâncton, 0,2 -2  $\mu\text{m}$ , a microfitoplâncton, 20-200 $\mu\text{m}$ ), de área superficial/volume, de estruturas, como flagelos e vacúolos de gás, e a exigências e competências nutricionais (Reynolds, 2006).

Nesse contexto, muito frequentemente, a estrutura trófica de ecossistemas aquáticos está relacionada à estrutura e função das comunidades fitoplanctônicas (Bozelli & Huszar, 2003). As flutuações temporais e espaciais dessas comunidades são assumidas como eficientes indicadores de alterações naturais e antrópicas em ecossistemas aquáticos. A dinâmica de nutrientes, os processos de biomanipulação, os fluxos de energia entre diferentes níveis tróficos, e a capacidade de suporte de um sistema aquático são, dessa forma, muitas vezes relacionados às comunidades fitoplanctônicas (Bozelli & Huszar, 2003).

No que se refere à dinâmica de nutrientes, o fitoplâncton, assim como os organismos em geral, integra constitutiva e funcionalmente diversos elementos químicos, sendo alguns destes requeridos em maior quantidade, chamados de macronutrientes como, por exemplo: carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O),

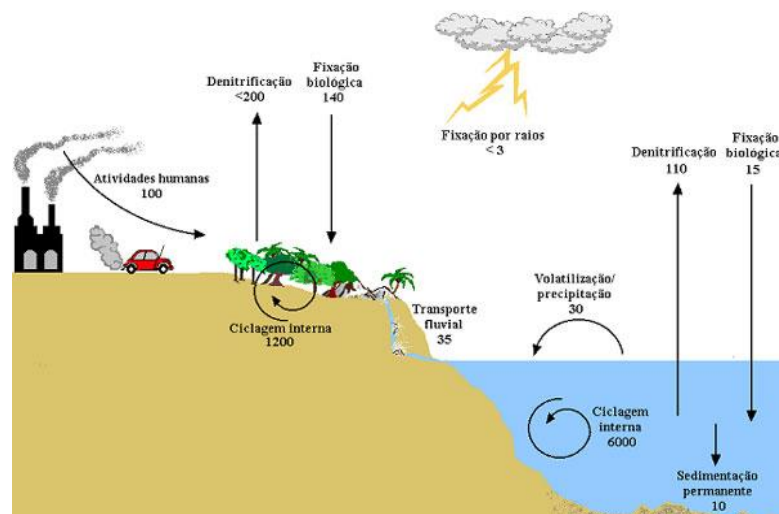
nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P). Essa ordem biológica frequentemente repercute em desdobramentos ecológicos e ambientais. Dentre os macronutrientes, o N e o P têm sido reconhecidos como elementos chaves à ecologia de ecossistemas aquáticos por afetarem significativamente a produção primária (Hecky & Kilham, 1988). As respostas de crescimento fitoplanctônico dependem, no entanto, não somente da disponibilidade destes nutrientes no meio, mas também da proporção entre estes (Redfield, 1958). Considerando que a emergência das comunidades fitoplanctônicas em ecossistemas aquáticos está relacionada, pelo menos em parte, à condição nutricional nesses ambientes, conhecer os efeitos individualizados e combinados da adição de nutrientes nitrogenados e fosfatados sob o crescimento fitoplanctônico representa uma informação relacional, básica, aplicada à compreensão da estrutura e da função de um ecossistema aquático baseado em produção autóctone, fitoplanctônica.

## **1.2. N e P natural e antropogênico**

### **1.2.1. N**

O nitrogênio — parte integrante e indispensável de todas as enzimas, proteínas e ácidos nucléicos nos organismos biológicos (Campbell, 1990) — é o elemento químico mais abundante na atmosfera, constituindo cerca de 80% do ar atmosférico na forma de  $N_2$ . Embora presente em grande quantidade no ar, poucos seres vivos o assimilam nessa forma, estando indisponível para a grande maioria dos organismos presentes na biosfera (Galloway *et al.*, 2010). Apenas alguns tipos de microrganismos como algumas bactérias e cianobactérias, conseguem assimilar o  $N_2$  atmosférico, o qual é transformado em amônia, amônio, nitrato ou em outros componentes (Figura 1) (Scott *et al.*, 2008). Este processo é conhecido como fixação biológica de N, constituindo a principal fonte natural de N biodisponível para os produtores primários. Uma menor parte do  $N_2$  oxidado naturalmente, cerca de ~ 5-10%, é também produzido por descargas elétricas através de relâmpagos atmosféricos (Ridley *et al.*, 1996).

Um processo inverso à fixação de N, conhecido como denitrificação, consiste na conversão do nitrato a  $N_2O$  e  $N_2$  e sua consequente liberação para atmosfera. Este processo, favorecido em ecossistemas aquáticos ricos em matéria orgânica e pobres em oxigênio molecular, pode ser um importante regulador da produção primária (McArthur, 2006).



**Figura 1.** Diagrama do ciclo do nitrogênio. Fonte: <http://www.zoonews.com.br/noticiax>.

Em ecossistemas aquáticos o nitrogênio pode ocorrer em diversas formas, como por exemplo, nitrogênio molecular, nitrato, nitrito, amônia, óxido nitroso, nitrogênio orgânico dissolvido (por exemplo, peptídeos e aminoácidos), e orgânico particulado (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton e detritos). As principais fontes de N para os organismos fitoplanctônicos são o nitrato e a amônia, pois são abundantes e preferencialmente absorvidos pelas células, devido à rapidez de reações associadas ao baixo consumo de energia (Reynolds, 1997). Somente quando a concentração das formas inorgânicas de N atinge valores muito baixos ou até mesmo é esgotada, é que as formas orgânicas são aproveitadas pelo fitoplâncton (Esteves, 1998).

Espécies reativas de N oxidado e reduzido são mobilizados e transportados através da atmosfera terrestre e depositados em habitats aquáticos e terrestres através de deposições úmidas e secas. A conjunção de processos físicos e metabólicos afeta, então, a distribuição do nitrogênio nos ecossistemas em geral. Segundo Bergström & Jansson (2006), a limitação do fitoplâncton por N pode ser encontrada em regiões com baixas taxas de deposição de N ( $< 250 \text{ kg N km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ ), enquanto taxas mais altas causam aumento nas concentrações de N inorgânico ( $\geq 500 \text{ kg N km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$ ).

Vale ressaltar, no entanto, que o ciclo biogeoquímico do N, assim com os ciclos biogeoquímicos em geral, está sendo alterado pelo crescimento da população humana e industrialização (Vitousek *et al.*, 1997; Galloway & Cowling, 2002). Segundo Falkowski *et al.* (2000), a circulação de N na biosfera aumentou mais de 100% após a Revolução Industrial. Este processo é resultado da produção artificial de nutrientes nitrogenados e liberação de subprodutos de combustíveis fósseis – os quais provocam uma emissão adicional de mais de 20 milhões de toneladas de N para a atmosfera (Vitousek *et al.*, 1997) –, além das emissões agrícolas, pastagens e industriais (Galloway *et al.*, 2004). Segundo Howarth *et al.* (1996), as atividades agrícolas constituem as principais fontes de nutrientes para os ecossistemas aquáticos.

Alguns dos principais processos de alterações antropogênicas no ciclo do N em ecossistemas aquáticos são: (1) a aplicação de fertilizantes nitrogenados na agricultura, a qual provoca aumento nas taxas de desnitrificação e lixiviação de N para águas subterrâneas, e que eventualmente flui para córregos, rios, lagos e estuários (Vitousek *et al.*, 1997, Galloway, 1998); (2) o aumento da deposição atmosférica de N devido à queima de combustíveis fósseis e queimadas em florestas (Galloway *et al.*, 2004); (3) a pecuária – devido à liberação de N-amoniaco pelo gado no meio de seus resíduos (Scholefield *et al.*, 1991), os quais penetram o solo e também entram no sistema hidrológico através da lixiviação e escoamento para os corpos d'água; e finalmente (4) as águas residuais e lixiviação dos tanques sépticos (Harrison *et al.*, 1999) para os corpos d'água.

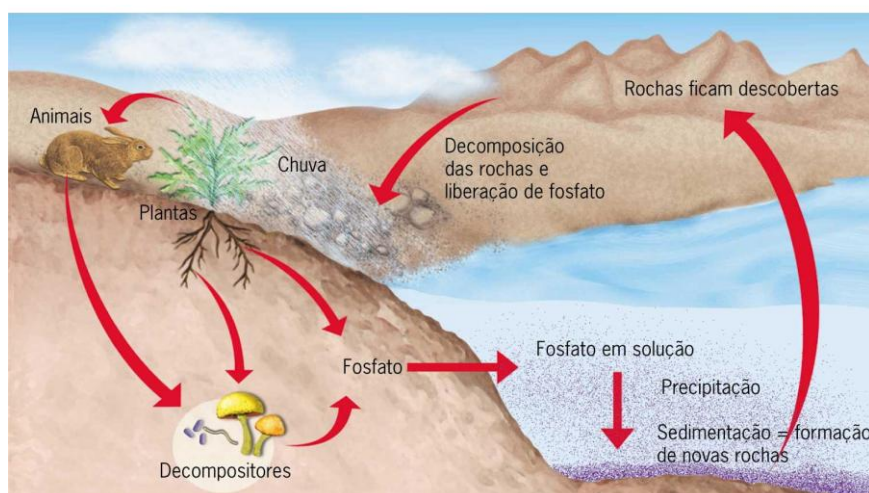
Como efeitos da excessiva deposição atmosférica de N aos organismos fitoplanctônicos destacam-se: (1) o aumento da razão N:P, e favorecimento de espécies com habilidades competitivas mais fortes por P o que pode causar diminuição da diversidade fitoplanctônica (Lagus *et al.*, 2007); (2), devido as algas limitadas por P serem conhecidas por possuírem qualidade nutricional inferior, possíveis alterações no funcionamento da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos também podem ocorrer (Sterner & Elser, 2002; Elser *et al.*, 2009).



### 1.2.2. P

Além do N, o P é um nutriente essencial, dinâmico, biologicamente ativo, constituinte da molécula de DNA, de moléculas que armazenam energia (ATP e ADP) e de lipídios das membranas celulares, sendo parte integrante do metabolismo de todas as formas de vida (Correll, 1998).

Os grandes reservatórios de P são as rochas e outros depósitos formados durante as eras geológicas, e que por meio do intemperismo – principal meio de disponibilização do P – é liberado para os ecossistemas, na forma de minerais de fosfato de cálcio. O P pode ser encontrado na água, no solo e em sedimentos, mas não é encontrado na forma gasosa. Entretanto, na atmosfera pode ser encontrado principalmente como partículas de poeira (Figura 2) (Tiessen, 2008).



**Figura 2.** Diagrama do ciclo do fósforo. Fonte: [http://www.profpc.com.br/ciclo\\_fosforo.htm](http://www.profpc.com.br/ciclo_fosforo.htm)

As formas de fósforo presentes em ecossistemas aquáticos de águas doces são: fósforo particulado, fósforo orgânico e o inorgânico dissolvido. Destas, a principal utilizada pelos organismos fitoplanctônicos é a inorgânica dissolvida, na forma de ortofosfato (Esteves, 1998).

Como para o N, a intensificação de atividades humanas tem refletido em um aumento de 400% no ciclo biogeoquímico do P após a Revolução Industrial (Falkowski *et al.*, 2000). Frequentemente o aumento do fluxo de transporte desse nutriente ocorre principalmente por meio de fertilizantes, e de resíduos animais e residenciais (Filippelli, 2008).

O P move-se lentamente a partir de depósitos em solos e sedimentos para os organismos vivos e vice versa. Por ter a capacidade de formar compostos solúveis, o P é facilmente carregado pela chuva para lagos e rios, onde, em excesso, pode causar a eutrofização (Carpenter, 2008; Schindler *et al.*, 2008).

O aporte de macronutrientes nitrogenados e fosfatados e o consequente aumento da biomassa de produtores primários nos sistemas aquáticos definem o processo ambiental conhecido como eutrofização (Esteves, 1998). O aumento de nutrientes em corpos d'água pode ser acelerado por atividades humanas por meio de perturbações de origens externas, como desmatamento, assoreamentos, esgotos, resíduos industriais e agropecuários.

Este aumento da concentração de nutrientes nos corpos d'água pode causar: (1) a simplificação da estrutura trófica e diminuição da diversidade específica (Rabalais, 2002); (2) florações de algas que podem aumentar a turbidez da água, diminuindo a penetração da luz nos corpos d'água (Wetzel, 2001), além do aumento da matéria orgânica morta, diminuindo ou esgotando o O<sub>2</sub> dissolvido, devido à intensificação da respiração aeróbia sobre tais substratos; (3) e consequente anoxia nas partes mais profundas dos lagos alterando todo o metabolismo pelágico-bentônico do ecossistema aquático (Rabalais *et al.*, 1999).

### **1.3. Limitação nutricional ao fitoplâncton**

Os fatores químicos (nutrientes), físicos (luz e temperatura), e biológicos (biomassa fitoplanctônica, composição de espécies e herbivoria) podem afetar os processos de sucessão e composição das comunidades fitoplanctônicas (Phlips *et al.*, 2002, Cermeno *et al.*, 2006).

Dentre estes fatores, a disponibilidade de nutrientes ocupa um importante papel no controle dessas comunidades. Os nutrientes podem ser removidos da coluna d'água por meio da assimilação dos organismos e sedimentação, e também por processos biogeoquímicos como denitrificação, fixação de N e adsorção de P. A limitação por nutrientes ocorre quando um ou mais nutrientes estiver em uma concentração que restrinja o crescimento das algas e o aumento de biomassa (Reynolds, 2006).

Um pressuposto da ciência aquática é que o fitoplâncton marinho tenderia a ser limitado por N, enquanto o de água doce tenderia a ser limitado por P (Hecky & Kilham, 1988; Philips, 2002). Entretanto, em alguns ambientes de água doce, principalmente em trópicos e subtropicais, a limitação por N tem sido indicada como equivalente (Elser *et al.*, 1990; Francoeur, 2001; Elser *et al.*, 2007) ou até mesmo como o principal fator na limitação das comunidades fitoplanctônicas (Lewis & Wurtsbaugh, 2008) em relação ao P. Isto pode estar acontecendo devido em grande parte ao excesso da entrada de P nestes ambientes, originando um novo paradigma para limitação de N e P em ecossistemas aquáticos (Lewis & Wurtsbaugh, 2008).

De acordo com Hecky & Kilham (1988), Devol (2003), Trimmer & Nicholls (2009), nenhum processo biogeoquímico que possa limitar a disponibilidade de N ou P para os organismos fitoplanctônicos é exclusivo para cada ambiente. Pelo contrário, as explicações tendem a enfatizar as diferenças de escala entre os ecossistemas marinhos e de águas água doce, como por exemplo, a fixação de N que é mais lenta no oceano, ou a desnitrificação que é mais rápida em ambientes de água doce. Portanto, segundo Karlsson *et al.* (2009) a limitação da produtividade por nutrientes tem sido um elemento fundamental para a compreensão dos ecossistemas aquáticos, sendo de considerável importância para o entendimento da sua ecologia e para práticas de manejo.

De um modo geral, os vários parâmetros métricos correntemente utilizados para se identificar a limitação de crescimento fitoplanctônico por nutrientes podem ser resumidos como se seguem:

1. A relação entre as concentrações absolutas nos sistemas e os níveis de requerimento das algas, expressos através das constantes de semi-saturação para o crescimento ( $K_s$ ; Reynolds, 1997),

2. Balanço de nutrientes e correlações com sua disponibilidade, e entre estes e a biomassa em grandes escalas temporais e espaciais (Wollenweider & Kerekes, 1980),

3. Utilização de indicadores químicos e fisiológicos (Goldman *et al.*, 1979). Em geral diversos grupos de algas têm respostas e composição similar para limitação de nutrientes, sendo assim, usados como indicadores para este tipo de identificação (Hecky & Kilham, 1988),

4. Estudos com experimentos de adição de nutrientes em bioensaios (Elser *et al.*, 1990); onde um ou mais nutrientes são adicionados em um volume pré-determinado de água, havendo um acompanhamento do crescimento da espécie teste, ou das populações naturais após o enriquecimento nutricional (Hecky & Kilham, 1988),

6. Proporções entre nutrientes tendo como base às razões atômicas, molar, de Redfield (1963) na fração particulada associada ao plâncton marinho (C:N:Si:P = 106:16:16:1, Dortch & Whiteledge, 1992).

Este estudo trabalha especificamente com bioensaios e analisa as concentrações e proporções de nitrogênio e fósforo disponibilizados e assimilados no meio aquoso e na biomassa fitoplanctônica, considerando as respostas de crescimento deste compartimento biológico.

O uso de enriquecimento nutricional em bioensaios aquáticos é utilizado há vários anos (Hecky & Kilham, 1988). De acordo com Wetzel (1965), os primeiros registros datam de 1927 em ecossistemas marinhos e em 1933 em ecossistemas de água doce empregados, respectivamente, por Schreiber e Strom. Os trabalhos realizados abrangem desde sistemas unialgais, a adições de nutrientes realizadas no próprio ecossistema aquático, também referidos como mesocosmos e limnocurrais (Hecky & Kilham, 1988).

Este tipo de abordagem experimental é relativamente simples de se trabalhar e não são custosas (Beardall *et al.*, 2001). Após a adição do(s) nutriente(s) previamente estabelecido(s), se houver um estímulo a produção e/ou crescimento, é um indicativo de que o nutriente está sendo limitante ao crescimento fitoplanctônico.

De um modo geral, os bioensaios têm sido utilizados em estudos relacionados com eutrofização, efeitos de despejos de substâncias tóxicas orgânicas ou inorgânicas em ecossistemas aquáticos, entre outros, sendo uma metodologia sensível e que apresenta resultados rápidos. Vale mencionar, que a utilização de bioensaios não está livre de imprecisões, como por exemplo, a indução de limitação por um nutriente, devido à adição de outro nutriente (Beardall *et al.*, 2001), devendo haver cautela na interpretação dos resultados.

Outra ferramenta utilizada para estudos que abordam limitação nutricional é a composição elementar do fitoplâncton (Hillebrand & Sommer,

1997). Os organismos fitoplanctônicos requerem nutrientes em uma proporção relativamente fixa para reproduzir-se, existindo desta forma, um requerimento estequiométrico para as algas.

Pode-se dizer que esta discussão teve início com o trabalho de Redfield (1958). Este autor observou uma razão média atômica para o material particulado marinho relativamente uniforme de  $C_{106}: N_{16}: P_1$ , tornando-se essa razão a partir de então conhecida como a razão de Redfield.

A razão de Redfield para plâncton marinho tem sido comumente utilizada ainda hoje em estudos que visam avaliar a suficiência-deficiência nutricional dos organismos fitoplanctônicos. Além disso, recentes trabalhos incluem a razão C:N:P de Redfield alguns elementos traços (Sterner & Elser, 2002). Desvios na razão de Redfield têm sido interpretados como uma indicação de qual nutriente é limitante, especialmente quando as concentrações de nutrientes são baixas e moderadas. Quando um sistema possui sua razão N:P alta, ou seja  $\geq 16:1$ , assume-se que esse sistema seja limitado por P, entretanto, quando o inverso ocorre, baixa razão N:P, assume-se que a limitação é por N (Bothwell, 1985; Stelzer & Lamberti, 2001; Vidal *et al.*, 2003).

Desta forma, a quantidade relativa, ou seja, a razão N:P, possui um importante impacto na composição de espécies de algas, na produtividade, na limitação por nutrientes, e também sobre o estado trófico (Elser & Urabe, 1999; Arbuckle & Downing, 2001; Sterner e Elser, 2002). Por conseguinte, é importante estudar o papel estequiométrico da relação N:P sobre essas comunidades. Do mesmo modo, uma combinação de fatores ambientais sejam eles bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos moldam a estequiometria elementar dos organismos (Sterner & Elser, 2002) podendo causar efeitos na estrutura taxonômica e influenciar os níveis tróficos superiores.

As espécies individuais raramente apresentam a razão de Redfield, e sua composição elementar tem sido apresentada por variar amplamente a partir de mudanças nas concentrações e na biodisponibilidade de N e P (Hecky & Kilham, 1988). As espécies que são mais adaptadas as novas condições de nutrientes se tornarão mais importantes na comunidade fitoplanctônica. Neste caso, por exemplo, um sistema antes limitado por P, que passa a ser limitado

por N, pode resultar em uma mudança de diatomáceas para cianobactérias fixadoras de N alterando a razão C:N:P na matéria particulada (Xu *et al.*, 2010).

Segundo Sterner *et al.* (2008) a razão de Redfield de  $C_{106}:N_{16}:P_1$  permanece um paradigma, pois esta razão é frequentemente utilizada apesar de algumas discordâncias em relação a ela. Segundo Xu *et al.* (2010), a razão de Redfield negligencia o fato que as concentrações dos nutrientes tem influência no crescimento fitoplanctônico. Desta forma, a razão poderia não suportar alta biomassa fitoplanctônica se as concentrações dos nutrientes forem muito baixas. Neste sentido, alguns estudos foram realizados com o intuito de testar a razão proposta por Redfield, como os realizados por Hecky *et al.* (1993), Elser & Hassett (1994), Falkowski (2000) e Elser *et al.* (2008).

A razão de Redfield foi sugerida a partir de dados do material particulado presente em ecossistemas marinhos. Em ecossistemas aquáticos de água doce, a estequiometria é uma questão menos abordada, sendo utilizada uma razão C:N:P próxima aos de ambiente marinho (Sommer, 1990). Segundo Kilham (1990) a estequiometria deve ser levada em consideração em estudos limnológicos, por poder determinar a composição de espécies e a taxa de crescimento das comunidades fitoplanctônicas.

Ao contrário do observado para oceanos, os ecossistemas aquáticos de águas doces são conhecidos por possuir geralmente valores médios mais altos de C:P e C:N, bem como maior variabilidade espacial e temporal (Hecky *et al.*, 1993; Sterner *et al.* 2008). Esses contrastes entre as razões do material particulado marinho e de água doce têm sido relacionados a padrões de limitação de nutrientes naqueles ecossistemas (Howarth *et al.*, 1988). Modelos para explicar esta variabilidade dentro de ecossistemas de água doce têm sido testados (Sterner *et al.*, 2008).

Segundo Hecky *et al.* (1993), uma explicação para o menor número de estudos abordando a razão C:N:P em lagos comparado a ambientes marinhos, ocorre devido a dificuldade de acessar a contribuição terrestre para a matéria particulada nos lagos, pois os detritos terrestres quando passam a compor a matéria particulada podem alterar a razão C:N:P. Além da contribuição terrestre para a matéria orgânica, pode-se destacar também os fatores fisiológicos e as características individuais de cada lago que são mais variáveis. Estes autores, em um estudo realizado em 51 lagos, abrangendo desde regiões árticas até

regiões tropicais, observaram que a razão de Redfield de  $C_{106}:N_{16}:P_1$  foi geralmente uma exceção em lagos, apresentando razão C:N:P médias mais altas que a razão proposta por Redfield. Além deste estudo anteriormente mencionado, Elser & Hassett (1994) encontraram semelhante resultado, corroborando essa diferença entre os sistemas marinhos e de água doce.

Mais recentemente, Sterner *et al.* (2008) realizaram um estudo visando examinar os dados e a consistência da razão C:N:P de Redfield em sistemas de água doce e salgada, observaram que a média da razão em ambos os sistemas afastavam-se da proporção clássica de 106:16:1. Eles encontraram que a razão do material particulado foi mais próxima, mas ainda assim diferente, no oceano do que em lagos. Entretanto, estes autores afirmam que, embora estudos anteriores enfatizem contrastes entre as razão C:N:P entre as águas marinhas e de água doce, a partir dos resultados por eles obtidos, foi sugerido haver também uma similaridade entre os ecossistemas de água doce e marinha. Desta forma, eles concluem que em uma grande escala espaço-temporal, em um ecossistema aquático, marinho ou de água doce, rico em C e pobre em N e P a clássica razão de Redfield é apropriada.

#### **1.4. Fitoplâncton da Lagoa de Cima**

Os estudos sobre o fitoplâncton da Lagoa de Cima tiveram início na década de 70 (PRO\_AGRO, 1975). Na década de 80 os trabalhos consistiram em levantamentos pontuais a partir de amostras coletadas com rede (Huszar *et al.*, 1987; Huszar & Esteves, 1988) e garrafa de Van Dorn (Huszar & Silva, 1992). Já na década de 90, Pedrosa *et al.* (1999); reportaram pela primeira vez não só a presença, mas também a dominância de *Cylindrospermopsis raciborskii* — uma cianobactéria fixadora de nitrogênio — na Lagoa de Cima, sugerindo um processo de eutrofização no sistema, mas com relativa limitação por nitrogênio. Baseando-se nos valores de N-total:P-total, Pedrosa (1999), entretanto, também sugeriu haver limitação por fósforo ao fitoplâncton da Lagoa de Cima.

Mais recentemente, um estudo realizado por César (2006) indicou uma diminuição de biomassa fitoplanctônica e da participação de *Cylindrospermopsis raciborskii*, quando comparado ao estudo de Pedrosa (1999). No mesmo

sentido, César (2006) sugeriu haver uma limitação de nitrogênio ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima em função de três metodologias independentes: (1) uso de razões C:N no MPS em associação à indexação de deficiência nutricional ao fitoplâncton proposta por Healey & Hendzel (1980), (2) verificação de correlações relativamente mais fortes entre N-total e clorofila do que entre P-total e clorofila e (3) relacionamento entre as concentrações de fosfato e nitrogênio inorgânico dissolvidos nas águas do rio Imbé e Lagoa de Cima e às constantes de semi-saturação ( $K_s$ ) (Reynolds, 1997) para estes nutrientes. Entretanto, César no mesmo estudo, a partir das razões N:P no MPS, encontrou indícios de deficiência por fósforo ao fitoplâncton da Lagoa de Cima, com razões N:P >22 indicando severa limitação por fósforo, como sugerido por Healey & Hendzel (1980).

Siqueira (2006) verificou aumentos concomitantes nas concentrações de fósforo total e clorofila nos sedimentos recentemente depositados na Lagoa de Cima em relação às deposições mais antigas (profundas), sugerindo uma eutrofização por fósforo. Como um todo, esses estudos sugerem certa complexidade acerca do tema suficiência-deficiência nutricional ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.

Com mencionado anteriormente, além dos fatores químicos, os fatores físicos e biológicos são importantes na seleção de espécies e na dinâmica da comunidade fitoplanctônica. Dentre estes, a precipitação pluviométrica é um dos principais fatores direcionadores da dinâmica de ecossistemas aquáticos, e que atua também sobre a dinâmica do fitoplâncton (Arcifa *et al.*, 1995). César (2006) constatou que na Lagoa de Cima, a variabilidade física, química e biológica estava intimamente associada aos fatores climáticos, especialmente a precipitação. A mesma autora observou mudança na composição e densidade de espécies da comunidade fitoplanctônica entre o período seco e chuvoso estudados. Neste sentido, a região central da lagoa esteve dominada por desmídias no período seco, enquanto que no período chuvoso foi observada uma contribuição mais homogênea de vários grupos de algas (desmídias, clorófitas e cianobactérias). Além disso, ela destaca que o efeito de diluição decorrente do aumento de precipitação no período chuvoso pôde ser confirmado pela diminuição das concentrações de nutrientes, C, N e P particulados e também na densidade fitoplanctônica neste período.



Considerando as pesquisas realizadas e as indefinições e incertezas apresentadas até o momento acerca da limitação nutricional por nitrogênio e/ou fósforo ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima, pretendeu-se neste estudo investigar as relações funcionais entre nitrato, ortofosfato e o fitoplâncton da LC, metodologicamente, através do uso de bioensaios *in vitro*.

## **2. Objetivo**

Este estudo tem por objetivo avaliar via bioensaios tipo 'batch culture', o(s) elemento(s) limitante(s) — N e/ou P — ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima, a partir da resposta da biomassa fitoplanctônica ao enriquecimento isolado e combinado de nitrogênio e fósforo em diferentes concentrações e proporções.

### **3. Material e métodos**

#### **3. 1. Área de estudo**

A Lagoa de Cima (LC, 21°46'28"S – 41°30'16"W) (Figura 3), situa-se no município de Campos dos Goytacazes, região norte do Estado do Rio de Janeiro. A lagoa possui uma área aproximada de 13 km<sup>2</sup>, largura máxima de 4 km e comprimento máximo de 7,5 km, sendo abastecida pela confluência dos rios Imbé e Urubu que juntos drenam uma área de 986 km<sup>2</sup>. A profundidade máxima é estimada em 2,5 e 5,0 metros (Pedrosa, 1999) e com tempo de residência variando entre 19 e 33 dias (Rezende *et al.*, 2006). As águas são drenadas pelo rio Ururaí, até chegar e desaguar na lagoa Feia (SEMADS, 2002).

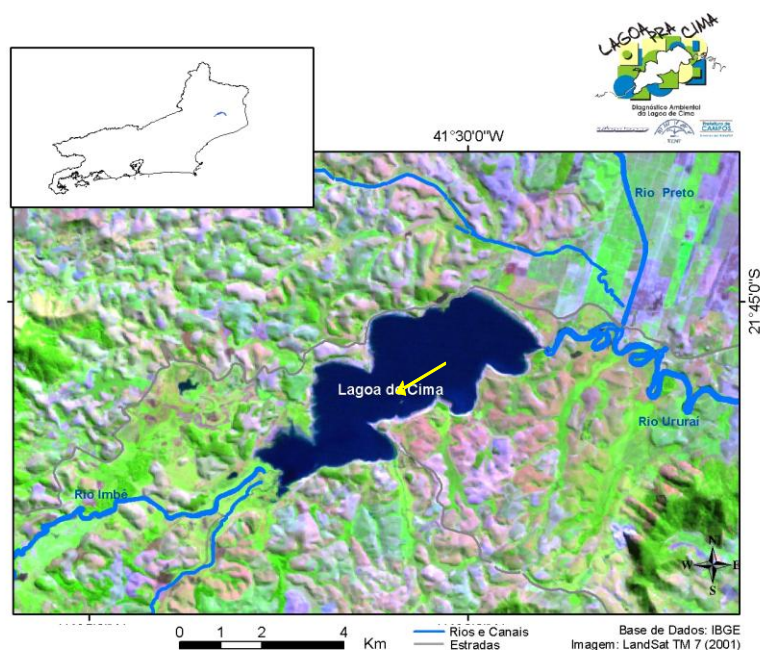
De acordo com Rezende *et al.* (2006), a Bacia de drenagem do Rio Imbé e Lagoa de Cima totalizam 1.270 km<sup>2</sup> e grande parte de sua extensão está dentro do Parque Estadual do Desengano, tendo sido elevada a Área de Proteção Ambiental (APA) a partir da promulgação da Lei Municipal n° 5.394 de 24 de dezembro de 1992.

O clima da região é tropical quente e úmido, com um inverno pouco seco e verão úmido, e a vertente Atlântica apresenta pouco ou nenhum déficit hídrico. A precipitação média anual oscila em torno de 1400 mm e a temperatura média, em torno de >19°C (Moreno *et al.*, 2003), apresentando uma estação seca de junho a agosto.

A LC é um sistema túrbido, de águas doces, com condutividade elétrica entre ~ 30-50 µS cm<sup>-1</sup>, com produção primária baseada no fitoplâncton e abriga grande diversidade de animais e plantas aquáticas. Bancos de macrófitas aquáticas são mais claramente observáveis na desembocadura dos rios Imbé e Urubu, e em regiões rasas e marginais no entorno da lagoa. Nessa região há, provavelmente, uma grande descarga de nutrientes (C, N e P) devido à exploração agro-pastoril e de pequenos povoados ao redor. Desta forma as macrófitas aquáticas são de fundamental importância, pois funcionam como barreira à entrada de nutrientes e material particulado do rio Imbé, (Rezende *et al.*, 2006). Plantas como salvinias e aguapés são comuns sendo encontradas ainda ciperáceas e gramíneas. Há aproximadamente 42 espécies de peixes na lagoa (SEMADS, 2002).

Desde o século XIX áreas da Mata Atlântica, principalmente na região da Serra do Mar (Imbé), já tinham sido substituídas por pecuária, plantações de café, cana-de-açúcar, havendo também extração de madeira e palmito. Devido a essas atividades, e a ocupação desordenada da área, o aumento de pessoas na região, e também do turismo, houve a redução da área de cobertura vegetal original da região da LC para 6% de sua extensão original. Recentemente houve diminuição nas taxas de desmatamento devido à mudanças na legislação ambiental, diminuição do incentivo na plantação de cana-de-açúcar e o esgotamento de áreas adequadas para o plantio e pecuária (Rezende *et al.*, 2006).

A LC possui importância para a população local como fonte de renda, por exemplo, com a pesca, sendo também muito requisitada devido a seus atrativos turísticos, possuindo uma bela paisagem rodeada por montanhas. Suas margens são ocupadas por áreas de pasto, canaviais, algumas propriedades e fragmentos de mata. Ela apresenta também importância dimensional, pois está entre os maiores sistemas lênticos naturais de água doce do Estado do Rio de Janeiro.



**Figura 3.** Localização geográfica da Lagoa de Cima, mostrando o local de amostragem (seta).

### **3.2. Desenho experimental**

Um total de doze bioensaios foi realizado. Seis foram realizados em um período relativamente úmido, entre os meses de março e maio de 2009, com média mensal de precipitação pluviométrica de 92 mm. Outros seis bioensaios foram realizados durante um período relativamente seco, entre julho e setembro de 2009, com precipitação pluviométrica média de 27 mm ( $P < 0,05$ ) (UFRRJ). A realização dos bioensaios em dois períodos climatológicos distintos foi em função da sazonalidade climática observada na região. Estudos anteriores na Lagoa de Cima (Pedrosa, 1999; César, 2006) mostraram que a variação na precipitação é um dos principais fatores reguladores da comunidade fitoplanctônica, e que atua também sobre a disponibilidade dos nutrientes no corpo d'água.

A cada 10-15 dias, amostras de água foram coletadas na parte central, mais profunda, da Lagoa de Cima. As amostras (cerca de dez litros em cada coleta) foram obtidas em profundidade subsuperficial (zero a cerca de 20 cm), utilizando-se frascos de polietileno (ca. 2 L), os quais foram transferidos para uma bolsa térmica até a chegada ao laboratório. No laboratório, no mesmo dia de cada coleta, as amostras foram integradas e homogeneizadas em um recipiente plástico. Uma parte foi imediatamente filtrada para análise da água, com o intuito de obter um registro das condições iniciais do meio hídrico para a consecução de cada experimento. A outra parte foi alíquotada em volumes fixos de 400 mL em frascos de vidro (Ca. 1 L) dispostos aleatoriamente em uma bancada de laboratório, os quais ficaram expostos à luz natural indireta e ambiente climatizado. Os frascos foram continuamente aerados por regime de compressão. Cada experimento foi composto por duplicatas considerando-se oito condições de enriquecimento nutricional, além dos dois controles, referentes a água da Lagoa de Cima sem enriquecimento, codificados como  $Ct_0$  e  $Ct_{10}$ . Considerando os doze bioensaios realizados, para cada condição experimental foi obtido um total de vinte e quatro repetições. A disposição dos frascos nos bioensaios pode ser observada na Figura 4.

Sequencialmente, os nutrientes N e P, respectivamente, na forma de nitrato e fosfato, foram adicionados às amostras de acordo com o desenho experimental previamente estabelecido. A partir dos reagentes fosfato de

potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) Merck PA, soluções estoques foram preparadas e, adicionadas isoladamente gerando concentrações finais de fósforo, codificadas como P1 ( $=0,5 \mu\text{M}$ ) e P10 ( $= 5 \mu\text{M}$ ) e de nitrogênio, codificadas como N1 ( $= 8 \mu\text{M}$ ) e N10 ( $= 80 \mu\text{M}$ ), e em combinações específicas, N1P1, N1P10, N10P1, N10P10, seguindo proporções N:P molar iguais a 16:1, 1,6:1, 160:1 e 16:1, respectivamente (Tabela 1). Os valores adicionados foram compatíveis com concentrações reportadas para águas naturais (Meybeck, 1993), especificamente por concentrações observadas no Rio Imbé o qual abastece a Lagoa de Cima como observados por Pedrosa (1999) e César (2003).



**Figura 4.** Exemplo de bioensaio realizado mostrando o conjunto de frascos ( $n=18$ ) dispostos em bancada de laboratório.

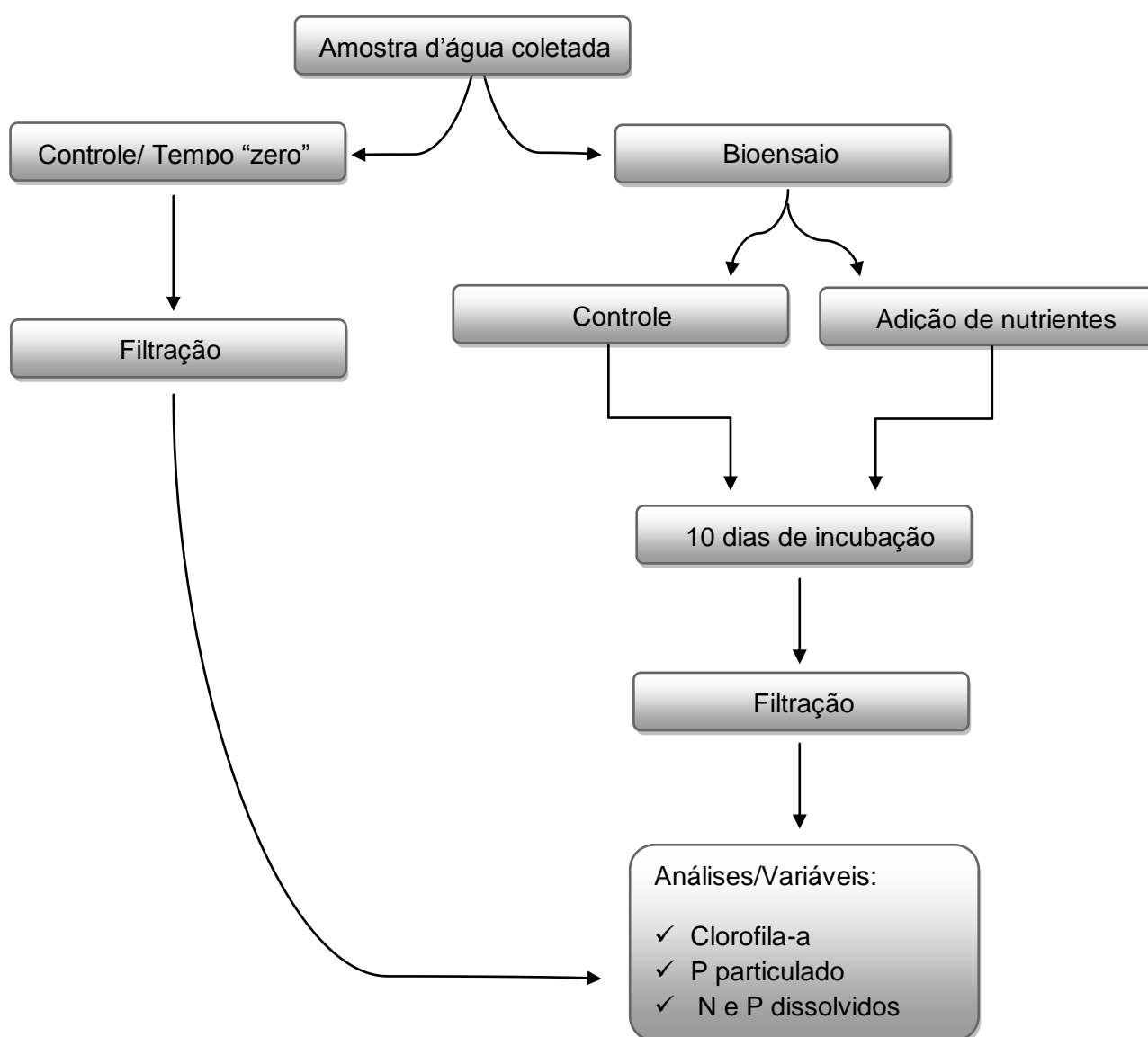
**Tabela 1:** Composição dos enriquecimentos nutricionais (N e P) utilizados nos bioensaios contendo 400 mL de amostra de água da Lagoa de Cima (RJ).

Reagente	Soluções estoques (SE) (mM)	Adição (SE) ( $\mu$ L)	Enriquecimentos finais ( $\mu$ M)	Razão Molar N:P adicionada	Razão Média N:P Integrada* - Período úmido	Razão Média N:P Integrada* - Período seco	Código	n	n total
nenhum	-----	-----	-----	-----	-----	85	Controles (Ct <sub>0</sub> e Ct <sub>10</sub> )	2	24
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	-----	-----	12	P1	2	24
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	-----	-----	1	P10	2	24
NaNO <sub>3</sub>	8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	400	+ 8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	-----	-----	185	N1	2	24
NaNO <sub>3</sub>	80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	400	+ 80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	-----	-----	1085	N10	2	24
NaNO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], 0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] + 0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	16:1	36,4	26	N1P1	2	24
NaNO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], 5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 8 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] + 5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	1,6:1	3,64	3	N1P10	2	24
NaNO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], 0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] + 0,5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	160:1	180,4	150	N10P1	2	24
NaNO <sub>3</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ], 5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	400	+ 80 [ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] + 5 [ PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	16:1	18,04	17	N10P10	2	24

\* Razões N:P referentes à soma dos enriquecimentos nutricionais N e P realizados, com as concentrações médias de nitrato+N-amoniaco e ortofosfato presentes na água da Lagoa de Cima (condição Ct<sub>0</sub>) em cada condição experimental no período úmido e no período seco.

OBS: Para as condições controles (sem enriquecimento), a razão N:P foi calculada a partir das concentrações médias de N e P obtidas na condição Ct<sub>0</sub>. Além disso, as razões médias integradas referentes às condições controle, P1, P10, N1 e N10 no período úmido não foram calculadas devido a não detecção de ortofosfato nestas condições experimentais nos seis bioensaios realizados neste período.

Após um período de 10 dias os bioensaios foram ‘desmontados’, filtrando-se 50 mL das amostras para cada filtro para análise de clorofila-a, e 100 mL para análises de P particulado, em um sistema múltiplo de filtração com filtros de fibra de vidro Millipore AP-40 ( $\varnothing$  25mm,  $\sim$  0,7  $\mu$ m) a uma pressão de vácuo  $<$ 250 mmHg. Os filtros foram dobrados e envolvidos em papel alumínio e mantidos em freezer para posterior análise. Ao final de cada filtração, a fração dissolvida foi transferida para frascos de polietileno (ca. 100 mL) para análises de N (nitrato e amônia) e, P (P-total dissolvido e solúvel reativo). Na fração particulada, foram analisados P, e clorofila-a (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema indicando os principais procedimentos realizados desde a chegada da amostra ao laboratório até o seu processamento final para análise de variáveis específicas.



### **3.3- Análises**

#### **3.3.1. Clorofila-a**

A clorofila-a total associada ao material particulado foi extraída em acetona 90% durante 24 horas, a partir de filtros triturados com o auxílio de uma espátula, com 7 mL do extrator em tubos falcon (ca 15 mL). Após este período, os tubos foram centrifugados (centrifuga marca Baby) durante 20 minutos (~4000 rpm), para separação do sobrenadante. A clorofila-a foi determinada em um espectrofotômetro (UV-Vis 160-A Shimadzu) nos comprimentos de onda de 750, 665, 664, 647 e 630 nm através do método tricromático de Jeffrey e Humphrey (1975).

#### **3.3.2. Fósforo na fração particulada**

O fósforo nesta fração foi determinado sob a forma de ortofosfato, após a digestão das amostras em tubo de vidro contendo solução de 5 mL de  $K_2S_2O_8$  2% por 0,5 h a 120 °C em sistema de autoclave (Hongve, 1994). A fração solúvel foi submetida a uma reação colorimétrica e a absorvância do complexo gerado, azul fosfo-molibdato, medida a 885 nm por espectrofotometria (Valderrama, 1981).

Os filtros destinados a estas análises foram pesados antes e após a filtração (peso seco final e inicial), utilizando uma balança analítica com precisão de 0,1 mg.

#### **3.3.3. Nitrogênio e fósforo na fração dissolvida**

Para análises de nitrato e ortofosfato foi utilizado o Cromatógrafo de íons Metrohm, modelo 844 UV/VIS Compact IC, detector de UV/VIS. O N-amoniaco foi determinado pelo método colorimétrico e leitura em espectrofotômetro (Solorzano, 1969).

### **3.4. Tratamento dos dados**

As concentrações foram descritas em função de medidas de tendência central como média, e desvios padrão e/ou coeficientes de variação.

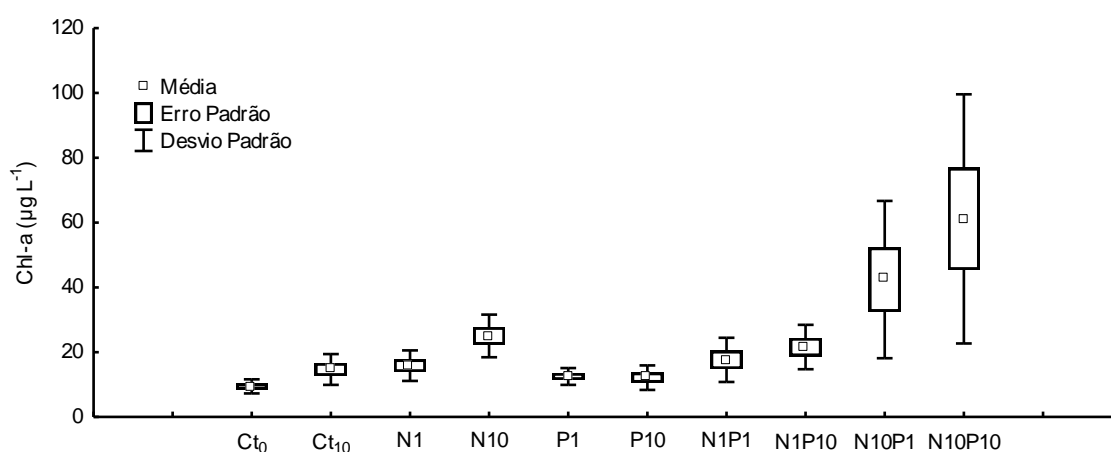
Os resultados foram analisados estatisticamente a um nível de significância igual a  $P < 0,05$ . O teste-T para amostras dependentes e a Correlação de Spearman, teste não paramétrico, foram aplicados, a fim de se verificar graus de diferenciação entre os períodos úmidos e secos.

Além disso, a fim de determinar diferenças entre as concentrações médias associadas às condições experimentais: Ct<sub>0</sub>, Ct<sub>10</sub>, P1, P10, N1, N1P1, N1P10, N10, N10P1 e N10P10, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e posterior comparação de médias pelo teste de Tukey, por intermédio do programa STATISTICA Software (2007).

## 4. Resultados

### 4.1. Clorofila-a – período úmido

As concentrações de clorofila-a variaram entre 6 e 133  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Apêndice A-1), com valores médios entre 7 e 44  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas condições  $\text{Ct}_0$  e N10P10, respectivamente. As médias, desvios e erros padrão das concentrações de clorofila-a associadas a cada condição experimental são mostradas na Figura 6.



**Figura 6.** Concentrações de clorofila-a referentes aos bioensaios ( $n=6$ ) do período úmido sob diferentes condições de enriquecimento nutricional.

Com relação às condições controle,  $\text{Ct}_{10}$  apresentou uma concentração média de clorofila-a aproximadamente 36% maior que a condição  $\text{Ct}_0$ . Esse resultado indica a presença de um remanescente de nutrientes na água natural da Lagoa de Cima. As adições isoladas de N, N1 ( $8 \mu\text{M NO}_3^-$ ) e N10 ( $80 \mu\text{M NO}_3^-$ ), por sua vez, levaram a aumentos ainda mais pronunciados de biomassa fitoplanctônica, sendo, respectivamente, 7% ( $P>0,05$ ) e 41% ( $P>0,05$ ) maiores do que o encontrado na condição  $\text{Ct}_{10}$ . Comparando as condições N10 e N1, N10 apresentou biomassa ~37% maior do que N1. Neste caso, conclui-se que embora a adição de N1 tenha estimulado o crescimento fitoplanctônico (em relação aos controles), esta adição não foi suficiente para evitar a limitação por este elemento em relação à condição N10, mostrando que a concentração neste caso foi importante para evitar a limitação por N.

As adições individualizadas de P, P1 e P10, contrariamente ao observado para as adições individualizadas de N, não repercutiram em um aumento de biomassa fitoplanctônica. Ao contrário, as concentrações médias de clorofila-a foram aproximadamente 16% menores que a média observada na condição Ct<sub>10</sub>. Esta variação não foi, contudo, significativa ( $P > 0,05$ , Tabela 2).

O papel do nitrogênio como elemento originariamente limitante ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima pôde também ser evidenciado nas adições combinadas, nitrogênio e fósforo, nas condições N1P1 e N1P10. Isto é, comparativamente às condições P1 e P10, a adição de  $8 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  nestas condições propiciou, respectivamente, um aumento das concentrações de clorofila-a em 29 e 31%,  $P > 0,05$ . Consistentemente, a adição de  $80 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$ , combinada com 0,5 e  $5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$ , condições N10P1 e N10P10, propiciou um aumento de biomassa fitoplanctônica ainda mais claro, de 70 e 80%, em relação as condições P1 e P10 ( $P < 0,05$ ). Estes resultados reforçam a indicação de limitação originária de nitrogênio ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima no período úmido (Figura 6).

A importância relativa acerca da suficiência/deficiência nutricional por N e P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima pôde também ser observada em função da maior disponibilidade de nitrogênio nas condições experimentais N10, N10P1 e N10P10. Comparativamente à condição N10, na qual foi indexada uma produção de  $25 \mu\text{g Chl-a L}^{-1}$ , nas condições N10P1 ( $P > 0,05$ ) e N10P10 ( $P < 0,05$ ) os valores de clorofila-a foram ainda maiores, sendo iguais a 42,4 e  $61,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Isto é, o fitoplâncton, inicialmente limitado pelo nitrogênio, passou a ser limitado pelo fósforo. Estes resultados demonstram a importância da proporção N:P na produção de biomassa fitoplanctônica. Os valores médios das concentrações de clorofila-a podem ser vistos na seção Apêndice A-1.

**Tabela 2.** Matriz dos valores de significância,  $P < 0,05$  (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de clorofila-a associadas às condições experimentais Ct<sub>0</sub>, Ct<sub>10</sub>, N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10, no período úmido.

	Ct0	Ct10	N1	N10	P1	P10	N1P1	N1P10	N10P1	N10P10
Ct0		1,00	1,00	0,74	1,00	1,00	0,99	0,92	0,01	0,00
Ct10			1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	0,07	0,00
N1				0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	0,09	0,00
N10					0,91	0,89	1,00	1,00	0,60	0,00
P1						1,00	1,00	0,99	0,04	0,00
P10							1,00	0,98	0,03	0,00
N1P1								1,00	0,15	0,00
N1P10									0,35	0,00
N10P1										0,50
N10P10										

#### 4.2. Clorofila-a – período seco

As concentrações de clorofila-a obtidas nos bioensaios realizados durante o período seco variaram entre 6 (P1) e 210  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N10P10). O menor valor médio encontrado, 11  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foi observado na condição P1, enquanto o valor máximo, 153  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foi observado na condição N10P10 (Apêndice A-2).

O mesmo padrão de aumento e diminuição de biomassa fitoplanctônica encontrado para o período úmido foi observado para o período seco, reforçando haver uma deficiência nutricional por N ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima nos dois períodos climatológicos estudados. Com efeito, as adições de 0,5  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P1) e de 5  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$  (P10) não propiciaram uma variação consistente de biomassa em relação à condição Ct<sub>10</sub>. Na primeira avaliação comparativa houve uma diminuição e na segunda avaliação um aumento de clorofila-a em relação à condição Ct<sub>10</sub>, com  $P > 0,05$  em ambos os casos.

Em relação à condição Ct<sub>0</sub>, Ct<sub>10</sub> apresentou uma biomassa fitoplanctônica 12% maior. Como observado para o período úmido, a adição isolada de nitrogênio, N1 e N10, repercutiu em aumentos de biomassa fitoplanctônica ainda mais pronunciados do que o observado na condição Ct<sub>10</sub>, sendo, comparativamente a esta condição experimental, ~33 e 54% maiores ( $P > 0,05$  para ambos os casos).

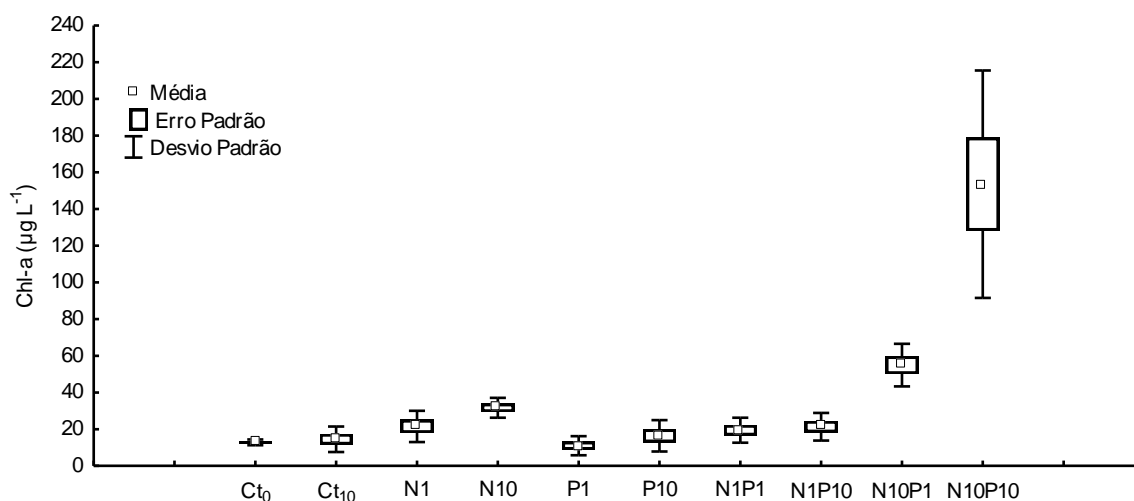
Comparativamente aos enriquecimentos P1 e P10, N1 e N10 confirmaram um efeito estimulante do N ao crescimento fitoplanctônico.

Comparando as adições individualizadas de  $NO_3^-$ , N10 apresentou valor médio de clorofila-a 32% mais alto que N1. Como observado para o período úmido, a condição N1 não evitou a limitação por N quando comparado ao efeito produzido pela condição N10 ( $P>0,05$ ). Também similarmente ao observado no período úmido, a produção de biomassa fitoplanctônica foi intensificada na seguinte ordem  $N10<N10P1<N10P10$ , sugerindo, nestas condições, limitação por fósforo ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.

A indicação de limitação por N ao crescimento fitoplanctônico foi também reforçada na condição combinada de  $8 \mu M NO_3^-$  e  $0,5 \mu M PO_4^{3-}$ , N1P1, no qual houve um aumento na biomassa fitoplanctônica de aproximadamente 43% em relação a P1 ( $P>0,05$ ). Na condição N1P10, foi também constatado um aumento de biomassa fitoplanctônica em relação à condição P10, 23%, embora não significativo ( $P>0,05$ ).

As condições N10P1 e N10P10 apresentaram uma resposta de aumento de biomassa fitoplanctônica ainda mais clara, com acréscimos de 80 e 90% de P1 para N10P1 e de P10 para N10P10, respectivamente. Este aumento ocorreu devido à adição de  $80 \mu M NO_3^-$ , em relação às adições individualizadas de P ( $P<0,05$ ), o que corrobora a indicação de ser o N o elemento limitante ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima, também no período seco (Figura 7 e Tabela 3).

Entretanto, os resultados também mostram (como anteriormente ressaltado) a potencial importância do P ao crescimento fitoplanctônico em situações de aumento de nitrogênio na água. Isto é, para as condições com adição de  $80 \mu M NO_3^-$ , condições N10, N10P1 e N10P10, os aumentos de biomassa fitoplanctônica foram diretamente relacionados ao aumento de ortofosfato no meio, sugerindo haver limitações por fósforo nas condições N10, na forma individual e combinada.



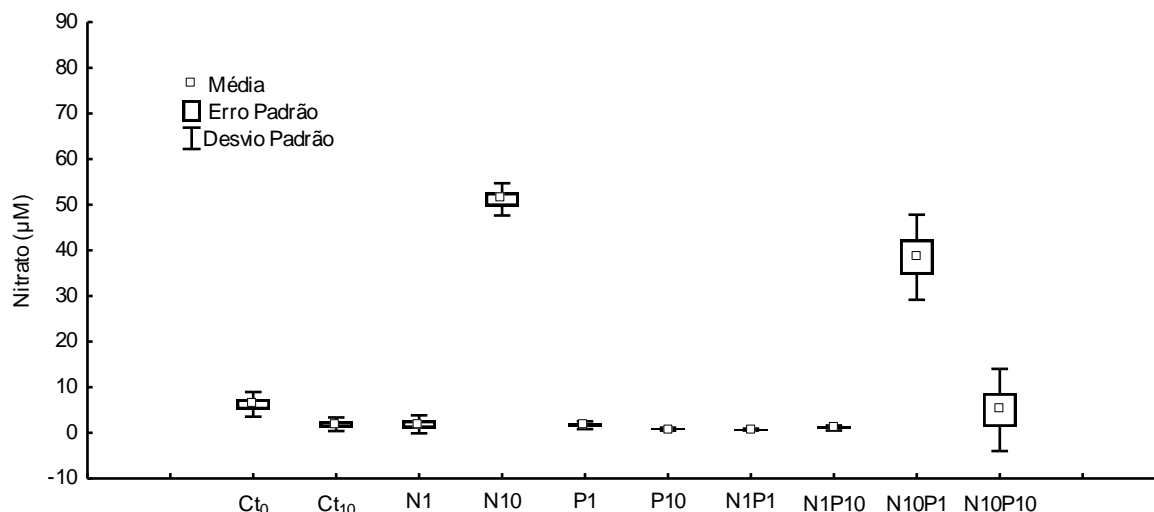
**Figura 7.** Concentrações de clorofila-a referentes aos bioensaios (n=6) do período seco sob diferentes condições de enriquecimento nutricional.

**Tabela 3.** Matriz dos valores de significância,  $P < 0,05$  (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de clorofila-a associadas às condições experimentais Ct<sub>0</sub> Ct<sub>10</sub> N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.

	Ct0	Ct10	N1	N10	P1	P10	N1P1	N1P10	N10P1	N10P10
Ct0		1,00	1,00	0,86	1,00	1,00	1,00	1,00	0,03	0,00
Ct10			1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,04	0,00
N1				1,00	1,00	1,00	0,99	1,00	0,17	0,00
N10					0,78	0,96	0,98	1,00	0,64	0,00
P1						1,00	1,00	1,00	0,02	0,00
P10							1,00	1,00	0,03	0,00
N1P1								1,00	0,07	0,00
N1P10									0,17	0,00
N10P1										0,00
N10P10										0,00

### 4.3. Nitrato – período úmido

As concentrações de nitrato variaram de 0,4 a 55 µM, condições N1P1 e N10 respectivamente, apresentando valores médios, mínimo e máximo, de 0,7 e 51 µM, referentes às mesmas condições N1P1 e N10 (Figura 8 e Apêndice A-3). A partir das concentrações médias de nitrato foram verificadas diferenças estatísticas entre as condições experimentais, como pode ser observado na Tabela 4. Vale mencionar que as concentrações residuais de nitrato integradas a uma análise acerca das produções de clorofila-a subsidiam informação indireta sobre a eficiência de uso deste recurso ao crescimento fitoplanctônico, considerando as várias condições de enriquecimento nutricional.



**Figura 8.** Média e desvio padrão de nitrato para as dez condições, mostrando uma diminuição da concentração de N com o aumento de P nas condições N10, N10P1 e N10P10.

**Tabela 4.** Matriz dos valores de significância,  $P < 0,05$  (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias de nitrato associadas às condições experimentais Ct<sub>0</sub> Ct<sub>10</sub> N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período úmido.

	Ct0	Ct10	N1	N10	P1	P10	N1P1	N1P10	N10P1	N10P10
Ct0	0,78	0,78	0,00	0,74	0,52	0,49	0,58	0,00	1,00	0,78
Ct10			1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,96
N1				0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,96
N10					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P1						1,00	1,00	1,00	0,00	0,95
P10							1,00	1,00	0,00	0,82
N1P1								1,00	0,00	0,80
N1P10									0,00	0,87
N10P1										0,00
N10P10										

#### 4.4. Nitrato – período seco

No período seco, as concentrações de nitrato variaram de zero a 89 µM, para as condições N1P10 e N10. Os valores médios detectados apresentaram um mínimo de 0,4 e um máximo de 69 µM  $NO_3^-$ , referentes às condições P10 e N10 (Figura 9, Tabela 5 e Apêndice A-4). Como pode ser observado (ver as Figuras 8 e 9), as concentrações residuais de nitrato nas condições experimentais foram comparáveis entre os períodos seco e úmido. Esta



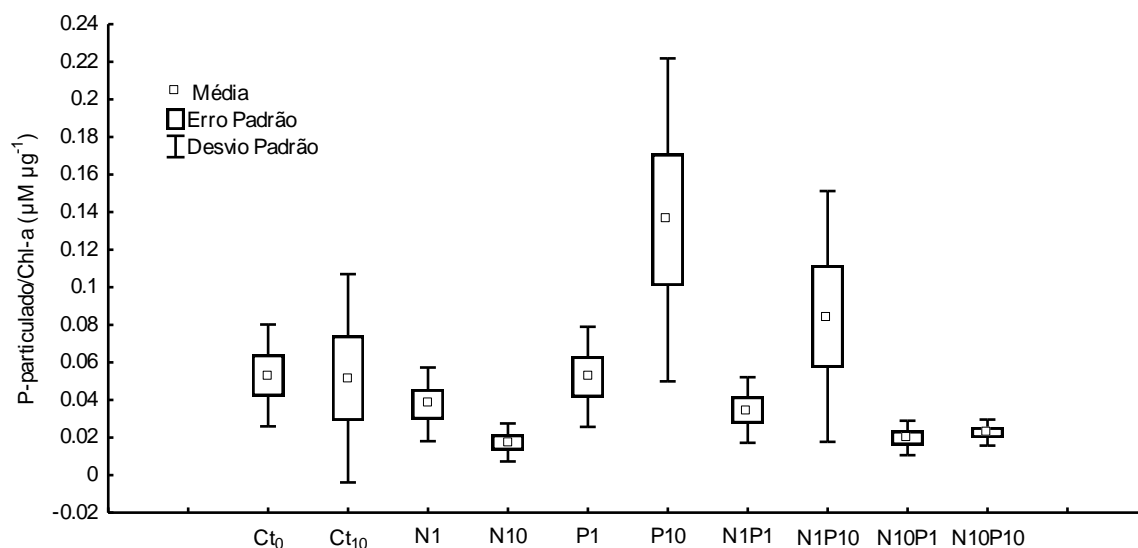






#### 4.7. Fósforo Particulado – período úmido

As concentrações de P-particulado variaram de 0,1 a 2,5  $\mu\text{M}$  nas condições N10 e P10, respectivamente. O menor valor médio, 0,4  $\mu\text{M}$ , foi associado à condição N10 e o maior valor, 1,5  $\mu\text{M}$ , foi encontrado nas condições P10 e N1P10 (Apêndice A-7). Considerando as possibilidades de consumo de luxúria e diluição por biomassa fitoplanctônica, foi realizada uma normatização dos resultados de P-particulado por unidade de clorofila-a. Os resultados, expressos em  $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ , são apresentados na Figura 12. Observa-se que os valores médios, mínimo e máximo, também estiveram associados às condições N10, N10P1 e N10P10 ( $0,02 \mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ ) e P10 ( $0,14 \mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ ). Estes resultados, numa análise pontual, mostram uma ampla variação no conteúdo de P na biomassa fitoplanctônica (Apêndice A-9).



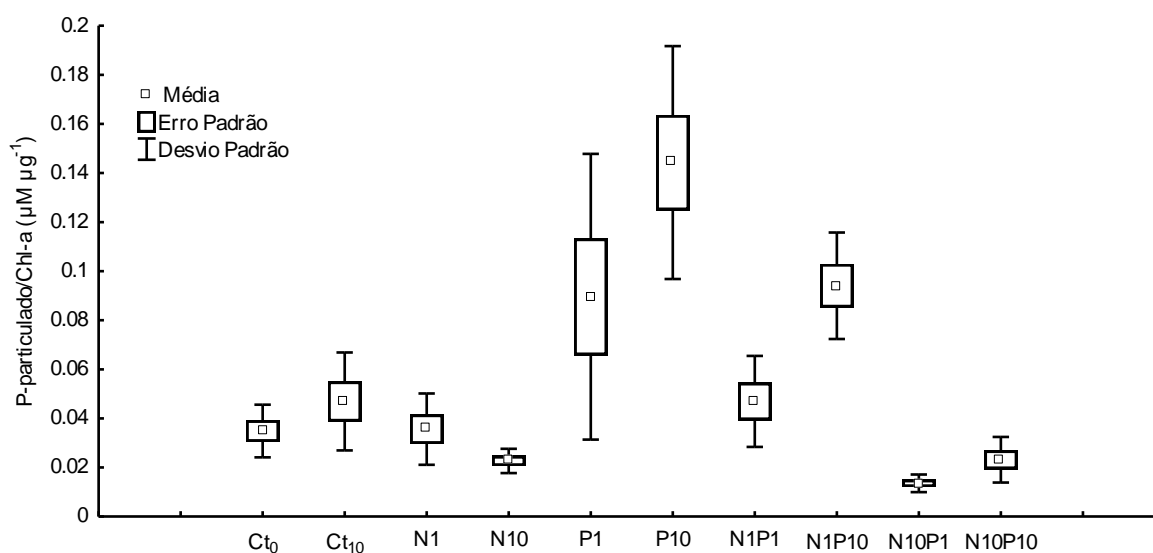
**Figura 12.** Média e desvio padrão da razão P-particulado/Chl-a para as dez condições. Observa-se uma diminuição da concentração de P com a adição de N nas condições P10, N1P10 e N10P10.

**Tabela 8.** Matriz dos valores de significância,  $P < 0,05$  (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias da razão P-particulado/Chl-a associadas às condições experimentais Ct<sub>0</sub>, Ct<sub>10</sub>, N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período úmido.

	Ct <sub>0</sub>	Ct <sub>10</sub>	N1	N10	P1	P10	N1P1	N1P10	N10P1	N10P10
Ct <sub>0</sub>		1,00	1,00	0,89	1,00	0,03	1,00	0,95	0,93	0,96
Ct <sub>10</sub>			1,00	0,91	1,00	0,03	1,00	0,93	0,94	0,97
N1				1,00	1,00	0,01	1,00	0,64	1,00	1,00
N10					0,90	0,00	1,00	0,17	1,00	1,00
P1						0,03	1,00	0,94	0,93	0,96
P10							0,00	0,51	0,00	0,00
N1P1								0,55	1,00	1,00
N1P10									0,20	0,26
N10P1										1,00
N10P10										

#### 4.8. Fósforo Particulado – período seco

As concentrações de P-particulado variaram de 0,2 (Ct<sub>0</sub>) a 3,9  $\mu\text{M}$  (N10P10). Os valores médios situaram entre um mínimo de 0,4 e um máximo de 3,2  $\mu\text{M}$  para estas mesmas condições experimentais (Apêndice A-8). Normalizados pela clorofila-a, as médias variaram entre 0,01  $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$  (N10P1) e 0,14  $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$  (P10) (Apêndice A-10 e Figura 13). Como pode ser observado (ver item anterior), estes resultados assemelham-se aos descritos para o período úmido, reforçando a grande amplitude de conteúdo de P-particulado na biomassa fitoplanctônica.



**Figura 13.** Média e desvio padrão da razão P-particulado/Chl-a para as dez condições. Observa-se uma diminuição da concentração de P com a adição de N nas condições P10, N1P10 e N10P10.

**Tabela 9.** Matriz dos valores de significância,  $P < 0,05$  (em vermelho), resultantes do teste de Tukey, referentes às concentrações médias da razão P-particulado/Chl-a associadas às condições experimentais Ct<sub>0</sub>, Ct<sub>10</sub>, N1, N10, P1, P10, N1P1, N1P10, N10P1, e N10P10 no período seco.

	Ct0	Ct10	N1	N10	P1	P10	N1P1	N1P10	N10P1	N10P10
Ct0		1,00	1,00	1,00	0,03	0,00	1,00	0,01	0,93	1,00
Ct10			1,00	0,86	0,19	0,00	1,00	0,10	0,51	0,88
N1				1,00	0,03	0,00	1,00	0,02	0,92	1,00
N10					0,00	0,00	0,86	0,00	1,00	1,00
P1						0,03	0,19	1,00	0,00	0,00
P10							0,00	0,06	0,00	0,00
N1P1								0,10	0,51	0,88
N1P10									0,00	0,00
N10P1										1,00
N10P10										

#### 4.9. Integração dos resultados

##### 4.9.1. Clorofila-a

Considerando as observações de relativa uniformidade sazonal para os parâmetros analisados neste estudo, foi possível realizar uma avaliação sintética e integrada dos resultados. Com efeito, foi proposta uma organização unificada de padrões observados entre as condições experimentais, sendo baseada em tendências, qualidade da observação, e não em significância estatística.

Neste sentido, observa-se visualmente que as concentrações de clorofila-a para os dois períodos de estudo apresentaram padrão semelhante de resposta em todas as condições propostas (Tabela 10). Esta uniformidade pôde ser verificada também através do coeficiente de correlação de Spearman com valor de  $r = 0,9$ . Desta forma, a partir dos padrões observados foi possível agrupar algumas condições experimentais em função das concentrações de clorofila-a.

**Tabela 10.** Padrões observados nas concentrações de clorofila-a para ambos os períodos de estudo.

	Condições
[Chl-a]	$Ct_{10} > Ct_0$
[Chl-a]	$N10 > Ct_0, Ct_{10}, N1, P1, P10, N1P1$ e $N1P10$
[Chl-a]	$P1 < N1P1 < N10P1$
[Chl-a]	$P10 < N1P10 < N10P10$
[Chl-a]	$N1 < N1P1 < N1P10$
[Chl-a]	$N10 < N10P1 < N10P10$

Em relação às condições controle,  $Ct_{10}$  apresentou maior biomassa que a condição  $Ct_0$ , indicando um resíduo de nutrientes da água da lagoa presentes nesta condição, favorecendo um aumento de biomassa fitoplanctônica encontrada. Pode ser observado também, que a adição individualizada de  $80 \mu\text{M } NO_3^-$ , condição N10, apresentou as maiores concentrações de clorofila-a em relação a todas as outras condições experimentais, excetuando aquelas no qual também foram adicionadas  $80 \mu\text{M } NO_3^-$ , evidenciando a limitação por nitrogênio no sistema.

Além disso, a indicação de limitação por nitrogênio foi reforçada também nas condições com adições combinadas. Desta forma, a adição de nitrogênio, estimulou um maior aumento de biomassa fitoplanctônica do que as adições de fósforo como pode ser visto na sequência  $P1 < N1P1 < N10P1$  e também em  $P10 < N1P10 < N10P10$ . Entretanto, ainda em relação às condições combinadas, pode ser observado também um estímulo ao crescimento fitoplanctônico após as adições de P, na ordem N1, N1P1 e N1P10; e N10, N10P1, e N10P10. Este fato indica que um maior aporte de nitrogênio no sistema pode modificar o nutriente limitante ao crescimento fitoplanctônico, e demonstra a importância da proporção N:P na produção de biomassa.

#### **4.9.2. Nitrato**

A concentração residual de nitrato na condição  $Ct_{10}$  foi consistentemente menor do que a concentração presente originariamente na água da Lagoa de Cima ( $Ct_0$ ). Esta observação indica diminuição deste nutriente, certamente deficiente, ao crescimento fitoplanctônico. Uma segunda observação se refere

ao fato de haver uma relativa uniformidade de concentrações entre as condições  $Ct_{10}$ ~N1~P1~P10~N1P1~N1P10~N10P10. Nota-se que as concentrações residuais de nitrogênio foram comparáveis entre as condições de não enriquecimento ( $Ct_{10}$ , P1 e P10) e de enriquecimento por nitrogênio (N1, N1Px, N10P10). Esta observação indica a importância da disponibilidade absoluta e relativa de nitrogênio (e fósforo) sobre as concentrações remanescentes deste nutriente na água (Tabela 11). De fato, uma terceira observação mostra um consistente decréscimo de nitrogênio na ordem: N10, N10P1 e N10P10. Isto é, para um mesmo enriquecimento de nitrogênio, 80  $\mu$ M, se obtém diferenças de concentrações referentes a aproximadamente uma ordem de magnitude em função da variação de proporção combinada de fósforo nas condições experimentais.

**Tabela 11.** Padrões observados nas concentrações de nitrato para ambos os períodos de estudo.

	Condições
$[NO_3^-]$	$Ct_0 > Ct_{10}$
$[NO_3^-]$	$Ct_{10}$ ~N1~P1~P10~N1P1~N1P10~N10P10
$[NO_3^-]$	N10>N10P1>N10P10

#### 4.9.3. Ortofosfato

Como observado para as concentrações de nitrato, foi possível agrupar algumas condições experimentais em função das concentrações de ortofosfato relativamente uniformes (Tabela 12). Este grupo foi composto pelas condições  $Ct_{10}$ , N1, N10, P1, N1P1, N10P1 e N10P10, como podem ser grosseiramente visualizados nas Figuras 8, 9, 10 e 11. Todas estas condições quando comparadas apresentaram  $P > 0,05$ . Um segundo grupo de observação foi composto pelas condições P10, N1P10 e N10P10. A importância da disponibilidade absoluta e relativa N:P foi também validada para as análises de fósforo na água, com diminuição deste nutriente com o acréscimo de nitrogênio. Dessa forma, as absorções de nitrogênio e fosfato, um em relação ao outro, pareceram ser dependentes da proporção entre estes nutrientes no meio, com efeito sobre as concentrações de clorofila-a.



**Tabela 12.** Padrões observados para as concentrações de ortofosfato para ambos os períodos de estudo.

	Condições
$[PO_4^{3-}]$	Ct <sub>10</sub> ~N1~N10~P1~N1P1~N10P1~N10P10
$[PO_4^{3-}]$	P10>N1P10>N10P10

#### 4.9.4. Razão P-particulado:clorofila-a

A partir da razão P-particulado:Chl-a foi possível identificar alguns padrões de observação. Por exemplo, fixando-se um padrão de enriquecimento nutricional por fósforo, P1 ou P10, verifica-se uma diminuição deste elemento no material particulado com o aumento de biomassa fitoplanctônica. Esta resposta relacional indica um consumo de luxúria nas condições de adição isolada de fósforo, sendo minimizada com as adições combinadas de nitrogênio. (Tabela 13).

**Tabela 13.** Padrões observados nas razões de P-particulado: Chl-a observadas para ambos os períodos de estudo.

	Observações
$[P\text{-particulado:Clorofila-a}]$	Ct <sub>10</sub> >N1>N10
$[P\text{-particulado:Clorofila-a}]$	P1>N1P1>N10P1
$[P\text{-particulado:Clorofila-a}]$	P10>N1P10>N10P10
$[P\text{-particulado:Clorofila-a}]$	P10>P1 / N1P10> N1P1 / N10P10>N10P1

A observação de diminuição das razões P-particulado/Chl-a foi também constatada nas condições Ct<sub>10</sub>>N1>N10, o que reforça o papel do N no crescimento fitoplanctônico (Figura 6 e 7) e seu efeito de diluição no conteúdo de fósforo por unidade de clorofila-a.

Uma última observação, coerentemente, o aumento de fósforo nas condições experimentais pareadas P10/P1, N1P10/N1P1 e N10P10/N10P1 foi relacionado a maiores conteúdos de P-particulado por unidade de clorofila-a.

#### **4.10. Parâmetros de crescimento populacional aplicado à comunidade fitoplanctônica**

Foram investigados alguns parâmetros de crescimento populacional aplicados à comunidade fitoplanctônica — taxa de crescimento ( $\mu$ ), tempo de dobramento (G) e razão de produção final sobre a inicial (R) —, além da verificação dos rendimentos de produção de biomassa por investimento nutricional (Y), usando-se a clorofila-a como indexador de biomassa fitoplanctônica:

$$\mu = (\ln B_2 - \ln B_1) (t_2 - t_1)^{-1}$$

$B_2$  igual à biomassa final ( $\mu\text{g}$  clorofila  $L^{-1}$ )

$B_1$  igual à biomassa inicial ( $C_{t_0}$ ) ( $\mu\text{g}$  clorofila  $L^{-1}$ )

$t_2$  e  $t_1$  iguais ao tempo final e inicial, respectivamente.

$$G = \ln 2 \mu^{-1}$$

$$R = ([\text{clorofila-a}]_{\text{biomassa final}}) ([\text{clorofila-a}]_{\text{biomassa inicial } (C_{t_0})})^{-1}$$

$$Y = \Delta \text{Clorofila-a} [( \text{biomassa final} ) - ( \text{biomassa inicial, } C_{t_0} )] \\ ([\text{nutriente}]_{\text{enriquecimento}})^{-1}$$

$$Y = (\text{mg clorofila}) (\text{mmol nutriente})^{-1}$$

Vale registrar que os valores de  $\mu$  e G obtidos neste estudo não são facilmente comparados com a literatura, uma vez que, em populações fitoplanctônicas,  $\mu$  e G são convencionalmente vinculados à fase de crescimento exponencial.

Os resultados indicaram para o período úmido um intervalo de taxas de crescimento,  $\mu$ , entre 0,02 e 0,19  $\text{dia}^{-1}$ , G entre 3,7 e 15,8 dias, R entre 1,3 e 6,5, rendimento de biomassa por investimento de N ( $Y_N$ ), entre 0,2 e 1,5 mg clorofila/mmol N e de P ( $Y_P$ ), entre 0,5 e 65,9 mg clorofila/mmol P. No período seco, os resultados indicaram um intervalo de taxas de crescimento,  $\mu$ , entre 0,01 e 0,25  $\text{dia}^{-1}$ , G entre 2,8 e 55,5 dias, R entre 0,9 e 12,  $Y_N$ , entre 0,2 e 1,8 mg clorofila/mmol N e , e  $Y_P$ , entre 0,7 e 84,2 mg clorofila/mmol P.

As condições N1, N1P1 e N1P10 apresentaram um discreto aumento nas taxas de crescimento,  $\mu$ , para os dois períodos, exceto a condição N1P1 no período seco, assim como nos valores de R, sugerindo nestes casos uma baixa, mas consistente contribuição de P ao crescimento fitoplanctônico.

Esta observação pode ser alternativamente verificada pelos valores de  $Y_N$ , que, de um modo geral, apresentaram o mesmo gradiente crescente de rendimento (Tabelas 14 e 15).

**Tabela 14:** Parâmetros de crescimento populacional, mas aplicados às comunidades fitoplanctônicas da Lagoa de Cima (RJ), submetidas à bioensaios tipo 'batch', período úmido.

Período úmido	$\mu$ ( $d^{-1}$ )	G (dias)	R	$Y_N$ (mg clorofila/mmol N)	$Y_P$ (mg clorofila/mmol P)
Ct <sub>0</sub>	-	-	-	-	-
Ct <sub>10</sub>	0,04	15,8	1,6	-	-
N1	0,05	13,4	1,7	0,8	-
N10	0,10	7,1	2,6	0,2	-
P1	0,03	24,8	1,3	-	6,1
P10	0,02	27,7	1,3	-	0,5
N1P1	0,06	11,1	1,9	1,0	16,3
N1P10	0,08	8,4	2,3	1,5	2,4
N10P1	0,15	4,6	4,5	0,4	65,9
N10P10	0,19	3,7	6,5	0,6	10,3

**Tabela 15:** Parâmetros de crescimento populacional, mas aplicados às comunidades fitoplanctônicas da Lagoa de Cima (RJ), submetidas à bioensaios tipo 'batch', período seco.

Período seco	$\mu$ ( $d^{-1}$ )	G (dias)	R	$Y_N$ (mg clorofila/mmol N)	$Y_P$ (mg clorofila/mmol P)
Ct <sub>0</sub>	-	-	-	-	-
Ct <sub>10</sub>	0,01	55,5	1,1	-	-
N1	0,05	13,3	1,7	1,1	-
N10	0,09	7,6	2,5	0,2	-
P1	-	-	0,9	-	-
P10	0,02	27,9	1,3	-	0,7
N1P1	0,04	16,6	1,5	0,8	13,3
N1P10	0,05	13,5	1,7	1,1	1,7
N10P1	0,15	4,8	4,3	0,5	84,2
N10P10	0,25	2,8	12,0	1,8	28,1

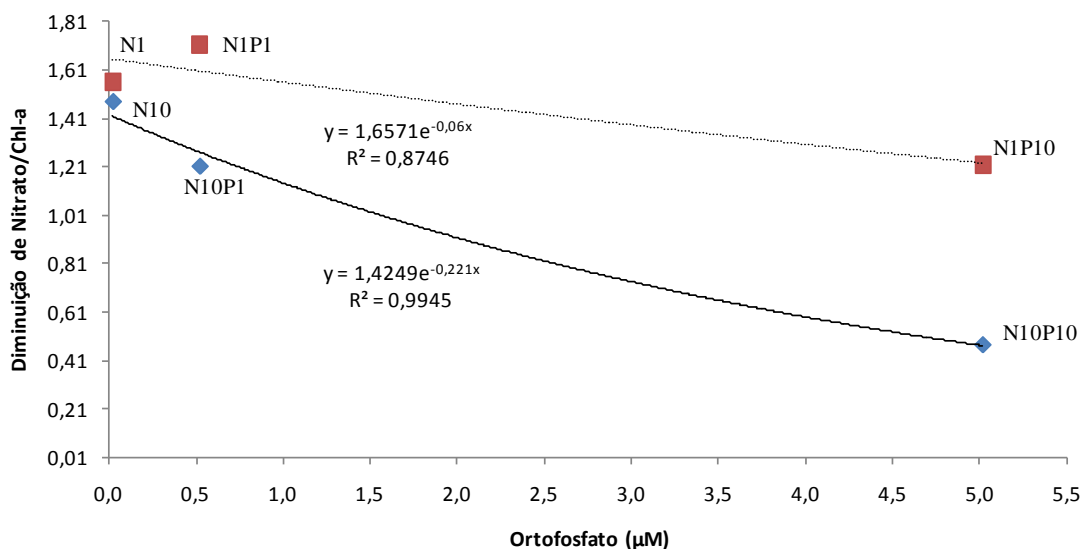
A condição N10P10 apresentou G aproximadamente 4 e 20 vezes menor, no período úmido e seco, respectivamente, que a condição Ct<sub>10</sub>. É interessante notar que a condição N10, embora tenha apresentado valores de  $\mu$  e R superiores a N1, N1P1 e N1P10, e um valor de G inferior a estas condições, foi caracterizado pelo menor  $Y_N$ , reforçando um excesso de N naquela condição experimental, para ambos os períodos climatológicos.

Por sua vez, no caso do P combinado a enriquecimentos N1 e N10, verifica-se que o aumento de  $\mu$ , não foi acompanhado por um aumento de  $Y_P$ . Ao contrário, houve uma diminuição de  $Y_P$  das condições N1P1 em relação a N1P10 e de N10P1 para a condição N10P10 em aproximadamente 6 vezes no período úmido, e de ~8 e 3 vezes, no período seco, reforçando uma condição nutricional excessiva de P nas condições N1P10 e N10P10 em relação às condições N1P1 e N10P1, respectivamente. Estes resultados sugerem que uma condição intermediária às razões N:P de 160:1 e 16:1, seja capaz de subsidiar uma melhor eficiência de produção de biomassa por investimento nutricional combinado para o fósforo. Entretanto, entre as condições N1P1 e N1P10,  $Y_N$  foi mais eficiente na razão 1,6:1. Para as condições N10P10 (16:1) e N10P1 (160:1),  $Y_N$  foi mais eficiente no primeiro caso. Provavelmente, caso fosse investigada a razão N10P100 (1,6:1), seria, de acordo com o evidenciado para N1P10, um melhor  $Y_N$ , relativamente às condições N10P10 e N10P1.

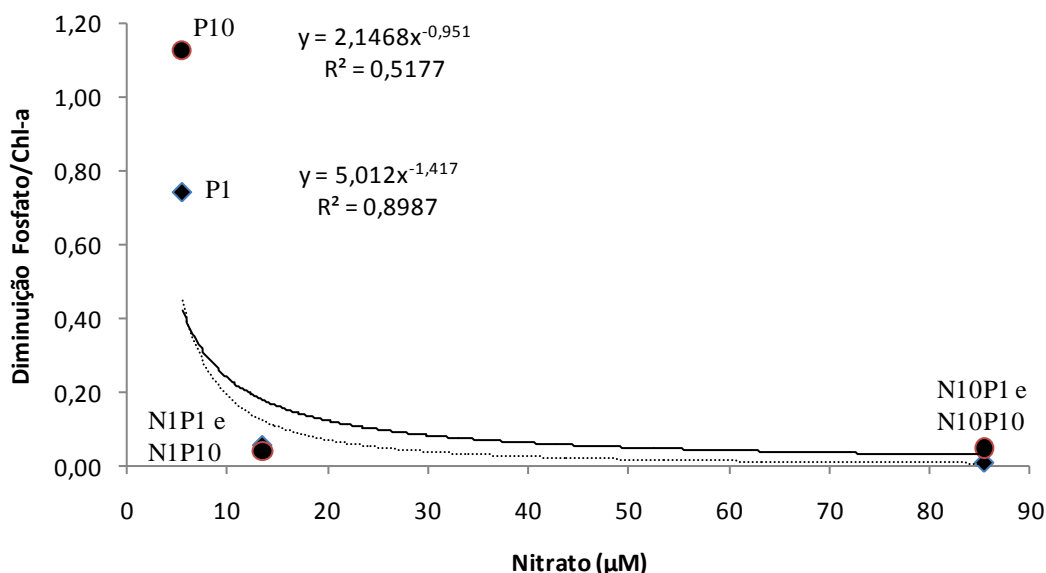
#### ***4.11. Diminuição de nitrato e ortofosfato por clorofila-a***

Foi possível observar o decréscimo líquido das concentrações de nitrato e ortofosfato. Esta diminuição foi calculada a partir da diferença entre as concentrações iniciais destes nutrientes – obtidos a partir da soma entre as concentrações de nitrato e ortofosfato da água natural da lagoa, condição  $C_{t_0}$ , ao enriquecimento nutricional realizado para cada condição experimental – versus a concentração destes nutrientes medidas após o período de dez dias de incubação. Nesta etapa, a diminuição das concentrações de nitrato e ortofosfato foram normatizadas por unidade de clorofila-a e plotadas em função dos gradientes de concentração destes nutrientes em algumas condições experimentais, a fim de verificar possíveis modelos relacionais. Para essas avaliações foram selecionadas as condições N1 (individualizada e combinada) e N10 (individualizada e combinada) em função das concentrações totais de ortofosfato (incluindo ou não as adições realizadas) no início dos experimentos (Figura 14). O reverso desta relação é apresentado na Figura 15 (Apêndice A-12). Em ambos os casos foi possível evidenciar uma diminuição por unidade de clorofila-a do nutriente Y (nitrato ou ortofosfato) com o aumento do nutriente X (nitrato ou ortofosfato). Estes resultados sugerem, como indicado no item

anterior, diferentes eficiências de produção de biomassa fitoplanctônica por investimento nutricional N ou P (item 4.10).

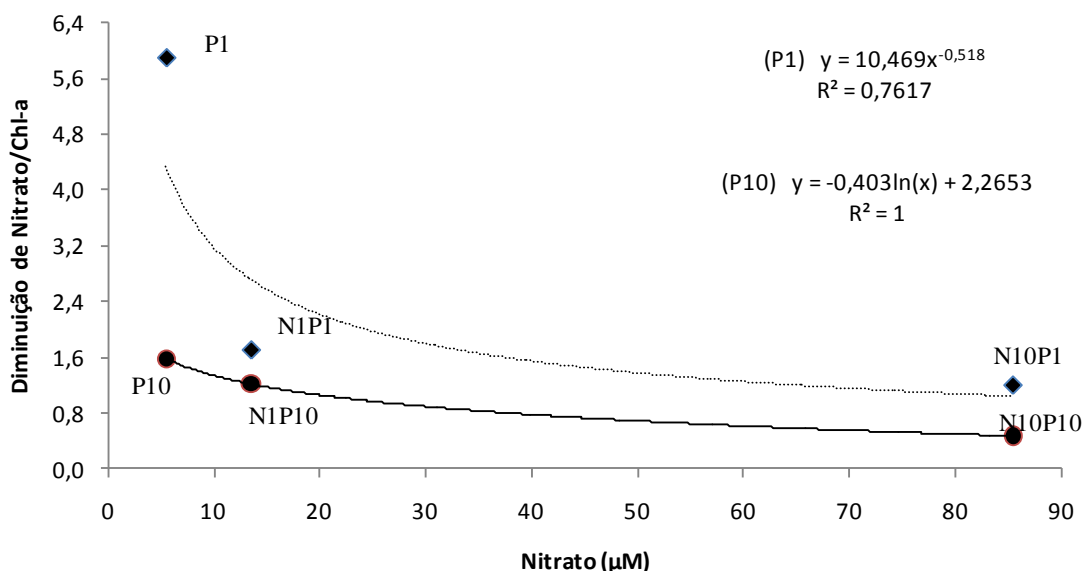


**Figura 14.** Diminuição de nitrato/Chl-a, a linha tracejada é referente às condições com adição de  $8 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  (N1), adicionados individual e combinadamente as adições de fosfato de  $0,5$  (P1) e  $5$  (P10)  $\mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$ . A linha sólida é referente às condições com adições de  $80 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  (N10), individual e combinadamente com as adições de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição  $\text{Ct}_0$ ).



**Figura 15.** Diminuição de fosfato/Chl-a, a linha sólida é referente às condições com adição de  $5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  (P10) adicionados individual e combinadamente as adições de nitrato de  $8$  (N1) e  $80$  (N10)  $\mu\text{M } \text{NO}_3^-$ . A linha tracejada é referente à condição com adições de  $0,5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  (P1), individual e combinadamente com as adições de  $\text{NO}_3^-$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa ( $\text{Ct}_0$ ).

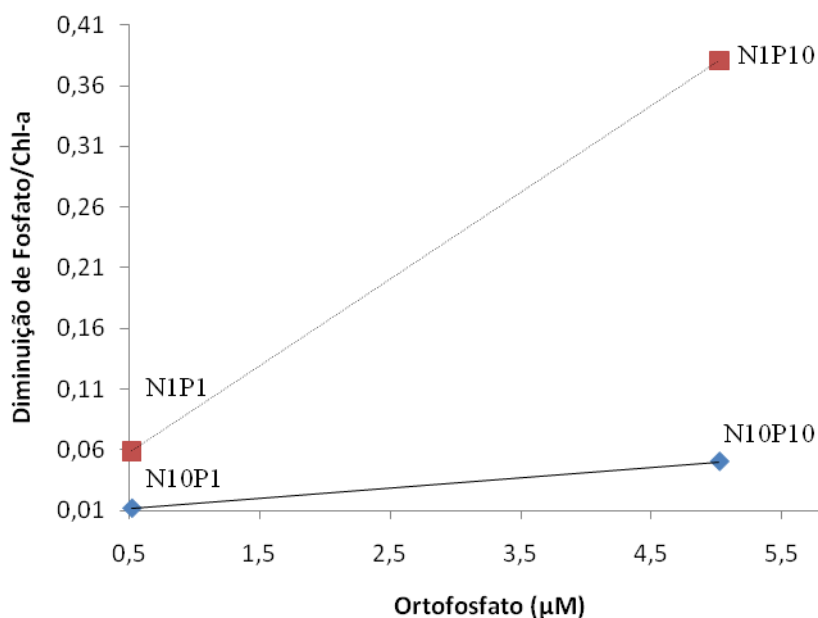
A diminuição de nitrato por unidade de clorofila-a foi também relacionada às condições P1 (individualizada e combinada) e P10 (individualizada e combinada) (Figura 16). Observa-se um aumento da eficiência de produção de biomassa fitoplanctônica com o aumento de nitrato no meio. Por exemplo, a condição P1 foi relacionada a uma diminuição de nitrato por unidade de clorofila-a ~70-80% maior que as condições N1P1 e N10P1. Na condição P10 a diminuição de nitrato por unidade de clorofila-a foi 23% maior do que em N1P10 e 70% do que em N10P10. Esta observação sugere um melhor ajuste nutricional na condição P1N10 do que em P1, e também na condição P10N10 do que em P10, reforçando, uma vez mais, a deficiência de N para o crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.



**Figura 16.** Diminuição de nitrato/Chl-a, a linha sólida é referente às condições com adição de  $+5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  (P10) adicionados individual e combinadamente com as adições de nitrato de 8 (N1) e 80 (N10)  $\mu\text{M } \text{NO}_3^-$ . A linha tracejada é referente às condições com adições de  $0,5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  (P1), individual e combinadamente com as adições de  $\text{NO}_3^-$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição  $\text{Ct}_0$ ).

No que se refere a diminuição de fosfato por unidade de clorofila-a, os valores calculados foram plotados em função das concentrações de ortofosfato no meio, considerando as condições N1P1, N1P10 e N10P1 e N10P10. Devido aos baixíssimos valores de ortofosfato em N1 e N10, estas condições experimentais foram suprimidas da análise gráfica.

Comparativamente à condição N1P1, N1P10 apresentou uma tendência de aumento da diminuição de fosfato por unidade de clorofila-a produzida. Este resultado sugere certa deficiência de N na condição N1P10 em relação à condição N1P1. De forma consistente, comparativamente à condição N10P10, a condição N10P1 foi relacionada a uma melhor eficiência de produção de biomassa fitoplanctônica, considerando a diminuição de ortofosfato por unidade de clorofila-a produzida. Este resultado sugere um excesso de P em relação ao N na condição N10P10. (Figura 17).

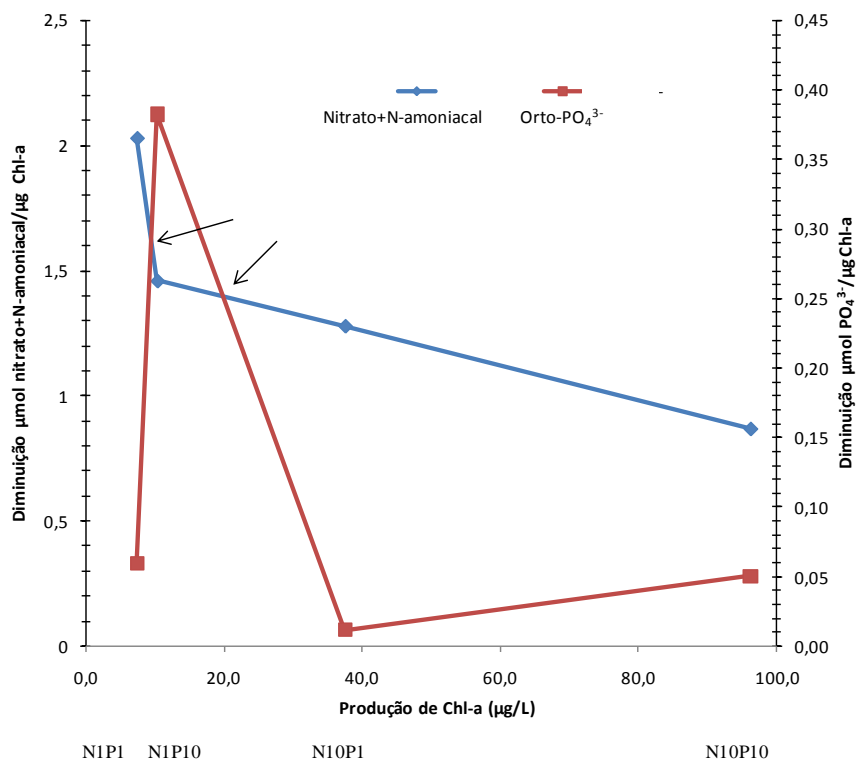


**Figura 17.** Diminuição de fosfato/Chl-a, a linha tracejada é referente às condições com adição de  $8 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  (N1), adicionados individual e combinadamente com as adições de  $0,5$  e  $5 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$  (P1 e P10). A linha sólida é referente às condições com adições de  $80 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  (N10) adicionado individual e combinadamente com as concentrações de  $\text{PO}_4^{3-}$ . Em ambos os casos, as concentrações de nitrato e fosfato adicionadas foram somadas as concentrações médias iniciais destes nutrientes existentes na água da lagoa (condição Ct<sub>0</sub>).

Considerando as várias indicações de eficiência relativa, comparativa, entre as absorções de nitrato e ortofosfato por unidade de clorofila-a produzida, plotadas em função das concentrações destes nutrientes nas condições experimentais, buscou-se identificar a razão N:P ótima ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Embora não adicionado N-amoniaco nas condições experimentais, este nutriente foi incorporado aos cálculos N:P, considerando as suas concentrações medidas nos tempos inicial e final dos experimentos. Observando a eficiência de produção de clorofila-a por diminuição de nitrato+N-amoniaco, dentre as condições N1P10, N10P1, N10P10 e N1P1 estas últimas duas apresentaram a maior e a menor eficiência relativa, respectivamente. Por sua vez, em relação à eficiência de diminuição de P por clorofila-a, as condições de maior e menor eficiência foram N10P1 e N1P10, respectivamente (Figura 18).

A união destas curvas possibilitaram realizar uma análise gráfica para se avaliar o ótimo nutricional, melhor eficiência N:P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Para este fim, os pontos de interseção (observar setas na Figura 18) entre as curvas de eficiência de diminuição de  $\text{NO}_3 + \text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  e de  $\text{PO}_4^{3-}$  por unidade de clorofila-a produzida foram assumidos como referenciais de um ótimo fisiológico, balanceado para o crescimento fitoplanctônico. Projetando-se os pontos de interseção em direção aos eixos y-primário e y-secundário foi possível obter os valores de diminuição N e P referentes aos nutrientes mensurados. A razão destas absorções geraram uma mesma razão N:P de 5,5:1. É interessante notar que este valor é cerca de três vezes menor do que o esperado pela razão de Redfield (1958), 16:1.





**Figura 18.** No eixo y-primário é representada a diminuição de nitrito+N-amoniaco por clorofila-a produzida, e no eixo y-secundário é apresentada a diminuição de ortofosfato por clorofila-a para as condições combinadas N1P1, N1P10, N10P1 e N10P10. Observa-se a partir do ponto de cruzamento entre as absorções dos nutrientes (setas) que a razão ótima de diminuição dos nutrientes para o crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima neste período de estudo é de 5,5:1, abaixo da razão de 16:1 prevista por Redfield (1958).

## 5. Discussão

### 5.1. Delineamento experimental

O uso de bioensaios constitui uma típica abordagem metodológica para se identificar nutriente(s) limitante(s) aos organismos fitoplanctônicos (Brett *et al.*, 1999; Levine & Whalen, 2001; James *et al.*, 2003; Piehler *et al.*, 2004, Sylvan *et al.*, 2006, Downs *et al.*, 2008, Ren *et al.*, 2009). Embora haja nestas metodologias um pouco de distanciamento da realidade do ambiente natural (Hecky e Kilham, 1988), ainda assim, alguns pesquisadores acreditam que os bioensaios são uma das principais ferramentas para a identificação do(s) nutriente(s) potencialmente limitante(s) ao crescimento fitoplanctônico (Elser *et al.*, 1990, Piehler *et al.*, 2004, Ren *et al.*, 2009).

Na literatura, grande parte dos bioensaios realizados ocorre *in vitro* e em condições controladas de luz (intensidade e fotoperíodo) e temperatura (Suttle & Harrison, 1988; Marinho & Azevedo, 2007). Neste estudo, os ensaios foram realizados num ambiente de laboratório não estritamente climatizado e exposto à luz natural, notadamente indireta. O não controle destes fatores certamente contribuiu para uma variação na biomassa fitoplanctônica nas condições de estudo entre os bioensaios realizados. Entretanto, estas variações não foram consideradas críticas para o objetivo principal do estudo, que foi verificar as respostas relacionais entre nitrato, fosfato e biomassa fitoplanctônica, considerando uma mesma (ou similar) condição ambiental de luz e temperatura em cada experimento realizado nos dois períodos climatológicos investigados. Num sentido comparativo, o número de réplicas, as repetições (frequência) dos experimentos e a extensão das incubações devem ser incluídos como informações relevantes à interpretação dos resultados.

Sobre as variáveis hidroquímicas investigadas neste estudo, N e P, muitas vezes, enriquecimentos nutricionais são empregados sem que se perceba uma razoável (mesma ordem de grandeza) correspondência com a realidade dos ambientes naturais. Isto contribui para condições experimentais mais e mais artificiais. No presente estudo os enriquecimentos nutricionais foram estabelecidos de modo a reproduzir concentrações compatíveis ao frequentemente reportado para águas continentais ( $P = 10^{-1}$ - $10^0 \mu\text{M}$ ,  $N = 10^0$ - $10^1 \mu\text{M}$ ). Segundo Meybeck (1993) as concentrações naturais mais frequentes

registradas em rios não poluídos equivalem a  $7 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  e  $0,3 \mu\text{M } \text{PO}_4^{3-}$ . Esses valores são comparáveis às concentrações de fosfato (0,2 a  $2,3 \mu\text{M}$ ) e nitrato (0,5 a  $30 \mu\text{M}$ ) medidas no rio Imbé, o qual abastece a Lagoa de Cima (César, 2006).

Embora relativos e limitados, os resultados obtido pelo presente delineamento experimental pareceram ser suficientes para sugerir o N — comparativamente ao P — como elemento limitante ou regulador ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.

## **5.2. Respostas do fitoplâncton às adições de nutrientes**

A ideia que ecossistemas aquáticos de água doce são mais frequentemente limitados por P e que os oceanos são limitados por N é comumente aceita na literatura mundial (Sterner, 2008). Estudos recentes, entretanto, indicam limitação e co-limitação de nitrogênio em lagos (Levine & Whalen 2001; James *et al.*, 2003; Sterner, 2008; Schindler *et al.*, 2008), sendo ainda mais evidente em regiões tropicais (Elser *et al.*, 2007). Os resultados dos bioensaios realizados no presente estudo indicam claramente o N como nutriente limitante ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima, devido ao maior aumento de biomassa fitoplanctônica por clorofila-a quando adicionado individualmente o nitrato ao meio ante as adições individualizadas de fósforo.

A identificação de um elemento limitante ao crescimento fitoplanctônico não assegura, no entanto, a sua maior produção mediante a sua simples adição, ainda que em excesso. Elser *et al.* (1990) e Elser *et al.* (2007), em revisões realizadas sobre limitação de nutrientes aos organismos fitoplanctônicos, encontraram que o crescimento fitoplanctônico é maior em enriquecimentos combinados de N + P do que em adições individualizadas destes nutrientes. Estes autores sugerem que os efeitos sinérgicos da combinação destes nutrientes ocorram devido à indução de limitação pelo nutriente em excesso em relação ao outro.

De fato, essa observação descrita por Elser *et al.* (2007) no qual a adição de um nutriente estimulou a limitação pelo outro nutriente pareceu se confirmar no presente estudo. Desta forma, a adição de  $80 \mu\text{M } \text{NO}_3^-$  pareceu induzir uma

mudança de limitação de nitrogênio para o fósforo, o qual, até então, não se mostrava limitante ao crescimento fitoplanctônico. A importância da disponibilização relativa de N e P à produção de biomassa fitoplanctônica foi particularmente evidente na comparação entre as condições N10, P1, P10, N10P1 e N10P10, com claro efeito sinérgico nestas condições combinadas em relação às adições isoladas (Tabela 16). Isto é, as resultantes de produção de biomassa fitoplanctônica nestas condições combinadas superaram os somatórios das condições individualizadas correspondentes.

**Tabela 16.** Variação das concentrações médias de clorofila-a das condições experimentais em relação ao  $C_{t0}$ , e o efeito sinérgico das adições combinadas em relação aos nutrientes nitrato e fosfato.

▲ Condições - $C_{t0}$	▲ Chl-a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Efeito	Interação sinérgica
1) $C_{t10} - C_{t0}$	3,5	Tempo	-
2) N1 - $C_{t0}$	7,6	N	-
3) N10 - $C_{t0}$	17,2	N	-
4) P1 - $C_{t0}$	0,6	P	-
5) P10 - $C_{t0}$	3,2	P	-
6) N1P1 - $C_{t0}$	7,4	N e P	N
7) N1P10 - $C_{t0}$	10,4	N e P	N
8) N10P1 - $C_{t0}$	37,6	N e P	S
9) N10P10 - $C_{t0}$	96,2	N e P	S

Legenda: (-) não se aplica; S: sim, N: não

Vale ressaltar a observação de baixas concentrações de ortofosfato detectadas na água da lagoa, condição  $C_{t0}$ . Essa condição propiciou uma alta razão N:P, sugerindo, paradoxalmente ao verificado neste estudo, uma limitação por fósforo ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Teoricamente, este fato não deveria ocorrer devido à limitação nutricional detectada no presente estudo ter sido por N e não por P. Segundo Ren *et al.* (2009) o encontro de uma baixa concentração de ortofosfato em paralelo a uma limitação por N pode ser explicada pelos seguintes processos: (1) armazenamento de P pelas células fitoplanctônicas, (2) regeneração interna de P, (3) uso de P orgânico dissolvido como fonte de P, e (4) sorção de P em superfícies celulares. Estes processos podem estar associados a um *consumo de luxúria* no qual uma parte do *pool* de P poder ser armazenado intracelularmente e em situações de limitação ou demanda por este nutriente ser metabolizado (Piehler *et al.*, 2004).

Este tipo de consumo pareceu ocorrer em nosso estudo, sendo particularmente sugestivo nas adições individualizadas de 0,5 e 5  $\mu\text{M PO}_4^{3-}$ . Isto é, nas condições P1 e P10 as concentrações de fósforo por unidade de clorofila aumentaram em relação à condição Ct<sub>10</sub> sem que houvesse, no entanto, aumentos proporcionais de biomassa fitoplanctônica. Como acima mencionado, parte da remoção do fósforo na água pode também ter sido relacionado a processos de sorção na superfície celular de organismos fitoplanctônicos. Individualmente ou coletivamente, estes processos podem explicar a não indicação de deficiência de P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.

### **5.3. Conexões com o sistema Lagoa de Cima**

Embora tenham sido reportadas indicações de deficiência de fósforo ao fitoplâncton da Lagoa de Cima (Pedrosa 1999, César, 2006) em função de razões elementares (N:P>22) (Healey & Hendzel, 1980) em amostras de material particulado em suspensão (MPS), estas não foram conclusivas. Isto é, a indicação de limitação de N ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima parece ser também consistente com algumas observações reportadas por estes mesmos autores (Pedrosa *et al.* 1999, César 2006) naquele ecossistema. Por exemplo, Pedrosa *et al.* (1999) verificaram em amostras de água ao longo do eixo de entrada e saída de águas da Lagoa de Cima um aumento de razões C:N ( $\mu\text{mol L}^{-1} (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1}$ ), de ~7 para ~18,5, e carboidratos:proteínas ( $\text{mg L}^{-1} (\text{mg L}^{-1})^{-1}$ ), de ~0,4 para ~2,5 no MPS, assim como um domínio de ~90% de *Cylindrospermopsis raciborskii* na comunidade fitoplanctônica. Estes resultados foram interpretados como indicadores de menor disponibilidade relativa de N e a um provável efeito limitante deste elemento no plâncton da Lagoa de Cima. Embora a deficiência em nitrogênio aumente a capacidade competitiva da *C. raciborskii*, estes são frequentemente relatados sem heterócitos nos reservatórios brasileiros com altas concentrações de amônio (Bouvy *et al.*, 2000). Entretanto, no estudo de Pedrosa *et al.* (comunicação pessoal) foi muito frequente a presença de heterócito em espécimes de *C. raciborskii*, o que contribuiu para a indicação de haver deficiência de nitrogênio no ecossistema da Lagoa de Cima.

No mesmo sentido, César (2006) sugeriu haver uma limitação de nitrogênio ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima em função de três metodologias independentes: (1) uso de razões C:N no MPS em associação à indexação de deficiência nutricional ao fitoplâncton proposta por Healey & Hendzel (1980), (2) verificação de correlações relativamente mais fortes entre N-total e clorofila do que entre P-total e clorofila e (3) relacionamento entre as concentrações de fosfato e nitrogênio inorgânico dissolvidos nas águas do rio Imbé e Lagoa de Cima e às constantes de semi-saturação ( $K_s$ ) (Reynolds, 1997) para estes nutrientes, assumidas como limitantes ao crescimento fitoplanctônico.

Siqueira (2006) verificou uma forte e significativa correlação positiva entre P-total e clorofila ao longo de um testemunho sedimentar coletado na região central da Lagoa de Cima e interpretou como sendo um indício de eutrofização por fósforo nesse ecossistema.

Schindler *et al.* (2008) em um estudo sobre eutrofização em lagos concluíram que a limitação por nitrogênio pode ser resultado de uma super fertilização por P. Desta forma, considerando os resultados de Siqueira (2006) e os apresentados neste estudo, é possível que o relativo enriquecimento de fósforo nos sedimentos da Lagoa de Cima tenha sido suficiente para ocasionar uma limitação por nitrogênio ao fitoplâncton no ecossistema. Além disso, vale mencionar que o nitrogênio pode ser perdido para a atmosfera por denitrificação e volatilização, respectivamente, na forma de  $N_2O/N_2$  e  $NH_3$  (Vitousek *et al.*; 1997), processos especialmente prováveis em sedimentos subóxicos/anóxicos de sistemas tropicais (Suttle & Harrison, 1988).

O índice de estado trófico de Carlson (IET) (1977) é amplamente utilizado na literatura mundial e permite avaliar o estado de enriquecimento nutricional experimentado por um ecossistema aquático. Do ponto de vista limnológico, o IET é um critério utilizado para se classificar a qualidade da água. Neste estudo, o IET foi calculado considerando-se as modificações de Toledo (1999) para sistemas tropicais a partir das concentrações médias de P-total (dados não mostrados) e de clorofila-a. No que se refere às águas da Lagoa de Cima sem enriquecimentos nutricionais ( $Ct_0$ ,  $Ct_{10}$ ), os IET variaram entre mesotrófico e eutrófico em função dos valores obtidos de clorofila-a e P-total, respectivamente (Tabela 17).

**Tabela 17.** Classificação do Estado Trófico segundo Índice de Carlson (1977) modificado por Toledo (1999). Valores de IET  $\leq 44$  caracterizam um estado oligotrófico;  $44 < \text{IET} \leq 54$  estado mesotrófico;  $54 < \text{IET} \leq 74$  estado eutrófico; e  $\text{IET} > 74$  estado hipereutrófico.

Condições	IET - Chl-a	Classificação IET		Classificação IET P-total
		Chl-a	IET - P-total	
Ct <sub>0</sub>	50	Mesotrófico	61	Eutrófico
Ct <sub>10</sub>	52	Mesotrófico	61	Eutrófico
N1	55	Eutrófico	64	Eutrófico
N10	59	Eutrófico	62	Eutrófico
P1	50	Mesotrófico	66	Eutrófico
P10	52	Mesotrófico	82	Hipereutrófico
N1P1	55	Eutrófico	63	Eutrófico
N1P10	56	Eutrófico	80	Hipereutrófico
N10P1	64	Eutrófico	67	Eutrófico
N10P10	72	Hipereutrófico	76	Hipereutrófico

Pode ser observado que as adições isoladas de  $\text{NO}_3^-$  e combinadas de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  modificaram os IET em relação à clorofila-a, de mesotrófico para eutrófico e hipereutrófico. O não estímulo de P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima foi, uma vez mais, evidenciado pela manutenção dos IET referentes à clorofila-a (mesotrófico) nas adições isoladas por este nutriente (Tabela 18). Em relação ao P-total, os IET aumentaram de eutrófico para hipereutrófico somente nas adições isoladas e combinadas de P10. Isto é, P1 (+0,5  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$ ) não levou a um aumento dos IET em relação aos controles. É interessante notar que as condições experimentais nas quais houve um mais claro excesso de fósforo, condições P1, P10 e N1P10, foi possível observar menores IET baseados em clorofila-a do que em P-total. Essa observação é comparável ao verificado para as condições controle, reforçando as indicações de um excesso de P no sistema da Lagoa de Cima. Consistentemente, as adições de N nas condições N1, N10, N1P1, N10P1 e N10P10 propiciaram IET equivalentes para clorofila-a e P-total, sugerindo maior equilíbrio nutricional N:P nestas condições. A tendência de limitação por N parece ser, coerentemente ao observado neste estudo, mais provável em sistemas aquáticos eutrofizados.

Dessa forma, aparentemente, para minimizar um aumento de biomassa fitoplanctônica na Lagoa de Cima, seria importante reconhecer e controlar as fontes de nitrogênio na área de estudo. Entretanto, o menor aporte de fósforo ao ecossistema pode representar um processo mais efetivo de oligotrofização

(Lewis & Wurtsbaugh, 2008), levando a uma possível diminuição da biomassa fitoplanctônica correntemente medida na Lagoa de Cima.

Em muitos lagos a produção de fitoplâncton anual é controlada pelo fósforo — e não pelo nitrogênio—, em parte porque a fixação de  $N_2$  por cianobactérias heterocíticas pode atenuar o déficit de N em relação ao déficit de P (Schindler, 1977). A ocorrência (César, 2006) e dominância (Pedrosa et al., 1999; Pedrosa, 1999) de *Cylindrospermopsis raciborskii* reportadas nas águas da Lagoa de Cima, na década de 90, pode ter sido uma consequência desta situação ambiental no ecossistema. Além disso, como encontrado no presente estudo, possíveis pulsos de nitrogênio poderão alterar o elemento limitante ao crescimento fitoplanctônico na Lagoa de Cima.

Nesse contexto, a regulação de biomassa fitoplanctônica é particularmente importante, visto que os processos de eutrofização são tipicamente associados a deteriorações da qualidade das águas naturais. Além disso, estes processos podem gerar algumas vezes a simplificação da estrutura trófica do ecossistema, favorecendo determinados grupos fitoplanctônicos em detrimento de outros, como por exemplo, os *blooms* de cianobactérias (Smith 2003; Doods, 2006), especialmente nas condições de limitação por nitrogênio.

As potenciais fontes de nutrientes para os ecossistemas aquáticos têm sido um tema recorrente em estudos limnológicos e oceanográficos, sendo de grande importância para a qualidade das águas e ciclos biogeoquímicos. Os principais fatores que alteram as condições ambientais de um corpo d'água são o clima, a hidrologia, as características do solo, a geomorfologia, a topografia, a cobertura do solo e os usos da terra. Em bacias hidrográficas não intensamente acometidas por esgotos domésticos não tratados, as atividades agrícolas constituem as principais fontes de nutrientes para os ecossistemas aquáticos (Howarth, 1996). Na Lagoa de Cima, assume-se que os processos de desmatamento e os consequentes usos da terra destinados à agricultura e pecuária estejam relacionados com o aumento de fósforo nos seus sedimentos ao longo dos últimos 50-70 anos (Siqueira, 2006).

A variação da razão N:P encontradas entre bacias hidrográficas devido aos diferentes usos da terra e fertilizantes pode ser refletida no transporte destes nutrientes para os corpos d'água a partir de escoamento, drenagem



subsuperficial e lixiviação. As variações N:P, por sua vez, afetam a proporção e disponibilidade relativa destes nutrientes nas águas naturais, com efeito limitante ou regulador, ora por N, ora por P, de produção primária. Estudos indicam que ecossistemas aquáticos localizados próximos a culturas de milho, soja e trigo tendem a apresentar alta razão N:P devido a utilização de fertilizantes com altas concentrações de nitrogênio e baixas concentrações de fósforo. Entretanto, corpos d' água localizados próximos a pastos utilizados principalmente para pecuária, tendem a apresentar baixa razão N:P (Downing e McCauley, 1992 ; Kosten *et al.*, 2009), devido ao estrume do gado ser relativamente rico em fósforo em relação aos outros nutrientes.

Esta relação é reforçada no estudo realizado por Arbuckle & Downing (2001) no qual 113 lagos situados em bacias de drenagem associadas a usos da terra > 30% referentes a pastagens apresentaram valores N:P abaixo do previsto por Redfield. Como anteriormente mencionado, essa situação nutricional torna os sistemas aquáticos mais suscetíveis a *blooms* de cianobactérias, as quais vale lembrar, muitas vezes, são produtoras de toxinas. Situação similar foi reportada por Havens *et al.* (2003), que em um estudo realizado em um lago subtropical encontraram que as concentrações de P aumentaram de 50 para 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (1,6 e 3,3  $\mu\text{M}$ ), de meados da década de 70 ao final da década de 90. Consequentemente, a razão N:P total diminuiu na água, favorecendo o crescimento de cianobactérias, as quais apresentaram uma contribuição ao biovolume total de 50-80%. Os autores concluíram que a baixa razão N:P e alta irradiância tenham sido fatores importantes para a formação dos *blooms* de cianobactérias fixadoras de  $\text{N}_2$ , em função desses organismos apresentarem vantagem competitiva em relação a outros organismos fitoplanctônicos não fixadores de  $\text{N}_2$ . De acordo com Marinho & Azevedo, (2007) e Soares *et al.* (2009), a reduzida razão N:P associada as cianobactérias poderia ser consequência das capacidades e assimilações individuais de N e P destes organismos. Segundo Carpenter (2008), os *blooms* de cianobactérias são os resultados mais severos da eutrofização.

Na Lagoa de Cima já é possível observar que os impactos de origens antrópicas nas últimas décadas têm causado modificações na estrutura deste ecossistema como reportados por Pedrosa, César e Siqueira. Como mencionado, estas modificações incluem eutrofização por P e registros de

ocorrência e dominância de *C. raciborskii* nos estudos realizados por aqueles autores. Coerentemente, no presente estudo, houve indicação de limitação de nitrogênio ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima. Desta forma, medidas de manejo que visem uma diminuição da entrada de fósforo à Lagoa de Cima são consideradas importantes para a conservação deste sistema. De fato, algumas possíveis deteriorações ambientais causadas pelos processos de eutrofização, especialmente por fósforo, reforçam a importância deste tema para a estrutura e funcionamento dos sistemas aquáticos interiores (Smith *et al.*, 1999; Carpenter, 2008):

- a) Aumento de biomassa fitoplanctônica e de perifíton;
- b) Mudança na composição de espécies para táxons que podem ser tóxicos e não palatáveis (exemplo: *blooms* de cianobactérias);
- c) Mudanças na produção, biomassa e composição de espécies de plantas vasculares;
- d) Redução da claridade da água;
- e) Diminuição do valor estético do corpo d'água;
- f) Problemas com o sabor e odor da água;
- g) Aumento de riscos à saúde de pessoas e animais que utilizam diretamente a água;
- h) Elevação excessiva dos valores de pH e depleção de O<sub>2</sub> dissolvido na coluna d'água;
- i) Aumento na produção de peixes, mas acompanhada de uma maior probabilidade de morte da ictiofauna;
- j) Mudança na composição de espécies de peixes para espécies menos desejáveis.

#### **5.4. Razão ótima de diminuição N:P**

A razão N:P de 16:1 verificada por Redfield (1958) tem sido sugerida como razão ótima para o crescimento fitoplanctônico. Desvios nessa razão têm sido utilizados como indicação de limitação nutricional. Entretanto, a razão de Redfield é somente uma média da razão ótima para a comunidade fitoplanctônica, não abrangendo desta forma as diferenças que ocorrem entre as espécies em relação aos nutrientes, como por exemplo, a cinética e as

estratégias de captação, assimilação e capacidade de estocar, e também diferentes requerimentos de nutrientes, bem como diferentes composições celulares de N e P (Hecky & Kilham, 1988; Lagus *et al.*, 2004).

Alguns estudos indicam diferentes razões N:P ótimas para algumas espécies fitoplanctônicas. Por exemplo, em um extremo de razão N:P abaixo do previsto por Redfield estão a *Aulacoseira sp.* (Bacillariophyceae), *Microcystis sp.* e *Synedra ulna* (Cyanobacteria) que apresentam razão N:P  $\leq 10$ . No outro extremo, acima da razão de 16:1 encontra-se a espécie *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) que apresenta razão N:P de 87:1 (Hecky & Kilham, 1988). Além disso, vale dizer que a razão N:P ótima ao crescimento espécie-específica pode variar também devido à diferentes fatores como por exemplo, a taxa de crescimento, temperatura, luz e concentração de nutrientes. Muito provavelmente, essas variações também observadas no presente estudo, contribuem para dinamizar as relações estequiométricas N:P com efeito sobre o crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.

Embora não descrito neste estudo, amostras de fitoplâncton associadas às diferentes condições experimentais foram separadas e fixadas para uma posterior e mais aprofundada análise da comunidade. Preliminarmente, algumas observações foram percebidas. Por exemplo, foi possível perceber uma maior densidade de cianobactérias (ex. *Microcystis sp.*) nas situações controle, reforçando um provável efeito da limitação de N no ecossistema Lagoa de Cima, e, como mencionado acima, provavelmente, um menor requerimento N:P em relação à razão de Redfield na constituição de sua biomassa.

Apesar de todos os nossos resultados e interpretações serem referenciados em função das respostas de biomassa fitoplanctônica (clorofila-a), é importante ressaltar que os bioensaios foram realizados com amostras de água bruta da Lagoa de Cima, havendo, desta forma, a possibilidade de certa influência microbiana (ex. bactérias, fungos) nos sistemas investigados. Nesse sentido, vale pontuar algumas observações. Estudos têm indicado que os crescimentos de bactérias podem ser estimulados e limitados por N e P, e que estes também podem competir com os organismos fitoplanctônicos por estes nutrientes. As bactérias tem apresentado razão N:P muito variável mas com valores bem abaixo do previsto por Redfield para plâncton marinho

(Chrzanowskil *et al.*, 1996; Brett *et al.*, 1999). Além disso, semelhantemente aos organismos fitoplanctônicos, as bactérias podem estocar P quando este está em excesso no meio (Vrede, 1998). Não se pode descartar, portanto, a possibilidade da flora microbiana ter tido algum papel ou influência na baixa razão de diminuição ótima  $[\text{NO}_3^- + \text{NH}_3 + \text{NH}_4^+]:[\text{PO}_4^{3-}]$  encontrada neste estudo, de 5,5:1. Desta forma, técnicas complementares para determinar — ou eliminar, via uso de antibióticos específicos — a flora bacteriana, além da realização de análises elementares de C:N:P no MPS devem ser consideradas para minimizar as incertezas geradas neste estudo.

Outra hipótese que poderia explicar a baixa razão 5,5:1 se refere à possibilidade da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Cima ter sofrido um ajuste fisiológico por aclimatação ou mesmo adaptação à limitação de N, compatibilizando baixos fluxos N:P, cerca de três vezes menores do que a razão de Redfield, com possíveis reflexos na constituição de sua biomassa (não investigada neste estudo).

Seja como for, independentemente da composição da biota presente nos bioensaios, a resposta de variação da biomassa fitoplanctônica, e as indicações geradas de deficiência nutricional por N à comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Cima foram evidentes neste estudo.

## 6. Conclusões

- O desenho experimental e a abordagem metodológica empregadas neste estudo foram sensíveis para responder as questões elaboradas sobre suficiência/deficiência nutricional de N e P ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima.
- O nitrogênio foi o nutriente limitante ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima durante os dois períodos de estudo realizados, pois a adição de nitrogênio isoladamente induziu, tanto em baixa, quanto em alta concentração, algum estímulo ao crescimento fitoplanctônico, enquanto as adições isoladas de fósforo não.
- Embora a importância do nitrogênio seja evidente, não se pode descartar o valor agregado do fósforo sobre o aumento da biomassa fitoplanctônica nas adições combinadas realizadas.
- No presente estudo, o nitrogênio foi o elemento limitante ao crescimento fitoplanctônico da Lagoa de Cima; entretanto, secundariamente, os resultados mostraram que o fósforo também pode se tornar o elemento limitante em função do aumento de nitrogênio no meio.

## 7. Referências bibliográficas

Andersson, A., Haecky, P. & Hagström, Å. (1994) Effect of temperature and light on the growth of micro-, nano-, and pico-plankton: impact on algal succession. *Marine Biology* 120: 511–520.

Antia, N., Harrison P., & Oliveira L. (1991) The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology, and ecology. *Phycologia* 30:1–89.

Arbuckle, K.E. & Downing, J.A. (2001) The influence of watershed land use on lake N: P in a predominantly agricultural Landscape. *Limnol. Oceanogr.* 46(4): 970–975.

Arcifa, M.S., Starling, F.R.L., Sipaúba-Tavares, L.H., Lazzaro, X. (1995) Experimental limnology. In: Tundisi, J. G., Bicudo, C.E.M., Tundisi, T.M. (Eds.). *Limnology in Brazil*. ABC/SBL. p.257-281.

Beardall, J., Young, E., & Roberts, S. (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquat. Sci.* 63:44–69.

Bennett, E.M., Carpenter S.R., & Caraco N.F. (2001) Human impact on erodable phosphorus and eutrophication: a global perspective. *BioScience*. 51:227–234.

Bergström, A.K, Jansson, M. (2006) Atmospheric nitrogen deposition has caused nitrogen enrichment and eutrophication of lakes in the northern hemisphere. *Glob. Change Biol.* 12:635–643.

Bothwell, M.L. (1985) Phosphorus limitation of lotic periphyton growth rates: An intersite comparison using continuous-flow troughs (Thompson River system, British Columbia). *Limnol. Oceanogr.* 30: 527–542.

Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M. & Moura, A. (2000) Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquat. Microb. Ecol.* 23:13–27.

Bozelli, R.L & Huszar, V.L.M. (2003) Comunidades fito e zooplanctônicas continentais em tempo de avaliação. Publicação da Sociedade Brasileira de Limnologia. Maio de 2003 p.6.

Brett, M.T., Lubnow, F.S., Villar-Argaiz, M., Müller-Solger, A. & Goldman, C. R. (1999) Nutrient control of bacterioplankton and phytoplankton dynamics. *Aquatic Ecology* 33(2):135-145.

Campbell, N.A. (1990) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems Biology (2<sup>nd</sup> edition), The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City (CA).

Carlson, R.E. (1977) A trophic state index for lakes. *Limnol. Oceanogr.* 22: 361-80.

Carmouze, J.P. (1994) Metabolismos dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: Edgard Blucher/Fapesp, p.254.

Carpenter, S.R. (2008) Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication. *PNAS*, 105 (32) 11039-11040; published ahead of print August 6.

Cermeno, P., Maranon, E., Perez, V., Serret, P., Fernandez, E., Castro, C. & César J. (2006) Fitoplâncton da Lagoa de Cima (Campos dos Goytacazes, RJ): dinâmica e relação com fatores ambientais. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Chrzanowskil, T.H., Kyle, M., Elser, J.J. & Sterner, R.W. (1996) Element ratios and growth dynamics of bacteria in an oligotrophic. *Canadian shield lake* 11:119-125.

Correll, D.L. (1998) The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *J. Environ. Qual.* 27:261-266.

Devol, A.H. (2003). Solution to a marine mystery. *Nature* 422: 575–576.

Dodds, W.K. (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnol. Oceanogr.* 51(1, part 2), 671–680.

Dortch, Q. & Whiteledge, T.E. (1992) Does nitrogen or silicon limit phytoplankton production in the Mississippi river plume and nearby regions? *Continental Shelf Research* 12: 1293-1309.

Downing, J.A. & McCauley, E. (1992) The nitrogen:phosphorus relationship in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 37: 936–945.

Downs, T.M., Schallenberg, M. & Burns, C.W. (2008) Responses of lake phytoplankton to micronutrient enrichment: a study in two New Zealand lakes and an analysis of published data. *Biomedical and Life Sciences Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, volume 70, n°4, 347-360.

Elser, J.J. & Hassett, R.P. (1994) A stoichiometric analysis of the zooplankton–phytoplankton interaction in marine and freshwater ecosystems. *Nature* 370: 211–213.

Elser, J.J., Bracken, M.E.S., Cleland, E.E., Gruner, D.S., Harpole, W.S., Hillebrand, H., Ngai, J.T., Seabloom, E.W., Shurin, J.B., & Smith, J.E. (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 10: 1135–1142.

Elser, J.J., Andersen, T., Baron, J.S., Bergström, A-K., Jansson, M., Kyle, M., Nydick, K.R., Steger, L. & Hessen, D.O. (2009) Shifts in Lake N:P Stoichiometry and Nutrient Limitation Driven by Atmospheric Nitrogen Deposition. *Science* 326: 835.



Elser, J.J., Marzolf, E.R. & Goldman, C.R. (1990) Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: a review and critique of experimental enrichment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47: 1468-77.

Esteves, F.A. (1998) Fundamentos de Limnologia. 2. ed. Rio de Janeiro. Interciência p. 316-373.

Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J. (2000) The global carbon cycle: a test of our knowledge of Earth as a system. *Science* 290: 291–296.

Falkowski, P.G. & Raven, J.A. (2006) Environmental Pollution Volume 102, Issue 1, Supplement 1, 1998, Pages 15-24. *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press, Princeton.

Falkowski, P.G. (2000) Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *J. Phycol.* 36: 3–6.

Farjalla, V.F., Faria, B.M. & Esteves, F.A. (2002) The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. *Archiv für Hydrobiologie*, 156:97-119.

Filippelli, G.M. (2008) The Global Phosphorus Cycle: Past, Present, and Future. *Elements Mineralogical Society of America*; v. 4; n°. 2; p. 89-95.

Finkel, Z.V., Beardall, J., Flynn, K. J., Quigg, A., Rees, T.A.V. & Raven, J.A. (2010) Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research* 32 (1): 119–137.

Fisher, T.R., Melack, Grobelaar, J.U., Howarth, R.W. (1999) Nutrient limitation of phytoplankton and eutrophication of inland, estuarine and marine waters. In: Francoeur, S.N. (2001) Meta-analysis of lotic nutrient amendment experiments: detecting and quantifying subtle responses. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 20, 358–368.

Galloway, J.N. (1998) The global nitrogen-cycle: Changes and consequences. The Netherlands. Elsevier, Amsterdam. pp. 15-24.

Galloway, J.N. & Cowling, E.B (2002) Nitrogen and the world. *Ambio* 31: 64–71.

Goldman, J.C., McCarthy, J.J. & Peavey, D.G. (1979) Growth-rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature* 279: 210–215.

Galloway, J., Dentener, F. Burke, M., Dumont, E., Bouwman, A.F., Kohn A.R., Mooney, A.H., Seitzinger, S. & Kroeze, C. (2010) The impact of animal production systems on the nitrogen cycle. *Livestock in a Changing Landscape*, Volume 1: Drivers, Consequences, and responses, p. 83.

Harrison, R.B., Turner, N.S., Hoyle, J.A., Krejs, L.J., Tone, D.D., Henry, C.L., Isaksen, P.J., & Xue, D. (1999) Treatment of Septic Effluent for Fecal Coliform and Nitrogen in Coarse-textured Soils: Use of Soil-only and Sand Filter Systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, Volume 124, n° 1-2, 205-215.

Havens, K.E., James, R.T., East, T.L., Smith, V.W. (2003) N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution* 122: 379–390.

Healey, F.P. & Hendzel, L.L. (1980) Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Aquat. Sci.* 37:442-453.

Hecky, R.E., & Kilham, P. (1988) Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol. Oceanogr.* 33:796–822.

Hecky, E., Campbell, P., Hendzel, L.L. (1993) The Stoichiometry of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Particulate Matter of Lakes and Oceans. *Limnol. Oceanogr.* 38 (4): 709-724.

Hillebrand, H., & Sommer, U. (1997) Response of epilithic microphytobenthos of the Western Baltic Sea to in situ experiments with nutrient enrichment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 160: 35–46.

Hongve, D. (1994). Nutrient metabolism (C, N, P, and Si) in the trophogenic zone of a meromictic lake. *Hydrobiologia*, 277: 17-39.

Howarth, R.W. & Others (1996) Regional nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to North Atlantic Ocean: Natural and human influences. *Biogeochemistry* 35: 75–139.

Howarth, R.W., Marino, R. & Cole, J.J. (1988) Nitrogen fixation in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. 2. Biogeochemical controls. *Limnol. Oceanogr.* 33:688–701.

Huszar, V.L.M., Silva L.H.S. & Nogueira, I.S. (1987) Fitoplâncton de rede da Lagoa de Cima, Campos (Rio de Janeiro, Brasil): uma contribuição a seu conhecimento. *Neritica* 2 (supl.): 75 – 104.

Huszar, V.L.M. & Esteves, F.A. (1988). Considerações sobre o fitoplâncton de rede de 14 lagoas costeiras D Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Limnológica Brasileira* 2, p. 323-345.

Huszar, V.L.M. & Silva, L.H.S. (1992). Comunidades fitoplanctônicas de quatro lagoas costeiras do norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Limnológica Brasileira* 4:291-314.

James, C., Fisher, J. & Moss, B. (2003) Nitrogen driven lakes: The Shropshire and Cheshire Meres? *Archiv für Hydrobiologie* 158: 249–266.

Jeffrey, S.W. & Humphrey, G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167:191-194.

Karlsson, J., Bystro, P., Ask, J., Ask, P., Persson, L., & Jansson, M. (2009) Light limitation of nutrient-poor lake ecosystems. *Letters* Vol. 460, 23.

Kilham, S.S. (1990) Relationship of phytoplankton and nutrients to stoichiometric measures, p. 403-414. In Tilzer, M.M. & Serruya, C. [eds.], *Large lakes: Ecological structure and function*. Springer.

Kosten, S., Huszar, V.L.M., Mazzeo, N., Scheffer, M., Sternberg, L.S.L. & Jeppesen, E. (2009) Lake and watershed characteristics rather than climate influence nutrient limitation in shallow lakes. *Ecological Applications*, 19(7), pp. 1791–1804.

Lagus, A., Suomela, J., Weithoff, G., Heikkila, K., Helminen, H. & Sipura, J. (2004) Species-specific differences in phytoplankton responses to N and P enrichments and the N:P ratio in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea. *Journal of Plankton Research*. 26 (7): 79–798.

Lagus, A., Suomela, J., Helminen, H., & Sipura, J. (2007) Impacts of nutrient enrichment and sediment on phytoplankton community structure in the Northern Baltic Sea. *Hydrobiologia*, 579: 361-378.

Levine, M.A. & Whalen, S.C. (2001) Nutrient limitation of phytoplankton production in Alaskan Arctic foothill lakes. *Hydrobiologia* 455: 189–201.

Lewis, W. M. Jr.; Wurtsbaugh, W. A. (2008) Control of Lacustrine Phytoplankton by Nutrients: Erosion of the Phosphorus Paradigm. *International Review of Hydrobiology* 93 (4-5) 446–465.

Marinho, M.M. & Azevedo, S.M.F.O. (2007) Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*. *Aquatic Ecology* 41: 525–533.

McArthur, J.V. (2006) Environmental Microbiology. Academic Press, San Diego  
Microbial Ecology: An evolutionary approach. Elsevier Academic Press.

Meybeck, M. (1993). C, N, P and S in rivers: from sources to global inputs. in Interactions C, N P, and S. *Biogeochemical Cycles and Global*, 163-193.

Moreno, M.M., Nascimento, M.T. & Kurtz, B.C. (2003) Estrutura e composição florística do estrato arbóreo em duas zonas altitudinais na Mata Atlântica de encosta da região do Imbé, RJ. *Acta Bot. Brás.*, vol.17:3.

Pedrosa, P. (1999) Padrões de comportamento espaço-temporal do meio líquido da Lagoa de Cima (Campos, RJ): aspectos físicos , tróficos, metabolismo e organização sistêmica. Tese (doutorado). Centro de Bociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Laboratório de Ciências Ambientais, pp. 12 - 15.

Philps, E.J., Badylak, S., Grosskopf, T. (2002) Factors affecting the abundance of phytoplankton in a restricted subtropical lagoon, the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 55, p.385-402.

Piehler, M.F., Twomey, L.J., Hall, N.S., & Paerl, H.W. (2004) Impacts of inorganic nutrient enrichment on phytoplankton community structure and function in Pamlico Sound, NC, USA. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 61-197 e 209.

PRO\_AGRO (1975) Estudo das possibilidades da Lagoa de Cima. Fundação Norte Fluminense de Desenvolvimento Regional. p. 36.

Rabalais, N.N. (2002) Nitrogen in aquatic ecosystems, *Ambio* 31:102-112.

Redfield, A.C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am. Sci.* 46: 205-222.

Redfield, A.C., Ketchum, B.H. & Richards, F.A. (1963): The influence of organisms on the composition of seawater. In M.N. Hill (Ed.), *The Sea*. Vol. 2. New York 1963, p. 26-77.

Ren, L., Rabalais, N.N., Turner, R.E., Morrison, W. & Mendenhall, W. (2009) Nutrient Limitation on Phytoplankton Growth in the Upper Barataria Basin, Louisiana: Microcosm Bioassays. *Estuaries and Coasts* 32:958–974.

Reynolds, C.S. (1997) Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory Institute, Germany. pp. 371.

Reynolds, C.S. (2006) Ecology of Phytoplankton. Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge University Press. pp.3-20.

Rezende, C.E., Ovalle, Á.R.C., Pedrosa, P., Nascimento, M.T., Suzuki, M.S., Miranda C.R., Monteiro L. R., Pedlowski, M.A., Mazurec A. P., Erbesdobler E. & Kristosch, G.C. (2006) *Diagnóstico Ambiental da Área de Proteção Ambiental da Lagoa de Cima*. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Ridley, B.A., Dye, J. E., Walega, J. G., Zheng, J., Grahek, F.E. & Rison, W. (1996) On the production of active nitrogen by thunderstorms over New Mexico, *J. Geophys. Res.*, 101(D15), 20,985–21,005.

Schindler, D.W. (1977) Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195:260–62.

Schindler, D.W., Hecky, R. E., Findlay, D.L, Stainton, M.P., Parker, B.R., Paterson, M.J., Beaty, K.G, Lyng, M.& Kasian S.E.M (2008) Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *PNAS* 105 (32):11254–11258. [www.pnas.org](http://www.pnas.org).

Scholefield, D., Lockyer, D.R., Whitehead, D.C. & Tyson, K.C. (1991) A model to predict transformations and losses of nitrogen in UK pastures grazed by beef cattle. *Plant and Soil*, Volume 132, Number 2, 165-177.

Scott, J.T., McCarthy, M.J., Gardner, W.S. & Doyle, R.D. (2008) Denitrification, dissimilatory nitrate reduction to ammonium, and nitrogen fixation along a nitrate concentration gradient in a created freshwater wetland *Biogeochemistry*, Volume 87, n° 1, 99-111.

SEMADS – Secretaria do Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (2002) Lagoas do Norte Fluminense: Perfil Ambiental. Projeto PLANÁGUA SEMADS / CTZ de Coordenação Técnica Brasil – Alemanha.

Siqueira, E.S. (2006) Indicações de eutrofização por fósforo em um sistema fluvio-lacustre na região Norte do Rio de Janeiro. Monografia (Centro de Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense p.21-28.

Smith, V.H. (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems. A global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10:126–139.

Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. (1999) Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 100:179±196.

Soares, M.C.S, de A Rocha, M.I., Marinho, M.M, Azevedo, S.M.F.O., Branco, C.W.C., Huszar, V.H.M. (2009) Changes in species composition during annual cyanobacterial dominance in a tropical reservoir: physical factors, nutrients and grazing effects. *Aquatic Microbial Ecology* 57:137-149.

Sommer, U. (1990) The role of competition for resources in phytoplankton succession. *Plankton ecology: Succession in plankton communities*, p. 57-106 Springer.

StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.  
www.statsoft.com

Stelzer, R.S. & Lamberti, G.A. (2001) Effects of N: P ratio and total nutrient concentration on stream periphyton community structure, biomass, and elemental composition. *Limnol. Oceanogr.*, 46(2): 356–367.

Sterner, R.W. (2008) On the Phosphorus Limitation Paradigm for Lakes. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 93: 433–445.

Sterner, R.W., Elser, J.J. (2002) Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere (Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 2002).

Sterner, R.W., Andersen, T., Elser, J.J., Hessen, D. O., Hood, J.M., McCauley, E., Urabe, J. (2008) Scale-dependent carbon : nitrogen : phosphorus seston stoichiometry in marine and freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 53(3): 1169–1180.

Solorzano, L. (1969) Determination of ammonia in natural water by phenylhypoclorite method. *Limnol. Oceanogr.* 14: 799-801.

Suttle, C.A. & Harrison P.J. (1988) Ammonium and phosphate uptake rates, N : P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes. *Limnol. Oceanogr.* 33(2), 1988, 1864-202.

Sylvan, J.B., Dortch, Q., Nelson, D.M., Brown, A.F.M., Morrison, W. & Ammerman, J.W. (2006) Phosphorus limits phytoplankton growth on the Louisiana shelf during the period of hypoxia formation. *Environmental Science and Technology* 40: 7548–7553.

Tiessen, T. (2008) Phosphorus in the global environment. The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions. *Plant Ecophysiology* 7:1-7.



Toledo, J.T. (1999) Utilização do índice de qualidade de águas (IAQ-CETESB) e do índice de estado trófico (IET-Carlson) para classificar a qualidade das águas da lagoa do Taquaral–Campinas–SP. Disponível em: [www.unicamp.br](http://www.unicamp.br).

Trimmer, M. & Nicholls, J.C. (2009) Production of nitrogen gas via anammox and denitrification in intact sediment cores along a continental shelf to slope transect in the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.*, 54(2), 2009, 577–589. University Press. New York.

Valderrama, J.C. (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and phosphorus in natural waters. *Mar.Chem.*, 10: 109-122.

Vidal, M., Duarte, C.M., Agusti, S., Gasol, J.M. & Vaque, D. (2003) Alkaline phosphatase activities in the central Atlantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262: 43–53.

Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, D.G. (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications* 7:737–750.

Vrede, T. (1998) Elemental composition (C:N:P) and growth rates of bacteria and *Rhodomonas* grazed by *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* Vol.20 no.3 pp.455-470.

Wetzel, R.G. (1965) Nutritional aspect of algal productivity in Marl Lakes with particular reference to enrichment bioassays and their interpretation. Primary productivity in aquatic environments. p137. University of California Press. Edited by Charles R. Goldman.

Wetzel, R.G. (2001) Limnology (3rd edition), Academic Press, New York.

Wollenweider, R. A. & Kerekes, J. (1980) The loading concept as basis for controlling eutrophication philosophy and preliminary results of OECD programme on eutrophication. *Prog. Wat. Technol.*, 12: 5-38.

Xu, S., Song, J., Li, X., Yuan, H., Li, N., Duan, L., Sun, P. (2010) Changes in nitrogen and phosphorus and their effects on phytoplankton in the Bohai Sea. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28(4): 945-952.

<http://www.campuslm.ufrj.br/>

## 8. Apêndice

### 8.1. Clorofila-a

Tabela A-1: Valores médios de clorofila-a total em  $\mu\text{g/L}^{-1}$ , dos seis experimentos referentes ao período úmido, em cada condição proposta.

	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	Ex.6	Média	Desvio Padrão
<b>Ct<sub>0</sub></b>	8,5	11,9	12,2	7,7	7	9,4	9,5	2,2
<b>Ct<sub>10</sub></b>	7	15	12	20	15	19	14,7	4,8
<b>N1</b>	12,8	19,6	13,7	23,4	14,8	10,8	15,9	4,7
<b>N10</b>	27,2	27,7	19,2	35	24,3	16,6	25,0	6,6
<b>P1</b>	12	14	11	17	11	10	12,5	2,6
<b>P10</b>	9,1	10,1	13,8	18,7	8,6	12,5	12,1	3,8
<b>N1P1</b>	17,1	25,9	19,9	23,4	10,1	9,3	17,6	6,8
<b>N1P10</b>	12,9	18,7	16,8	31,6	22,9	26,6	21,6	6,8
<b>N10P1</b>	65,3	76,5	31,3	39,2	10,7	31,4	42,4	24,3
<b>N10P10</b>	72,1	133,1	39,8	56,5	31,8	33,6	61,2	38,5

Tabela A-2: Valores médios de clorofila-a total em  $\mu\text{g/L}^{-1}$ , dos seis experimentos realizados no período seco, em cada condição proposta.

	Ex.7	Ex.8	Ex.9	Ex.10	Ex.11	Ex.12	Média	Desvio Padrão
<b>Ct<sub>0</sub></b>	11,5	13,3	15,7	11,7	12,4	12,1	12,8	1,6
<b>Ct<sub>10</sub></b>	12,0	13,0	26,1	7,7	9,1	19,2	14,5	6,9
<b>N1</b>	12,9	22,7	35,0	16,4	14,8	27,2	21,5	8,5
<b>N10</b>	35,1	34,0	38,8	30,5	27,9	23,7	31,7	5,4
<b>P1</b>	9,4	11,2	19,2	5,9	5,8	14,4	11,0	5,2
<b>P10</b>	18,0	14,8	32,6	11,1	8,9	12,9	16,4	8,5
<b>N1P1</b>	16,5	28,2	23,7	11,5	12,8	23,9	19,4	6,8
<b>N1P10</b>	15,7	29,9	27,5	11,4	17,1	26,3	21,3	7,5
<b>N10P1</b>	59,1	66,0	66,4	38,8	43,0	56,2	54,9	11,6
<b>N10P10</b>	199,7	210,3	218,0	84,0	98,6	110,5	153,5	62,0

## 8.2. Nitrato

Tabela A-3: Valores médios e desvio padrão das concentrações de nitrato, para cada condição experimental em  $\mu\text{M}$ , dos seis experimentos realizados no período úmido.

<b>Nitrato</b>	<b>Ex.1</b>	<b>Ex.2</b>	<b>Ex.3</b>	<b>Ex.4</b>	<b>Ex.5</b>	<b>Ex.6</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Ct<sub>0</sub></b>	7,1	10,0	3,5	4,3	4,0	8,5	6,2	2,7
<b>Ct<sub>10</sub></b>	4,8	1,4	1,8	1,4	1,0	0,9	1,9	1,5
<b>N1</b>	1,3	1,0	0,6	2,1	5,7	0,6	1,9	2,0
<b>N10</b>	55,0	51,2	51,2	51,8	44,6	53,2	51,2	3,5
<b>P1</b>	1,4	1,5	1,1	3,4	1,6	1,1	1,7	0,8
<b>P10</b>	0,9	1,4	0,5	0,9	0,7	0,5	0,8	0,3
<b>N1P1</b>	0,9	0,9	0,8	0,9	0,5	0,4	0,7	0,2
<b>N1P10</b>	2,1	1,1	0,8	1,0	0,8	0,6	1,1	0,5
<b>N10P1</b>	32,1	26,2	34,8	42,4	43,2	52,3	38,5	9,3
<b>N10P10</b>	1,3	1,2	0,8	1,9	23,4	1,5	5,0	9,0

Tabela A-4: Valores médios e desvio padrão das concentrações de nitrato, para cada condição experimental em  $\mu\text{M}$ , dos seis experimentos realizados no período seco.

<b>Nitrato</b>	<b>Ex.7</b>	<b>Ex.8</b>	<b>Ex.9</b>	<b>Ex.10</b>	<b>Ex.11</b>	<b>Ex.12</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Ct<sub>0</sub></b>	7,3	0,4	1,7	5,7	7,1	6,9	4,8	3,0
<b>Ct<sub>10</sub></b>	0,4	0,2	18,0	1,2	0,9	1,0	3,6	7,1
<b>N1</b>	0,9	1,1	1,6	0,7	0,5	4,5	1,5	1,5
<b>N10</b>	60,5	75,6	78,7	62,8	47,8	88,6	69,0	14,7
<b>P1</b>	0,7	1,2	1,5	5,0	1,2	2,3	2,0	1,6
<b>P10</b>	0,0	0,8	0,4	0,4	0,3	0,1	0,4	0,3
<b>N1P1</b>	0,4	3,3	0,3	0,4	0,8	0,1	0,9	1,2
<b>N1P10</b>	0,2	0,1	0,1	0,0	3,9	0,3	0,8	1,5
<b>N10P1</b>	47,6	63,3	47,5	24,2	43,9	23,1	41,6	15,5
<b>N10P10</b>	0,6	14,5	3,4	1,0	0,9	1,6	3,7	5,4

### 8.3. Ortofosfato

Tabela A-5: Valores médios e desvio padrão das concentrações de ortofosfato, para cada condição em  $\mu\text{M}$ , dos seis experimentos realizados no período úmido.

<b>Cromatógrafo</b>	<b>Ex.1</b>	<b>Ex.2</b>	<b>Ex.3</b>	<b>Ex.4</b>	<b>Ex.5</b>	<b>Ex.6</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Ct0</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ct10</b>	0,17	-	0,17	0,18	-	-	0,09	0,1
<b>N1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>N10</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P1</b>	-	0,14	-	-	-	0,20	0,06	0,1
<b>P10</b>	1,43	1,35	1,43	1,37	1,83	0,65	1,34	0,4
<b>N1P1</b>	0,20	-	0,20	-	-	-	0,07	0,1
<b>N1P10</b>	1,18	0,75	1,18	0,94	1,08	0,84	0,99	0,2
<b>N10P1</b>	0,14	0,14	0,14	-	-	-	0,07	0,1
<b>N10P10</b>	0,16	0,30	0,16	-	0,66	-	0,21	0,2

Legenda: (-): não detectado

Tabela A-6: Valores médios desvio padrão das concentrações de ortofosfato, para cada condição em  $\mu\text{M}$ , dos seis experimentos realizados no período seco.

<b>Cromatógrafo</b>	<b>Ex.7</b>	<b>Ex.8</b>	<b>Ex.9</b>	<b>Ex.10</b>	<b>Ex.11</b>	<b>Ex.12</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Ct0</b>	0,11	0,05	-	-	-	-	0,08	0,0
<b>Ct10</b>	0,03	-	0,17	-	-	-	0,10	0,1
<b>N1</b>	0,73	0,07	-	-	-	-	0,40	0,5
<b>N10</b>	0,03	-	-	-	-	-	0,03	-
<b>P1</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>P10</b>	2,01	2,90	1,43	0,74	1,62	0,92	1,60	0,8
<b>N1P1</b>	-	0,07	0,20	-	-	-	0,13	0,1
<b>N1P10</b>	1,64	1,87	1,18	1,19	0,95	0,20	1,17	0,6
<b>N10P1</b>	0,16	0,05	0,14	-	-	-	0,12	0,1
<b>N10P10</b>	0,17	0,20	0,16	-	-	0,01	0,14	0,1

Legenda: (-): não detectado

#### 8.4. Fósforo Particulado

Tabela A-7: Valores médios de fósforo particulado, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período úmido, em  $\mu\text{M}$ .

<i>PP</i>	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	Ex.6	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,3	0,5	0,2
<b>Ct10</b>	1,1	0,7	0,3	0,5	0,5	0,3	0,6	0,3
<b>N1</b>	0,9	0,9	0,6	0,5	0,4	0,2	0,6	0,3
<b>N10</b>	1,0	0,6	0,3	0,4	0,3	0,1	0,4	0,3
<b>P1</b>	1,1	1,0	0,7	0,5	0,3	0,3	0,7	0,3
<b>P10</b>	2,5	1,9	1,9	1,3	0,7	0,8	1,5	0,7
<b>N1P1</b>	1,1	1,0	0,7	0,4	0,3	0,2	0,6	0,4
<b>N1P10</b>	2,6	2,2	1,6	1,3	0,6	0,8	1,5	0,8
<b>N10P1</b>	1,6	2,0	0,5	0,4	0,3	0,3	0,9	0,7
<b>N10P10</b>	2,0	1,5	1,2	1,0	0,8	0,8	1,2	0,5

Tabela A-8: Valores de fósforo particulado, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período seco, em  $\mu\text{M}$ .

<i>PP</i>	Ex.7	Ex.8	Ex.9	Ex.10	Ex.11	Ex.12	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	0,2	0,4	0,5	0,6	0,5	0,4	0,4	0,1
<b>Ct10</b>	0,6	0,6	0,7	0,4	0,7	0,4	0,6	0,1
<b>N1</b>	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,5	0,7	0,1
<b>N10</b>	0,5	0,8	1,1	0,8	0,6	0,5	0,7	0,2
<b>P1</b>	0,7	0,9	1,2	1,2	0,4	0,6	0,8	0,3
<b>P10</b>	1,7	2,2	3,4	2,5	1,4	1,7	2,2	0,7
<b>N1P1</b>	0,6	1,1	1,1	0,5	1,1	0,9	0,9	0,3
<b>N1P10</b>	1,1	2,3	2,6	1,1	2,3	2,5	2,0	0,7
<b>N10P1</b>	0,6	0,8	1,1	0,4	0,6	1,0	0,8	0,3
<b>N10P10</b>	2,7	3,9	3,9	2,2	3,9	2,5	3,2	0,8

#### 8.5. Fósforo Particulado/ Clorofila-a

Tabela A-9: Valores de P-particulado/Chl-a, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período úmido, em  $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ .

P-particulado/Chl-a	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	Ex.6	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	0,07	0,04	0,03	0,05	0,10	0,03	0,05	0,03
<b>Ct10</b>	0,16	0,04	0,03	0,02	0,03	0,01	0,05	0,06
<b>N1</b>	0,07	0,04	0,05	0,02	0,03	0,02	0,04	0,02
<b>N10</b>	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
<b>P1</b>	0,09	0,07	0,06	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03
<b>P10</b>	0,28	0,19	0,14	0,07	0,08	0,06	0,14	0,09
<b>N1P1</b>	0,07	0,04	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02
<b>N1P10</b>	0,20	0,12	0,10	0,04	0,03	0,03	0,08	0,07
<b>N10P1</b>	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02	0,01
<b>N10P10</b>	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,01

Tabela A-10: Valores de P-particulado/Chl-a, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período seco, em  $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ .

P-particulado/Chl-a	Ex.7	Ex.8	Ex.9	Ex.10	Ex.11	Ex.12	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	0,02	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03	0,03	0,01
<b>Ct10</b>	0,05	0,05	0,03	0,06	0,08	0,02	0,05	0,02
<b>N1</b>	0,05	0,03	0,02	0,05	0,05	0,02	0,04	0,01
<b>N10</b>	0,01	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,00
<b>P1</b>	0,07	0,08	0,06	0,20	0,08	0,04	0,09	0,06
<b>P10</b>	0,10	0,15	0,10	0,23	0,16	0,13	0,14	0,05
<b>N1P1</b>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,04	0,05	0,02
<b>N1P10</b>	0,07	0,08	0,09	0,09	0,13	0,10	0,09	0,02
<b>N10P1</b>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00
<b>N10P10</b>	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02	0,02	0,01

### 8.6. N-amoniacal

Tabela A-10: Valores médios de N-amoniacal, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período úmido, em  $\mu\text{M}$ .

N-amoniacal	Ex.1	Ex.2	Ex.3	Ex.4	Ex.5	Ex.6	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	7,6	2,5	2,5	4,2	4,7	2,7	4,0	2,0
<b>Ct10</b>	3,3	1,0	0,8	0,7	1,7	1,3	1,5	1,0
<b>N1</b>	1,4	0,4	0,1	0,5	1,0	1,5	0,8	0,6
<b>N10</b>	1,3	0,3	0,4	0,2	0,7	0,9	0,6	0,4
<b>P1</b>	0,7	0,4	0,1	1,3	0,5	0,5	0,6	0,4
<b>P10</b>	0,6	0,5	0,8	0,3	0,6	0,6	0,6	0,2
<b>N1P1</b>	0,7	0,5	0,3	0,8	0,5	0,7	0,6	0,2
<b>N1P10</b>	2,2	0,3	0,5	0,4	0,5	0,9	0,8	0,7
<b>N10P1</b>	0,8	0,5	0,9	0,2	0,4	0,6	0,6	0,3
<b>N10P10</b>	0,3	0,7	0,5	0,7	1,1	0,6	0,6	0,3

Tabela A-11: Valores médios de N-amoniacal, para cada condição experimental dos seis experimentos realizados no período seco, em  $\mu\text{M}$ .

N-amoniacal	Ex.7	Ex.8	Ex.9	Ex.10	Ex.11	Ex.12	Média	Desvio Padrão
<b>Ct0</b>	2,6	1,4	0,7	1,9	1,7	4,0	2,1	1,1
<b>Ct10</b>	0,8	0,9	1,3	1,0	0,8	1,2	1,0	0,2
<b>N1</b>	0,2	0,9	1,5	0,7	0,6	0,5	0,7	0,4
<b>N10</b>	1,6	1,7	1,1	0,6	0,8	0,2	1,0	0,6
<b>P1</b>	0,4	0,5	0,6	1,4	0,4	0,3	0,6	0,4
<b>P10</b>	0,3	0,2	0,4	0,7	0,3	0,2	0,4	0,2
<b>N1P1</b>	0,4	3,7	0,4	0,6	0,3	0,5	1,0	1,3
<b>N1P10</b>	0,0	0,5	0,3	0,5	0,2	0,3	0,3	0,2
<b>N10P1</b>	0,2	0,4	0,7	0,8	0,5	0,8	0,6	0,2
<b>N10P10</b>	0,9	0,5	0,2	0,5	0,6	0,7	0,5	0,2

### 8.7. Diminuição de nitrato e ortofosfato por clorofila-a.

Tabela A-12: Diminuição de nitrato/chl-a e fosfato/chl-a ( $\mu\text{M } \mu\text{g}^{-1}$ ) referente às condições combinadas dos nutrientes. Além disso, pode ser visto a variação produzida de clorofila-a destas condições em relação ao  $\text{Ct}_0$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

	Abs. Nitrato/Chl-a	Abs. Fosfato/Chl-a	▲ Chl-a (Condição - $\text{Ct}_0$ )
N1	1,6	-	7,6
N1P1	1,72	0,06	7,4
N1P10	1,22	0,04	10,3
N10	1,48	0,00	17,2
N10P1	1,21	0,01	37,5
N10P10	0,47	0,05	96,2
P1	5,89	0,74	0,6
P1N1	1,72	0,06	7,4
P1N10	1,21	0,01	37,5
P10	1,58	1,13	3,1
P10N1	1,22	0,04	10,3
P10N10	0,47	0,05	96,2