

**UTILIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DO METABOLISMO
AQUÁTICO EM EXPERIMENTO DE ENRIQUECIMENTO COM NUTRIENTES EM
MESOCOSMOS**

MARIANNA DE QUEIROZ LOURO DE OLIVEIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES
JULHO – 2015**

UTILIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DO METABOLISMO AQUÁTICO EM EXPERIMENTO DE ENRIQUECIMENTO COM NUTRIENTES EM MESOCOSMOS

MARIANNA DE QUEIROZ LOURO DE OLIVEIRA

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Marina Satika Suzuki
(Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Ciências Ambientais)

Coorientador: Dr. Matheus Carvalho de Carvalho
(Southern Cross University, Centre for Coastal Biogeochemistry Research, School of Environment, Science and Engineering)

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2015

**UTILIZAÇÃO DE UM NOVO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DO METABOLISMO AQUÁTICO
EM EXPERIMENTO DE ENRIQUECIMENTO COM NUTRIENTES EM MESOCOSMOS**

MARIANNA DE QUEIROZ LOURO DE OLIVEIRA

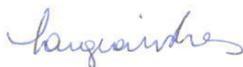
Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 06 de julho de 2015.

Comissão Examinadora:



Dr. Alvaro Ramon Coelho Ovalle (UENF/CBB/LCA)



Dr.ª Lúcia Macabu Ribas (Envitek Engenharia)



Dr. Marcelo Gomes de Almeida (UENF/CBB/LCA)



Dr.ª Marina Satika Suzuki (UENF/CBB/LCA) (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu esposo Ulisses, a minha mãe Isabel e aos meus irmãos Paulo e Paula por toda ajuda e apoio durante essa longa caminhada.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Marina Satika Suzuki não apenas pelos ensinamentos durante a minha formação acadêmica, mas por toda a ajuda principalmente nos momentos mais difíceis para mim.

Ao meu coorientador Dr. Matheus Carvalho de Carvalho por abrir as portas para o doutorado sanduíche e pela orientação de parte da tese. Os seus ensinamentos durante o período que estive na Austrália e também aqui contribuíram muito para a minha formação e realização dessa tese.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram e fazem parte da minha vida.

Ao Dr. Bruno dos Santos Esteves pela revisão deste manuscrito.

Aos membros da banca examinadora, professor Alvaro Ramon Coelho Ovalle, Lígia Macabu Ribas e Marcelo Gomes de Almeida 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	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Capítulo 1. EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO ARTIFICIAL DE NITROGÊNIO E FÓSFORO INORGÂNICOS SOBRE A COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA EM UMA LAGOA COSTEIRA: UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS.....	7
1.1. <i>Justificativa</i>	7
1.2. <i>Objetivos</i>	9
1.2.1. Objetivos Gerais.....	9
1.2.2. Objetivos Específicos	10
1.3. <i>Materiais e Métodos</i>	10
1.3.1. Descrição do local.....	10
1.3.2. Desenho experimental.....	12
1.3.2.1. Mesocosmos	12
1.3.2.2. Amostragem.....	15
1.3.3. Determinações Químicas.....	16
1.3.3.1.1. Clorofila-a.....	16
1.3.3.1.2. C, N e P na fração particulada.....	17
1.3.3.1.3. Nutrientes na fração dissolvida	17
1.3.3.2. Comunidade Fitoplanctônica.....	18
1.3.3.2.1. Análise qualitativa.....	18
1.3.3.2.2. Análise quantitativa.....	18
1.3.3.2.2.1. Densidade fitoplanctônica.....	18
1.3.3.2.2.2. Biovolume.....	19
1.4. <i>Análise dos dados</i>	20
1.5. <i>Resultados</i>	21
1.5.1. Parâmetros físico-químicos.....	21
1.5.2. Nutrientes	23
1.5.3. Comunidade fitoplanctônica: biomassa e estrutura.....	28
1.5.4. Comunidade perifítica: biomassa.....	32
1.5.5. Análise dos Componentes Principais	33
1.5.6. Análise de Correspondência Canônica	36
1.6. <i>Discussão</i>	41
1.6.1. Resposta da biomassa fitoplanctônica a adição de nutrientes	41
1.6.2. Limitação nutricional.....	43
1.6.3. Indicadores de estado trófico e composição da comunidade fitoplanctônica.....	49
1.6.4. Razão clorofila-a:densidade	51
1.6.5. Eutrofização e futuras direções.....	53
1.6.6. <i>Conclusões</i>	54
Capítulo 2. APLICAÇÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO PRIMÁRIA E RESPIRAÇÃO PELÁGICA NA LAGOA DE IQUIPARÍ (SÃO JOÃO DA BARRA, RJ).....	56
2.1. <i>Justificativa</i>	56
2.2. <i>Objetivos</i>	65
2.2.1. Objetivo Geral.....	65

2.2.2. Objetivos Específicos	65
2.3. <i>Materiais e Métodos</i>	65
2.3.1. Metodologia.....	65
2.3.1.1. Método - Incubação em garrafas.....	66
2.3.1.2. Método – “Água Livre”	66
2.4.1.3. Método – Água Livre com adição de ¹³ C (AL ¹³ C).....	67
2.3.2. <i>Análises</i>	72
2.3.2.1. Carbono inorgânico na fração dissolvida.....	72
2.3.2.2. Carbono orgânico na fração dissolvida.....	73
2.3.2.3. Carbono orgânico na fração particulada.....	73
2.3.2.4. Composição isotópica do CID, COD e COP.....	73
2.3.2.5. Determinação da pressão parcial de CO ₂ (pCO ₂).....	75
2.4. <i>Resultados</i>	75
2.4.1. Oxigênio dissolvido.....	75
2.4.1.1. Incubações em garrafas claras e escuras.....	75
2.4.1.2. “Água Livre”.....	76
2.4.2. Carbono inorgânico dissolvido.....	77
2.4.3. Carbono orgânico dissolvido.....	77
2.4.4. Carbono orgânico particulado.....	78
2.4.5. Composição isotópica (¹³ CID, ¹³ COD e ¹³ COP).....	79
2.4.6. Fotossíntese.....	81
2.4.7. Respiração.....	82
2.4.8. Transferências.....	84
2.4.8.1. COD para COP.....	84
2.4.8.2. COP para COD.....	84
2.4.8.3. Água-exterior e exterior-água.....	85
2.4.9. Produção primária líquida e balanço metabólico.....	87
2.5. <i>Discussão</i>	89
2.5.1. Alterações físico-químicas.....	89
2.5.2. Adição de nutrientes X balanço metabólico.....	90
2.5.3. Herbivoria.....	92
2.5.4. Produção e consumo de COD.....	92
2.5.5. Razão produção de COD:consumo de CID e razão consumo de COD:entrada de CID....	93
2.5.6. Razão PPB:R.....	95
2.5.7. Transferências água-exterior e exterior-água.....	97
2.5.8. Comparações entre os métodos na determinação do metabolismo aquático.....	98
2.5.8.1. Respiração na luz e no escuro.....	98
2.5.8.2. Diferença na utilização fisiológica do carbono e oxigênio pela comunidade fitoplanctônica.....	99
2.5.8.3. Problemas operacionais e desvantagens da técnica de incubação em garrafas.....	100
2.6. <i>Conclusões</i>	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXOS.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico demonstrando a resposta da biomassa da comunidade fitoplanctônica a diferentes concentrações de um nutriente limitante.....	2
Figura 2. Esquema ilustrando os efeitos da eutrofização nos ecossistemas aquáticos.....	5
Figura 1.1. Mapa da lagoa de Iquiparái, com a localização dos dois pontos amostrais.....	12
Figura 1.2. Esquema dos mesocosmos (caixas plásticas) amarrados a bambus que foram fincados no sedimento da lagoa. Os mesocosmos isolaram o sedimento.....	13
Figura 1.3. Fotos das disposições dos mesocosmos no Ponto 1, a esquerda, e no Ponto 2, a direita.....	15
Figura 1.4. Fluxo esquemático indicando os horários de cada medição ao longo dos 10 dias de experimento. Os dias em que foram realizadas coletas de água estão destacados em itálico.....	15
Figura 1.5. Variação média do pH e OD (mg L^{-1}) ($n = 3$) ao longo dos 10 dias de experimento nos Pontos 1 e 2, às 6h, 10h e 18h.....	22
Figura 1.6. Média e desvio padrão dos nutrientes dissolvidos ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento no Ponto 1.....	24
Figura 1.7. Média e desvio padrão dos nutrientes dissolvidos ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento no Ponto 2.....	26
Figura 1.8. Média e desvio padrão das concentrações dos nutrientes particulados ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento. Os gráficos da esquerda são referentes aos resultados obtidos no Ponto 1, e os da direita são referentes ao Ponto 2.....	28
Figura 1.9. Média e desvio padrão da biomassa fitoplanctônica ($n = 6$) por meio da clorofila- <i>a</i> nos seis dias avaliados nos Pontos 1 e 2.	29
Figura 1.10. Número de indivíduos obtidos no 4° e 10° dias de experimento e na água da lagoa, Ct0, nos Pontos 1 e 2.	30
Figura 1.11. Biovolume obtidos no 4° e 10° dias de experimento nos Pontos 1 e 2 e na água da lagoa, Ct0.....	32
Figura 1.12. Média e desvio padrão da biomassa perifítica ($n = 6$) na forma de clorofila- <i>a</i> no décimo dia de experimento nos Pontos 1 e 2.	33
Figura 1.13. ACP com os valores médios das variáveis abióticas em cada tratamento nos dias 1, 2, 4, 6, 8 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, Si-SiO ₂ = sílica, OD= oxigênio dissolvido, Cont – 1 = controle 1° dia, Cont – 2 = controle 2° dia, Cont – 4 = controle 4° dia, Cont – 6 = controle 6° dia, Cont – 8 = controle 8° dia, Cont – 10 = controle 10° dia, N – 1 = N - 1° dia, N – 2 = N - 2° dia, N – 4 = N - 4° dia, N – 6 = N - 6° dia, N – 8 = N - 8° dia, N – 10 = N - 10° dia, P – 1 = P - 1° dia, P – 2 = P - 2° dia, P – 4 = P - 4° dia, P – 6 = P - 6° dia, P – 8 = P - 8° dia, P – 10 = P - 10° dia, NP – 1 = NP - 1° dia, NP – 2 = NP - 2° dia, NP – 4 = NP - 4° dia, NP–6=NP-6° dia, NP – 8 = NP-8° dia e NP–10=NP-10° dia.....	34
Figura 1.14. ACP com os valores médios das variáveis abióticas em cada tratamento nos dias 1, 2, 4, 6, 8 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, Si-SiO ₂ = sílica, N-NH ₄ ⁺ = N-amoniacal, N-NO ₂ ⁻ = nitrito, Cont – 1 = controle 1° dia, Cont – 2 = controle 2° dia, Cont – 4 = controle 4° dia, Cont – 6 = controle 6° dia, Cont – 8 = controle 8° dia, Cont – 10 = controle 10° dia, N – 1 = N - 1° dia, N – 2 = N - 2° dia, N – 4 = N - 4° dia, N – 6 =	

= N - 6° dia, N - 8 = N - 8° dia, N - 10 = N - 10° dia, P - 1 = P - 1° dia, P - 2 = P - 2° dia, P - 4 = P - 4° dia, P - 6 = P - 6° dia, P - 8 = P - 8° dia, P - 10 = P - 10° dia, NP - 1 = NP - 1° dia, NP - 2 = NP - 2° dia, NP - 4 = NP - 4° dia, NP - 6 = NP - 6° dia, NP - 8 = NP - 8° dia e NP - 10 = NP - 10° dia. 36

Figura 1.15. ACC com os valores médios das variáveis abióticas e bióticas em Ct0 e em cada tratamento nos dias 4 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, OD= oxigênio dissolvido, Ct0 = água da lagoa, Cont - 4 = controle, Cont - 10 = controle 10° dia, N - 4 = N - 4° dia, N - 10 = N - 10° dia, P - 4 = P - 4° dia, P - 10 = P - 10° dia, NP - 4 = NP - 4° dia e NP - 10 = NP - 10° dia..... 38

Figura 1.16. ACC com os valores médios das variáveis abióticas e bióticas em Ct0 e em cada tratamento nos dias 4 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, OD= oxigênio dissolvido, Ct0 = água da lagoa, Cont - 4 = controle, Cont - 10 = controle 10° dia, N - 4 = N - 4° dia, N - 10 = N - 10° dia, P - 4 = P - 4° dia, P - 10 = P - 10° dia, NP - 4 = NP - 4° dia e NP - 10 = NP - 10° dia..... 40

Figura 1.17. Valores obtidos a partir da razão P-particulado:clorofila-a ($\mu\text{M } \mu\text{M}$) (n = 6) durante o 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dias de experimento nos dois pontos amostrais..... 45

Figura 2.1. Fluxo de carbono dentro dos mesocosmos, compreendendo as formas dissolvidas e particuladas e os respectivos processos de consumo, produção, respiração e fotossíntese. A comunidade perífita e a entrada e saída de carbono do sistema não foram considerados como pertencentes ao sistema..... 69

Figura 2.2. Fluxo esquemático das etapas realizadas utilizando o método AL^{13}C na determinação do metabolismo aquático na fração particulada e dissolvida..... 72

Figura 2.3. Valores médios de OD (mM) e desvio padrão (n = 6) no 1°, 3° e 9° dia de experimento nas garrafas clara e escura obtidas através do método de incubação em garrafas nos Pontos 1 e 2..... 76

Figura 2.4. Concentrações médias de OD (mM) (n = 6) obtidos através do método da “Água Livre”..... 77

Figura 2.5. Concentrações médias de CID (mM) e desvio padrão (n =6) no 1°, 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2..... 77

Figura 2.6. Concentrações médias de COD (mM) e desvio padrão (n = 6) no 1°, 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2..... 78

Figura 2.7. Concentrações médias de COP (mM) e desvio padrão (n = 6) no 1°, 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2..... 79

Figura 2.8. Composição isotópica do CID, (^{13}CID), COD (^{13}COD) e COP (^{13}COP) nos dias avaliados, nos Pontos 1 e 2 (n = 6)..... 80

Figura 2.9. Valores médios e desvio padrão da fotossíntese (n = 3) pelos métodos de incubação em garrafas e AL^{13}C , em cada tratamento, compreendendo o período do 1° ao 3° dia e do 3° ao 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2..... 82

Figura 2.10. Valores médios e desvio padrão da respiração (n = 3) pelos métodos de incubação em garrafas e AL^{13}C , em cada tratamento, no 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2..... 83

Figura 2.11. Valores médios e desvio padrão da transferência COD para COP do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia de experimento para cada tratamento nos Pontos 1 e 2..... 84

Figura 2.12. Valores médios e desvio padrão da transferência COP para COD do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia de experimento para cada tratamento nos Pontos 1 e 2.....	85
Figura 2.13. Valores médios e desvio padrão da transferência água-exterior e exterior-água do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia para cada tratamento nos Pontos 1 e 2.....	86
Figura 2.14. Valores da pCO ₂ obtidos através do programa CO ₂ sys para cada condição experimental no 1°, 3° e 9° dia. Os valores foram inferiores aos valores de equilíbrio atmosférico (380 µatm) o que representa fluxo atmosfera-água em todos os mesocosmos e tratamentos.....	87
Figura 2.15. Valores médios e desvio padrão da PPL pelos métodos de incubação em garrafas, “Água Livre” e AL ¹³ C, em cada tratamento, compreendendo o 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2.....	88
Figura 2.16. Balanço metabólico do 1° ao 3° dia e do 3° e 9° dia em cada tratamento pelos três métodos utilizados nos Pontos 1 e 2.....	89
Figura 2.17. Valores obtidos a partir da razão produção COD: consumo de CID, e razão consumo de COD: entrada de CID nos dois pontos experimentais em cada tratamento entre o 1° e 3° dia e entre o 3° e 9° dia.....	94
Figura 2.18. Valores da razão PPB:R (mM mM) obtidos nos dois pontos experimentais pelos métodos AL ¹³ C e incubação em garrafas. Valores >1 indicam a ocorrência de metabolismo autotrófico enquanto valores <1 a ocorrência de metabolismo heterotrófico.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Composição dos enriquecimentos nutricionais (N e P) utilizados nos mesocosmos.....	14
Tabela 1.2: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos nos dois pontos experimentais (n=3). Para Ct0, foi realizada apenas uma medição no primeiro dia de experimento. As letras diferentes indicam se ocorreu diferença estatística entre os tratamentos.....	21
Tabela 1.3: Correlação das variáveis abióticas (n=24) com os componentes principais no Ponto 1	34
Tabela 1.4: Correlação das variáveis abióticas (n=24) com os componentes principais no Ponto 2.....	35
Tabela 1.5: Síntese da ACC para os tratamentos.....	37
Tabela 1.6: Correlação das variáveis abióticas (n=9) com os componentes principais no Ponto 1.....	37
Tabela 1.7: Correlação das variáveis biológicas (n=9) com os eixos 1 e 2 no Ponto 1.....	38
Tabela 1.8: Síntese da ACC para os tratamentos.....	39
Tabela 1.9: Correlação das variáveis abióticas (n=9) com os componentes principais no Ponto 2.....	39
Tabela 1.10: Correlação das variáveis biológicas (n=9) com os eixos 1 e 2 no Ponto 2.....	40
Tabela 1.11: Razão molar NID:ortofosfato (orto-P) para os dois pontos amostrais em cada dia de coleta. As concentrações médias dos nutrientes estão em μM	44
Tabela 1.12: Valores indicadores da deficiência nutricional a partir das razões C:N, N:P, C:P e C:clorofila-a. (Fonte: Hecky <i>et al.</i> , 1993)	46
Tabela 1.13: Valores médios (n = 6) obtidos a partir da razão dos nutrientes particulados e clorofila-a: C:N, C:P, N:P (μM μM) e C:clorofila-a (μM $\mu\text{g L}^{-1}$) em ambos os pontos experimentais durante o 1°, 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dia de experimento.....	47
Tabela 1.14: Valores obtidos a partir da razão clorofila-a:densidade (pg Cla.cel^{-1}).....	53
Tabela 2.1: Resumo dos pontos positivos e negativos dos três métodos utilizados no presente estudo para a determinação do metabolismo aquático. Adaptado de Staehr <i>et al.</i> (2012).....	64
Tabela 2.2: Estimativa dos valores para os parâmetros não medidos diretamente.....	70
Anexo 1: Biovolume das principais espécies no 1°, 4° e 10° dia de experimento no Ponto 1	127
Anexo 2: Biovolume das principais espécies no 1°, 4° e 10° dia de experimento no Ponto 2	128
Anexo 3: Concentração média dos nutrientes dissolvidos e particulados em μM , no Ponto 1.....	129
Anexo 4: Concentração média dos nutrientes dissolvidos e particulados em μM , no Ponto 2.....	130

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram verificar via experimentos em mesocosmos *in situ*, os efeitos do incremento de nutrientes sobre a estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica da lagoa de Iquiparí (lagoa costeira do Norte Fluminense, RJ). O estudo também avaliou a respiração planctônica (fito- e bacterio-) na luz, e a produção primária bruta em unidades de carbono. Os experimentos foram realizados entre 8 a 17 de março de 2012 – Ponto 1 e 2 a 11 de abril de 2013 – Ponto 2. Doze mesocosmos foram dispostos para quatro tratamentos (triplicata): adição somente de N (N); adição somente de P (P); e adição combinada de N e P (NP); além do controle (controle) - água da lagoa sem adição de nutrientes. Os experimentos relacionados ao metabolismo aquático foram realizados concomitantemente com o de adição de nutrientes utilizando três métodos, o método de incubação em garrafas, “Água Livre” e o novo método desenvolvido no presente estudo que utiliza isótopos estáveis de carbono, denominado “Água Livre com Adição de ^{13}C ” (AL ^{13}C). O enriquecimento com nutrientes proporcionou modificações na estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica, refletindo no metabolismo aquático em todos os mesocosmos. A ação sinérgica dos nutrientes no tratamento NP pôde ser observada em relação à maior biomassa, número de indivíduos e maiores taxas de respiração e produção primária nesse tratamento. Este fato não foi observado nos tratamentos com adição individualizada dos nutrientes, que apresentaram colimitação nutricional. O método AL ^{13}C apresentou sempre valores positivos e superiores de fotossíntese e respiração do que o método de incubação em garrafas. Por outro lado, o método AL ^{13}C apresentou menores valores de produção primária líquida. Provavelmente essas diferenças foram observadas devido a não determinação da respiração na luz pelos métodos tradicionais. O novo método apresentou maior acurácia na determinação do metabolismo aquático determinando também a produção e o consumo de carbono orgânico dissolvido, além das trocas água-atmosfera. Caso ocorra incremento de nutrientes na lagoa de Iquiparí, principalmente se for em conjunto, pode acarretar sérias modificações no ecossistema devido ao efeito sinérgico dos nutrientes. Nesse sentido, deve ser impedido qualquer tipo de incremento antropogênico de nutrientes na lagoa de Iquiparí, a fim de evitar modificações na estrutura trófica do sistema, perda de biodiversidade e alterações na qualidade da água.

Palavras-chaves: eutrofização; comunidade fitoplanctônica; isótopos estáveis e produção primária.

ABSTRACT

The objectives of this study were to verify through experiments in mesocosms in situ, the effects of nutrient enrichment on the structure and dynamics of the phytoplanktonic community in Iquipari lagoon (coastal lagoon Norte Fluminense, RJ). The study also evaluated the plankton respiration (phyto- and bacterio-) in the light and the gross primary production in carbon units. Mesocosms experiments were performed in two sampling points with different hydrochemical composition. The experiments were carried out from March 8th to March 17th 2013 – Point 1 and from April 2nd to April 11th 2013 – Point 2. Twelve mesocosms were designed for four treatments (triplicate): addition of only N (N), addition of only P (P), combined addition of P and N (NP), and the control, lagoon water without the addition of nutrients. Aquatic metabolism experiments were performed concomitantly with the addition of nutrients using three methods: bottle incubation, "free-water" and the new method developed in this study using carbon isotope, entitled "free-water with addition of ¹³C" (AL¹³C). The nutrient enrichment provided changes in the structure and dynamics of phytoplankton community reflecting on aquatic metabolism. The synergistic effect of nutrients in the NP treatment was observed in relation to the higher biomass, number of individuals and higher respiration rates and primary production in this treatment. Treatments with individualized addition of nutrients, N and P, showed nutritional colimitation. The AL¹³C method presented always positive and greater values of photosynthesis and respiration than bottle incubation method. Moreover, the AL¹³C method presented smaller net primary production values than the bottle incubation. This difference was probably due to the fact that bottles incubations and the traditional "free-water" method do not measure the respiration in the light. Therefore, the new method was probably more accurate for the determination of aquatic metabolism. The AL¹³C was also useful to determine the production and consumption of dissolved organic carbon and the water-air exchange which adds information relevant for studies associated the aquatic metabolism. In the event of increased nutrients in the system, especially if combined due to the synergistic effect of nutrients, severe changes may be observed in the ecosystem. In this sense, should be avoided any level of anthropogenic nutrient enrichment in Iquipari lagoon in order to avoid changes in the trophic structure of the system, reduction of the biodiversity and deterioration of water quality.

Keywords: eutrophication; phytoplanktonic community; stable isotopes and primary production.

INTRODUÇÃO GERAL

As lagoas costeiras ocupam aproximadamente 13% da área continental em todo o mundo (Barnes, 1980). Esses ecossistemas aquáticos estão localizados próximos ao mar, sendo ambientes rasos, dinâmicos e altamente produtivos (Knoppers, 1994). A maior parte da produção primária das lagoas costeiras está associada às macrófitas aquáticas, mas na ausência dessa comunidade, principalmente em ambientes com águas mais turbidas, os organismos fitoplanctônicos apresentam maior contribuição para a produção (Mahapatro *et al.*, 2013). Os organismos fitoplanctônicos habitam ambientes de água doce, salgada e salobra. Geralmente são microscópios, variando de 1 μm a 1 mm, e em caso de colônias, podem atingir tamanhos maiores com cerca de 2 mm (Litchman *et al.*, 2010). Os organismos fitoplanctônicos podem ser eucariontes ou procariontes (cianofíceas, mais conhecidas como cianobactérias), autotróficos e representam um grupo polifilético (Falkowski *et al.*, 2004) no qual os indivíduos pertencentes não possuem necessariamente um mesmo ancestral comum.

Em geral, a comunidade fitoplanctônica apresenta elevada riqueza específica (Nõges *et al.*, 2010), o que pode ocorrer quando há codominância de espécies (Guo *et al.*, 2010). Mudanças nos fatores físicos (temperatura e luz), biológicos (competição e herbivoria) e químicos (principalmente nutrientes) podem influenciar essa comunidade tanto espacial quanto temporalmente. Conseqüentemente, essas alterações podem causar efeitos na abundância, composição e distribuição da comunidade fitoplanctônica (Nõges *et al.*, 2010; Edward *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2011).

O fitoplâncton tem na sua composição macro- e micronutrientes essenciais para sua formação celular e atividades enzimáticas. Devido à variação na composição química das águas os nutrientes podem ser um importante regulador das comunidades produtoras (Reynolds, 2006). A disponibilidade de diferentes formas nutricionais pode afetar a abundância das espécies, logo altera a composição fitoplanctônica. Pode-se dizer que o crescimento da comunidade fitoplanctônica é limitado, saturado ou inibido devido à disponibilidade de alguns nutrientes (Reynolds, 2006; Carpenter, 2008; Zhu *et al.*, 2010). A resposta da comunidade fitoplanctônica a diferentes concentrações de um nutriente limitante pode ser observada na Figura 1. Em baixa concentração, Fase 1, o nutriente é limitante a comunidade fitoplanctônica, o que é refletido na baixa biomassa. Com incremento na disponibilidade do nutriente limitante no ambiente ocorre estímulo ao aumento de biomassa (Fases 2 e 3),

chegando a uma fase de saturação do nutriente (Fases 4 e 5). Nessa etapa é cessado o aumento da biomassa fitoplanctônica devido à exposição à alta concentração do nutriente, e também possível ausência de limitação nutricional. Nessas condições, caso o incremento de nutriente não cesse, a comunidade fitoplanctônica pode ser inibida (Fase 6) diminuindo a biomassa devido à alta concentração do nutriente e também possível toxicidade.

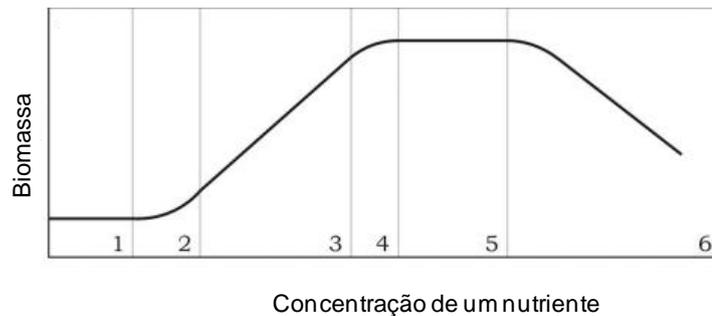


Figura 1. Gráfico demonstrando a resposta da biomassa da comunidade fitoplanctônica a diferentes concentrações de um nutriente limitante.

Os nutrientes podem entrar nos ecossistemas aquáticos de forma natural ou devido a atividades humanas (denominadas formas antrópicas ou artificiais). O incremento na disponibilidade de nutrientes nos ecossistemas aquáticos é conhecido como eutrofização (Richardson & Jørgensen, 1996). Como fontes naturais de nutrientes para os corpos d'água destacam-se a decomposição da matéria orgânica, a precipitação seca e úmida, material orgânico ou inorgânico de origem alóctone carregados da sua bacia de drenagem via escoamento superficial e aporte do lençol freático, fixação biológica (N_2) e o intemperismo de rochas. Quando o processo é natural, caracteriza-se por ser lento, com um gradativo acúmulo de matéria orgânica no ambiente. Contudo, as atividades humanas têm acelerado a eutrofização adicionando nutrientes limitantes ao crescimento das comunidades nos ecossistemas aquáticos (Vitousek *et al.*, 1997; Struijk & Kroeze, 2010). Devido a sua localização, as lagoas costeiras podem sofrer impactos tanto por influências naturais quanto antrópicas (Knoppers, 1994). O intenso uso humano às margens das lagoas gera entradas de poluentes no sistema, com lançamento de efluentes domésticos e/ou industriais, atividades essas que podem ser responsáveis por até 50% da entrada de P nos ambientes aquáticos (Smith *et al.*, 2006). Dentre os distúrbios antropogênicos, a eutrofização antrópica pode ser apontada como o principal fator modificador das lagoas costeiras, que pode resultar em degradação da qualidade da água e em alguns casos

diminuição da produtividade (Rissik *et al.*, 2009; Souchu *et al.*, 2010). Como ações antrópicas que afetam os ecossistemas aquáticos destacam-se áreas de assentamento humano que atraem para suas margens vários empreendimentos imobiliários; o assoreamento da bacia hidrográfica; o desmatamento das áreas ao entorno da lagoa e a introdução de espécies exóticas (Bennett *et al.*, 2001; Carpenter, 2008).

Desde a década de 1970 observa-se um rápido aumento do número de estudos sobre a eutrofização (Nixon, 2009) que continuam ganhando destaque (Smith & Schindler, 2009; Ndelebe-Murisa *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Geralmente, esses estudos tentam estabelecer relação entre o crescimento algal e as concentrações dos nutrientes, além de determinar os fatores limitantes para as comunidades produtoras (Zhu *et al.*, 2010). A relevância de estudar o tema reflete não apenas em questões científicas, como perda da biodiversidade e modificações tróficas, mas também engloba questões sociais e políticas. A eutrofização pode afetar diretamente a disponibilidade de água para o consumo humano (seja urbano, industrial, na pecuária e agricultura), a geração de energia, a produção de comida e a renda das populações locais. Pode causar ainda problemas na saúde da população local e aumento dos gastos públicos (Tundisi, 2008; Smith & Schindler, 2009).

Os nutrientes nitrogênio (N) e fósforo (P) são considerados os principais causadores da eutrofização nos ecossistemas aquáticos (Hecky & Kilham, 1988). Em 150 anos, o fluxo global de N na biosfera aumentou de 15 Tg N por ano para aproximadamente 187 Tg N por ano. Em relação ao P, o fluxo global que era de aproximadamente 10-15 Tg P por ano no período pré-industrial, aumentou para 33-39 Tg P por ano (Carpenter, 2008). A atividade que contribui com a maior adição de N é a agricultura, liberando cerca de 100 Tg de N ao ano em todo o mundo, enquanto a queima de combustíveis fósseis contribui com 40 Tg N ao ano (Fields, 2004). Com relação ao P, as atividades humanas liberam 75% a mais de P para o solo do que os processos naturais como o intemperismo de rochas. As perdas de P do solo para os ecossistemas aquáticos, as diferentes práticas agrícolas e a urbanização podem incrementar as concentrações de P nos ecossistemas aquáticos em torno de 20 Tg P por ano (Bennett *et al.*, 2001).

A entrada excessiva de nutrientes nos ecossistemas aquáticos pode causar sérios problemas ambientais que tendem a variar entre os diferentes corpos d'água. Considerando os problemas causados pela eutrofização, o aumento da biomassa das comunidades responsáveis pela produção primária é uma questão de preocupação

pública (WHO, 2002). O metabolismo aquático também sofre modificações após o incremento de nutrientes, aumentando as taxas de fotossíntese, diminuindo as concentrações de carbono inorgânico dissolvido (CID) e aumentando o pH durante o período de atividade fotossintética. O curto ciclo de vida que a comunidade fitoplanctônica apresenta e o incremento da biomassa resulta em morte e acúmulo da matéria orgânica, aumentando, em consequência, as taxas de decomposição (Figura 2). A decomposição aumenta o consumo de oxigênio dissolvido (OD), podendo gerar a anoxia no sistema. Na ausência de OD suficiente, um grande número de organismos aquáticos morre. O aumento da biomassa da comunidade fitoplanctônica e de macrófitas aquáticas pode impedir a navegação e o fluxo d'água (Smith *et al.*, 2006; Nixon, 2009). Além disso, dificulta a penetração de luz na coluna d'água, o que diminui as taxas fotossintéticas e a produção de oxigênio nas camadas inferiores da coluna d'água. A redução da penetração de luz pode refletir nos predadores e na redução no crescimento das macrófitas aquáticas (Scheffer & Jeppesen, 1998). Em eventos de eutrofização, pode haver um aumento na dominância de cianobactérias (Smith, 2003; Soares *et al.*, 2012), com algumas espécies capazes de produzir toxinas, denominadas cianotoxinas, como a microcistina e anatoxina-a. As toxinas podem causar danos tanto para os organismos aquáticos quanto para organismos que utilizam diretamente os recursos disponibilizados pelo ambiente, podendo atingir a saúde humana (Soares *et al.*, 2012) (Figura 2). Em humanos, as toxinas podem causar, por exemplo, paralisia, diarreia, vômitos, problemas respiratórios e neurológicos, como perda da memória, desorientação e coma. Outros sintomas da eutrofização são os problemas causados em níveis tróficos superiores (Soares *et al.*, 2012). O zooplâncton, principal predador dos organismos fitoplanctônicos, também pode apresentar modificações em sua comunidade. Nessas ocasiões, a comunidade zooplanctônica tende a ser composta por organismos menores devido à baixa palatabilidade e reduzido valor nutritivo da comunidade fitoplanctônica que é composta na maior parte por organismos maiores formados por colônias ou filamentos (Cloern, 2001; Dodds, 2006; Smith *et al.*, 2006; Schindler *et al.*, 2008; Smith & Schindler, 2009). A eutrofização favorece e acentua a morte de peixes e também de outros organismos que utilizam ou se alimentam de fontes oriundas do ambiente aquático, em decorrência da anoxia e de toxinas que podem ser produzidas. Os problemas causados pela eutrofização também geram perdas na economia afetando os governos, que devem investir para diminuir os efeitos acima mencionados

(Figura 2). O enriquecimento com nutriente afeta também os pescadores, as atividades de recreação e o turismo do local. Um resumo dos efeitos da eutrofização nos ecossistemas aquáticos pode ser observado no esquema a seguir:

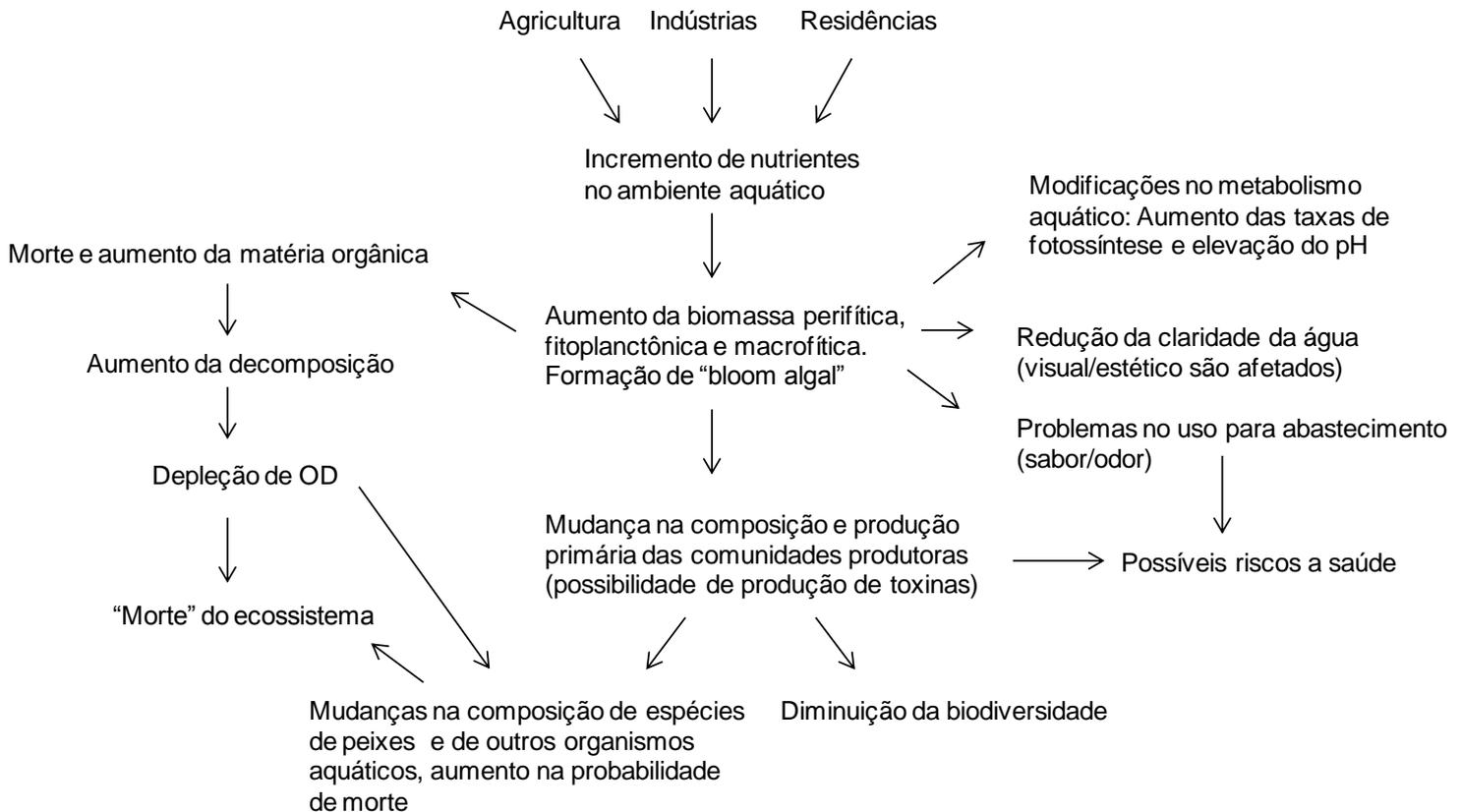


Figura 2. Esquema ilustrando os efeitos da eutrofização nos ecossistemas aquáticos.

Embora existam inúmeros estudos que abordam a eutrofização, poucos quantificam o fluxo de carbono e sua relação com o enriquecimento por nutrientes em lagoas costeiras (Staeher *et al.*, 2012). Os métodos que determinam o metabolismo aquático existentes até o momento, com exceção dos que utilizam isótopos estáveis, não consideram a respiração na luz e subestimam os resultados sobre o metabolismo aquático (maiores detalhes ver seção 2.5.8). Assim, o desenvolvimento de um novo método na determinação do metabolismo aquático utilizando isótopos estáveis (^{13}C) e que permite quantificar a produção primária líquida (PPL), respiração (R) e produção primária bruta (PPB), além da produção e do consumo de COD permitirá um melhor entendimento da relação do metabolismo aquático com a eutrofização.

As hipóteses testadas no presente estudo foram:

1 – a densidade, biomassa e composição da comunidade fitoplanctônica devem ser positivamente correlacionadas com a adição de nutrientes já que a adição de

nutrientes estimula o incremento da biomassa e da densidade e gera modificações na composição da comunidade.

2 – o efeito da adição combinada dos nutrientes favorecerá a ocorrência de modificações na biomassa, densidade e composição da comunidade do que as adições individualizadas, devido à ação sinérgica dos nutrientes.

3 – o enriquecimento com nutrientes favorecerá a ocorrência do metabolismo autotrófico porque, embora a eutrofização favoreça tanto os produtores primários quanto os microorganismos heterotróficos, o metabolismo que tende a ser favorecido em eventos de enriquecimento por nutrientes é o autotrófico.

O objetivo geral da tese foi verificar via experimentos em mesocosmos *in situ*, os efeitos do incremento de nutrientes (nitrogênio e fósforo inorgânicos) sobre a estrutura (densidade e diversidade) e dinâmica (alterações nas populações ao longo do tempo) da comunidade fitoplanctônica da lagoa de Iquiparí.

Considerando a importância do metabolismo aquático para um melhor entendimento sobre a eutrofização, o estudo também avaliou a respiração planctônica (fito- e bacterio-) na luz, e a produção primária bruta em unidades de carbono a partir de um novo método de determinação do metabolismo aquático. Nesse caso, espera-se obter respostas relacionadas ao metabolismo aquático e ao ciclo do carbono em lagoas costeiras.

A presente tese está estruturada em dois capítulos. O capítulo 1 trata da resposta da biomassa, densidade e composição da comunidade fitoplanctônica a adição de nutrientes. O capítulo 2 aborda o desenvolvimento de um novo método para a determinação do metabolismo aquático e avalia o balanço metabólico após a adição de nutrientes. Além dos capítulos, há às considerações finais e a conclusão.

CAPÍTULO 1

EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO ARTIFICIAL DE NITROGÊNIO E FÓSFORO INORGÂNICOS SOBRE A COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA EM UMA LAGOA COSTEIRA: UM EXPERIMENTO EM MESOCOSMOS

1.1. Justificativa

Nas últimas décadas, devido à maior ocorrência da eutrofização antrópica, observa-se um aumento do número de estudos que abordam essa temática (Nixon, 2009), incluindo em suas avaliações, em grande parte, a resposta da comunidade fitoplanctônica (Das & Panda, 2010; Ogbuagu & Ayoade, 2012). Dentre os fatores reguladores dos organismos fitoplanctônicos, estima-se que as alterações físico-químicas da água sejam responsáveis por 90% da variação na densidade fitoplanctônica. Os 10% restantes estariam relacionados aos fatores biológicos, como competição e herbivoria (Ishaq & Khan, 2013).

Qual seria a importância em estudar a composição, biomassa e resposta da comunidade fitoplanctônica em relação ao incremento de nutrientes em ecossistemas aquáticos continentais? Estudos indicam que os processos de eutrofização podem causar impacto no clima global, na estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos, na qualidade da água, saúde e economia local (Vitousek *et al.*, 1997; Wang & Lu, 2004; Smith *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2011; O'Neil *et al.*, 2012). Devido à resposta da comunidade fitoplanctônica a alterações no ambiente aquático, a sua composição é uma importante ferramenta para o monitoramento e manejo desses ambientes (Das & Panda, 2010; Guo *et al.*, 2010; Palleyi *et al.*, 2011; Kankal & Warudkar, 2012; Ogbuagu & Ayoade, 2012; Ishaq & Khan, 2013).

Há várias décadas diferentes tipos de experimentos vêm sendo realizados, *in situ* e *ex situ*, a fim de se obter maior compreensão sobre as respostas da comunidade fitoplanctônica a enriquecimentos por nutrientes. A partir desses experimentos é possível identificar também o nutriente limitante, as diferentes relações tróficas, e a influência do sedimento sobre a coluna d'água. Além disso, é possível realizar testes para recuperar sistemas impactados (Reynolds, 1996; Lagus *et al.*, 2007). Esses experimentos podem englobar diferentes volumes de água, sendo realizados em pequena escala (< 1 m³), denominados microcosmos ou bioensaios, e em maior escala

(> 1.000 m³), denominados macrocosmos. Em escalas intermediárias a esses valores os experimentos são chamados de mesocosmos (UNESCO, 1991). As avaliações consistem basicamente em isolar uma área, ou incubar amostras de água em frascos. De acordo com o objetivo de estudo, podem ser controladas condições de luz, temperatura, salinidade e as comunidades que serão utilizadas. A maior parte dos estudos envolve a adição de nutrientes, principalmente N e P, mas também alguns abordam a diluição de nutrientes, simulando oligotrofia (Hecky & Kilham, 1988; Arocena *et al.*, 2003; Crossetti & Bicudo, 2005; Romo *et al.*, 2005; Marinho & Azevedo, 2007; Xu *et al.*, 2010; Mette *et al.*, 2011; Muhid *et al.*, 2013). A partir da realização de experimentos *in situ* e *ex situ* é possível obter informações preditivas que possam alertar para a prevenção de maiores impactos aos ecossistemas aquáticos auxiliando no manejo e conservação desses ecossistemas.

Ambientes que recebem elevadas concentrações de nutrientes tendem a aumentar a biomassa de poucas espécies, consideradas mais adaptadas as modificações, enquanto leva a morte de espécies menos adaptadas, diminuindo a biodiversidade do ecossistema aquático (Romo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010; Palleyi *et al.*, 2011; Tao, 2011; Kankal & Warudkar, 2012; Katsiapi *et al.*, 2012). Essa resposta da comunidade pôde ser observada através de experimentos realizados em mesocosmos. Nesse caso, foram observadas alterações na diversidade após o enriquecimento de nutrientes: a biomassa algal aumentou, chegando até a incrementar a biodiversidade inicial. Entretanto, ao final, esta diminuiu (Guo *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2013).

Com base em monitoramentos realizados, observa-se que em resposta ao enriquecimento por nutrientes nos ecossistemas aquáticos, algumas espécies fitoplanctônicas, denominadas dominantes, são capazes de se adaptar a ambientes poluídos e ser amplamente distribuídas por resistirem a distúrbios. Por exemplo, em condições desfavoráveis, o aumento da biomassa de espécies dominantes pode ocorrer mesmo com o declínio das concentrações de OD (Alvarez-Góngora & Herrera-Silveira, 2006; Guo *et al.*, 2010). Por isso, algumas espécies são conhecidas pela sua tolerância à poluição, como algumas pertencentes à classe Euglenophyceae (*Euglena* spp.) e Chlorophyceae como *Dicloster acutus* e *Pediastrum* sp. associadas normalmente a águas poluídas com elevada disponibilidade de matéria orgânica (Ndebele-Murisa *et al.*, 2010; Katsiapi *et al.*, 2012; Chopra *et al.*, 2013). As cianobactérias, grupo responsável por grande parte dos “blooms algais” (rápido aumento ou acumulação de uma população algal em um sistema aquático) apresentam

também preferência por esses tipos de ambientes. Entretanto, esse grupo pode dominar também em ambientes com baixa concentração de nutriente (Soares *et al.*, 2012), como as espécies *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, por serem capazes de fixar N atmosférico (Dokulil & Teubner, 2000; Crossetti & Bicudo, 2005; Qin *et al.*, 2013). Em eventos de eutrofização, pode ocorrer também mudança de espécies características de boa qualidade da água (como pequenas diatomáceas cêntricas) para cianobactérias (Katsiapi *et al.*, 2011). No reservatório Marathonas na Grécia, avaliado por Katsiapi *et al.*, 2011, embora em termos de biovolume os resultados obtidos apresentassem bons indicadores de qualidade de água, a alta contribuição de cianobactérias, características de ambientes eutróficos como *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena bergii* sugeriu a ocorrência de uma qualidade da água ruim.

Em relação às lagoas costeiras, embora seja conhecida a importância desses ecossistemas, poucos estudos descrevem as comunidades aquáticas nesses ambientes no Brasil (Branco *et al.*, 2008). Além disso, a resposta da comunidade fitoplanctônica ao incremento de nutrientes também é pouco avaliada. Até meados de 2014, apenas nove estudos realizaram experimentos com adição de nutrientes em lagoas costeiras no Brasil (Kozlowsky-Suzuki & Bozelli, 2002; Guariento, *et al.*, 2010; Hennemann & Petrucio 2010; Marotta, *et al.*, 2010; Carlsson *et al.*, 2012; Fonte *et al.*, 2012; Marotta *et al.*, 2012; Carneiro, *et al.*, 2013; Peixoto, *et al.*, 2013). Os dados foram obtidos a partir de um levantamento dos artigos publicados em um site de busca “Google Acadêmico” utilizando as palavras-chave: coastal lagoon, nutrient, mesocosm, phytoplankton e Brazil. Dos nove trabalhos, somente dois avaliaram a composição da comunidade fitoplanctônica, enquanto os demais realizaram a avaliação apenas da biomassa fitoplanctônica na forma de clorofila-*a*.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo verificar via experimentos em mesocosmos *in situ*, os efeitos do incremento de nutrientes (N e P inorgânicos) sobre a estrutura (densidade e diversidade) e dinâmica (alterações nas populações ao longo do tempo) da comunidade fitoplanctônica da lagoa de Iquiparí.

O trabalho testou as hipóteses de que: a densidade, biomassa e composição da comunidade fitoplanctônica devem ser positivamente correlacionadas com a adição de nutrientes. A adição combinada dos nutrientes resultará em maior biomassa, densidade e modificações na composição da comunidade fitoplanctônica do que as adições isoladas em função da ação sinérgica dos nutrientes.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Após uma única adição de nutrientes verificar a variação temporal, durante os 10 dias de experimento das condições físico-químicas da coluna d'água dos mesocosmos por meio de: temperatura, pH, salinidade, OD, alcalinidade total e concentrações de nutrientes particulados e dissolvidos;
- Verificar o nutriente limitante ao crescimento fitoplanctônico e as possíveis alterações na estrutura da comunidade devido ao enriquecimento nutricional artificial;
- Relacionar as variações da estrutura da comunidade fitoplanctônica com os fatores físico-químicos da água enriquecida e da água natural da lagoa durante o período de estudo.

1.3. Materiais e Métodos

1.3.1. Descrição do local

O presente estudo foi realizado em uma lagoa costeira, situada no norte do estado do Rio de Janeiro, município de São João da Barra, Brasil (latitudes 21°44'20" e 21°48'12"S, e longitudes 41°01'34" e 41°02'04"O). A lagoa de Iquiparí está inserida na Reserva Particular de Patrimônio Natural Fazenda Caruara podendo ainda ser considerada um ecossistema pouco impactado.

Esse ambiente aquático encontra-se geologicamente sobre depósitos sedimentares flúvio-marinhos quaternários, que têm sua gênese relacionada ao processo de formação do delta do rio Paraíba do Sul (Lamego, 1955). A lagoa apresenta 10 km de extensão e regiões com diferentes características hidroquímicas. Entre os extremos é possível destacar uma região que está mais próxima à barra, porção norte, e que recebe maior influência marinha. A porção norte, em relação à

porção sul, apresenta também maior distância de uma margem à outra (cerca de 100 m de largura), predominando na região um metabolismo autotrófico. Nesta região foi estabelecido um local de experimentação denominado como Ponto 1 (21°44'42" S e 41°01'38" O). No outro extremo, o Ponto 2 (21°48'23" S e 41°01'51" O) (Figura 1.1), na porção sul, localiza-se numa região que apresenta margens mais próximas (cerca de 50 m de largura) e a bacia de drenagem é recoberta por vegetação de restinga. As águas ali presentes são ricas em substâncias húmicas, recebem grande influência de origem terrestre com significativo aporte de matéria orgânica alóctone (Suzuki *et al.*, 2002), predominando um metabolismo heterotrófico.

A bacia de drenagem da lagoa é utilizada para monocultura da cana-de-açúcar ou lavoura de subsistência, pasto e apresenta também áreas com vegetação de restinga. A região onde está inserida a lagoa apresenta períodos de maior precipitação entre os meses de novembro a janeiro e o clima da região é caracterizado como tropical sub-úmido seco. O volume total anual de chuva nos últimos dez anos variou entre 800 a 1.200 mm (UFRRJ, Campus Campos dos Goytacazes) com temperatura média em torno de 24°C. A baixa incidência de chuvas nos meses de maio a agosto (média anual dos últimos nove anos nesse período igual a 36 mm) caracteriza o período seco da região, enquanto que os meses de dezembro a março (média anual dos últimos nove anos nesse período igual a 113 mm) caracterizam-se como período chuvoso. No ano de 2013, período dos experimentos, a precipitação média anual foi de 1.291 mm, com a maior precipitação pluviométrica média no mês de março (300 mm) (UFRRJ, Campus Campos dos Goytacazes). O solo da região é arenoso, pobre em nutrientes, de fácil percolação, facilitando o aporte de nutrientes (muitas vezes adicionado nas culturas ao redor da lagoa para incrementar a produção) das áreas mais elevadas para o sistema aquático (Suzuki *et al.*, 2002).

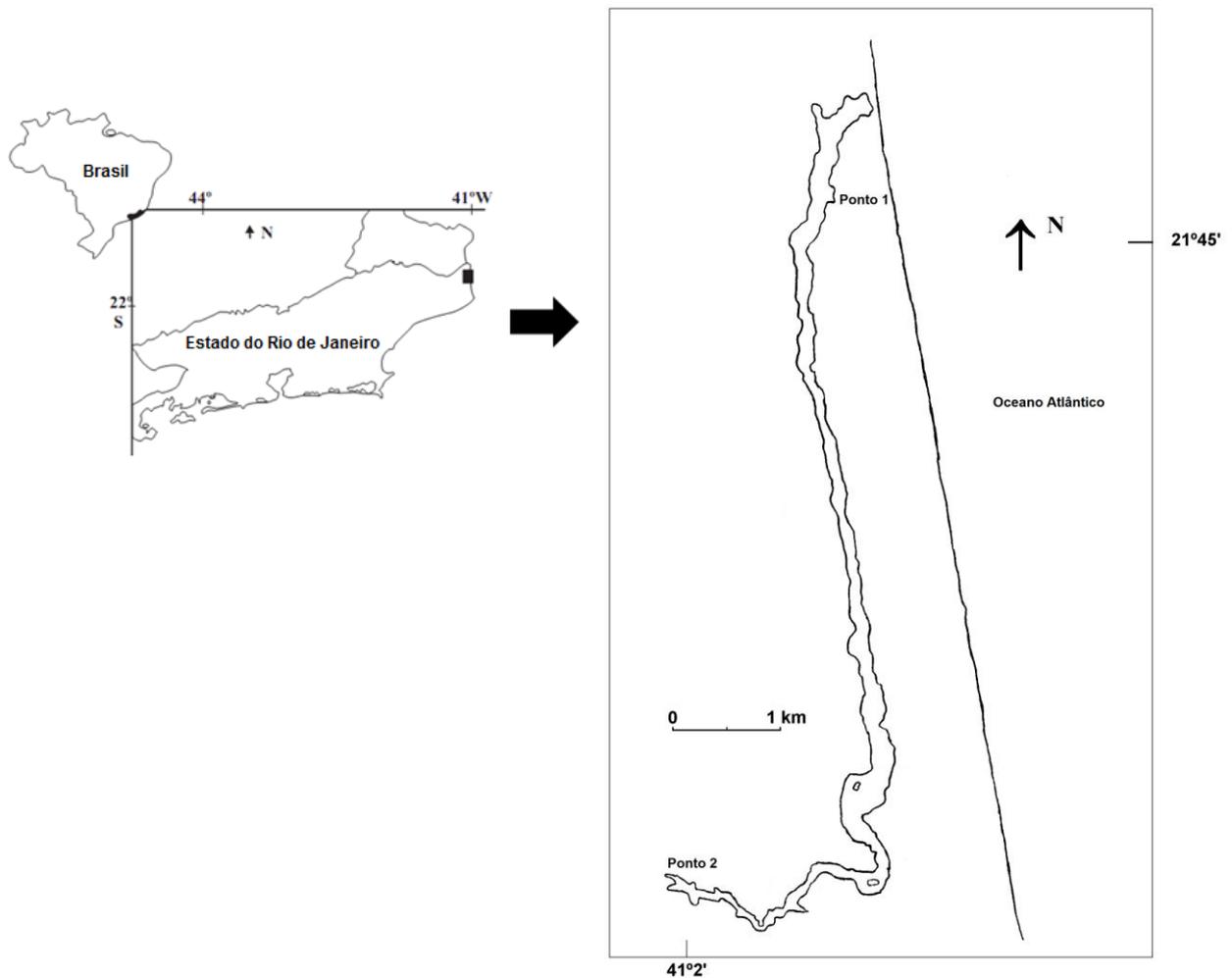


Figura 1.1. Mapa da lagoa de Iquipará, com a localização dos dois pontos amostrais.

1.3.2. Desenho experimental

1.3.2.1. Mesocosmos

Antes da realização dos experimentos, dois experimentos pilotos utilizando os mesocosmos foram realizados no Ponto 1. O primeiro foi realizado em um período seco (precipitação pluviométrica média igual a 20,6 mm em agosto de 2011) e o outro em um período chuvoso (precipitação pluviométrica média igual a 177 mm em janeiro de 2012) (INMET, Estação Campos São Tomé). Esses experimentos foram realizados a fim de determinar o período total de experimento, a periodicidade das coletas, além de verificar a adequação do enriquecimento nutricional. Nesta etapa foi realizado apenas o experimento com as adições dos nutrientes, referente ao Capítulo 1 da tese. Durante os experimentos pilotos foi possível observar que os dez dias foram suficientes para a comunidade fitoplanctônica responder a adição dos nutrientes, alterando a biomassa e

as características físico-químicas da água, principalmente devido ao curto ciclo de vida das comunidades estudadas (Grossart, 2010; Winder & Cloern, 2010).

Os experimentos em mesocosmos do presente estudo foram realizados nos dois pontos anteriormente descritos no período compreendido entre os dias 8 a 17 de março de 2013 no Ponto 1, e de 2 a 11 de abril de 2013 no Ponto 2. A operacionalização de experimentos concomitantes foi impossibilitada em função da distância entre os Pontos 1 e 2, de cerca de 6 km. O período dos experimentos compreendeu o final do período considerado chuvoso, permitindo uma melhor manipulação dos experimentos devido a maior profundidade da coluna d'água e estabilidade hidrodinâmica, principalmente no Ponto 2, de mais difícil acesso.

Os mesocosmos, constituídos de caixas plásticas, com dimensões iguais a 38,5 cm de altura, 37,1 cm de largura e 39,5 cm de comprimento, totalizando 56 L foram amarrados a bambus fixados no sedimento e mantidos flutuantes nos pontos de experimentação isolando o sedimento (Figura 1.2). Após a instalação dos mesocosmos a água da lagoa total (sem nenhum processo de filtração) foi colocada cuidadosamente em cada mesocosmo com o auxílio de um balde até completar o volume de 40 L. Em um primeiro momento, a fim de determinar as concentrações dos nutrientes na lagoa, dois dias antes da realização de cada experimento pela parte da manhã foi realizada coleta de amostra de água (Ct0).

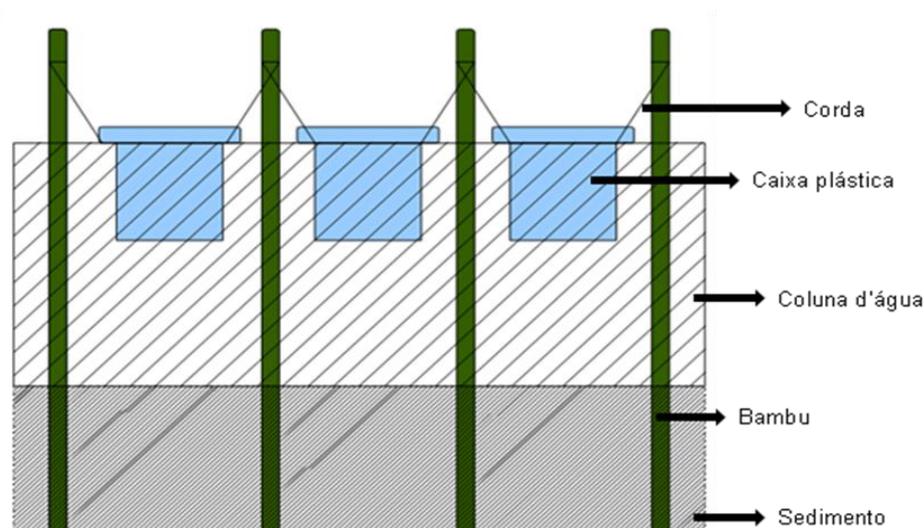


Figura 1.2. Esquema dos mesocosmos (caixas plásticas) amarrados a bambus que foram fincados no sedimento da lagoa. Os mesocosmos isolaram o sedimento.

As adições dos nutrientes NH_4NO_3 e KH_2PO_4 foram realizadas em concentração cinco vezes maior do que as encontradas na água da lagoa (Tabela 1.1).

Esse nível de enriquecimento foi escolhido, pois é semelhante àqueles encontrados em lagoas costeiras brasileiras eutrofizadas, como observado por Fonseca (2002), Souza *et al.* (2003), Fonseca (2006) e Andrade *et al.* (2012). As concentrações de nutrientes obtidas nesses estudos apresentaram variações entre 0,1 e 58 μM de N-amoniaco, nitrato entre 0,03 e 14 μM , e ortofosfato variando entre 0,1 e 4,5 μM .

Os tratamentos foram compostos pelas seguintes condições experimentais: adição somente de N (N); adição somente de P (P); e adição combinada de N e P (NP); além do controle (controle) - água da lagoa sem adição de nutrientes (Tabela 1.1). Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando doze mesocosmos em cada ponto amostral (Figura 1.3).

Tabela 1.1: Composição dos enriquecimentos nutricionais (N e P) utilizados nos mesocosmos.

	Código	n	Água da lagoa no início dos experimentos (μM)	
			Ponto 1	Ponto 2
Água da lagoa dois dias antes dos experimentos	Ct0	----	11(NH_4^+), 0,1 (NO_3^-) e 0,6 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)	25 (NH_4^+), 3,5 (NO_3^-) e 5,5 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)
Reagente	Código	n	Enriquecimentos (μM)	Enriquecimentos (μM)
			Ponto 1	Ponto 2
Nenhum	Controle	3	-----	-----
NH_4NO_3	N	3	55 (NH_4^+) + 0,5 (NO_3^-)	125 (NH_4^+) + 17,5 (NO_3^-)
KH_2PO_4	P	3	3 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)	27,5 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)
NH_4NO_3 KH_2PO_4	NP	3	55 (NH_4^+) + 0,5 (NO_3^-) 3 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)	125 (NH_4^+) + 17,5 (NO_3^-) 27,5 ($\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$)

As adições dos nutrientes ocorreram apenas uma vez, no início de cada experimento que tiveram a duração de 10 dias. Apenas durante o segundo experimento, no Ponto 2, ocorreu precipitação pluviométrica, nos dias 3 e 4 de abril, com 1 e 6 mm de chuva, respectivamente (INMET, Estação Campos São Tomé).



Figura 1.3. Fotos das disposições dos mesocosmos no Ponto 1, a esquerda e no Ponto 2, a direita.

1.3.2.2. Amostragem

Cerca de 600 mL de amostra de água foram coletadas em cada mesocosmos no 1°, 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dias para determinar a alcalinidade total (Gran, 1952 – titulador Mettler DL-21), concentração de clorofila-*a*, nutrientes dissolvidos e particulados. As coletas foram realizadas utilizando garrafas de polietileno (capacidade de 2 L) no meio da coluna d'água de cada mesocosmo, a aproximadamente 20 cm de profundidade. As amostras dissolvidas utilizadas para análises dos nutrientes foram filtradas em filtros GF/F (47 mm) com o auxílio de uma bomba a vácuo.

Valores de temperatura da água e pH (pHmetro portátil Metrohm 826, resolução 0,001), condutividade elétrica (condutivímetro portátil WTW 350, resolução 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$, precisão $\pm 0,5\%$) e oxigênio dissolvido (oxímetro portátil YSI 55, resolução 0,01 mg L^{-1} , precisão igual a $\pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$) foram medidos *in situ* em todos os dez dias de experimento no meio da coluna d'água de cada mesocosmo, aproximadamente a 20 cm de profundidade nos dois pontos estudados. Um resumo com os horários de cada medição pode ser observado a seguir.

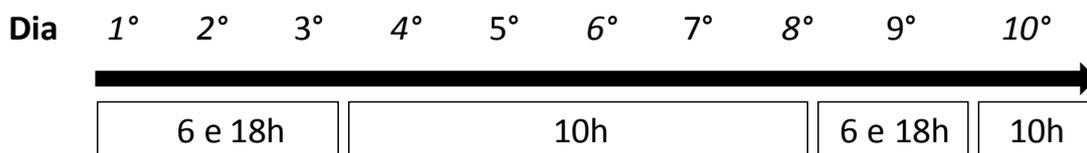


Figura 1.4. Fluxo esquemático indicando os horários de cada medição ao longo dos 10 dias de experimento. Os dias em que foram realizadas coletas de água estão destacados em itálico.

As amostras para análise quantitativa do fitoplâncton foram coletadas em subsuperfície em cada mesocosmos diretamente da coluna d'água às 10 horas ou às

18 horas, dependendo do dia de coleta (Figura 1.4). As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro neutro e imediatamente fixadas com lugol acético (Vollenweider, 1974). Algumas amostras também foram coletadas para análise qualitativa utilizando-se uma rede de plâncton do tipo cilindro – cônica com malha 20 μm e abertura de 30 cm de diâmetro de boca - através de arrasto horizontal na superfície da lagoa (no 1° e 10° dia de experimento) e em cada mesocosmo no último dia de experimento. As amostras de rede foram imediatamente fixadas com solução de lugol e utilizadas para auxílio na identificação dos organismos, e também para sanar possíveis dúvidas acerca da identificação das espécies registradas.

Para acompanhar o estabelecimento do perifíton uma folha plástica foi fixada no fundo de cada mesocosmo com auxílio de fita adesiva. A coleta foi realizada somente no último dia de experimento, 10° dia. Parte da folha plástica foi cortada e colocada em um frasco de vidro contendo 50 mL de água deionizada. No laboratório as amostras contidas nas folhas plásticas foram raspadas com auxílio de uma espátula e sua área medida. A água contendo o perifíton foi filtrada e o material particulado foi utilizado para a determinação da biomassa perifítica por meio de clorofila-a.

1.3.3. Determinações Químicas

1.3.3.1.1. Clorofila-a

A clorofila-a total associada ao material particulado foi extraída em acetona 90% durante 24 horas, no escuro, a partir de filtros triturados com o auxílio de uma espátula, com 7 mL do extrator em tubos falcon (15 mL). Após este período, os tubos foram centrifugados (centrífuga Excelsa Baby II) durante 20 minutos (~3000 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 & Humphrey (1975). Para a biomassa perifítica na forma de clorofila-a os resultados foram obtidos em $\mu\text{g cm}^{-2}$, utilizando as fórmulas propostas por Parsons *et al.*, (1984) modificadas para perifíton:

$$\text{Clorofila- } a = 11,85 \times A_{665} - 1,54 \times A_{647} - 0,08 \times A_{630}$$

$$\mu\text{g cm}^{-2} = \frac{C_x \times v}{AR \times p}$$

Onde: A_x = absorvância no comprimento de onda x , sendo A_{665} , A_{647} , A_{630} corrigidos com $1 \times A_{750}$.

C_x = valor obtido para clorofila- a ;

v = volume de acetona;

AR = área raspada;

p = passo óptico da cubeta.

1.3.3.1.2. C, N e P na fração particulada

O C e o N total particulado foram determinados através de um analisador elementar CHNS/O (Perkin Elmer, modelo 2400 Series II). O P 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 foi medida a 885 nm por espectrofotometria (Carmouze, 1994).

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.

1.3.3.1.3. Nutrientes na fração dissolvida

Para análises de nitrato, nitrito e ortofosfato foram utilizados o cromatógrafo de íons Metrohm, modelo 861 Advanced Compact IC (análises de ânions e cátions) detector de condutividade, e o modelo 844 UV/VIS Compact IC (analisa nitrito e nitrato em concentração menor), detector de UV/VIS. A sílica solúvel reativa foi realizada através do método colorimétrico, por oxidação com molibdato de amônio, ácido sulfúrico, ácido oxálico e ácido ascórbico por espectrofotometria. O N-amoniaco foi determinado pelo método colorimétrico e leitura em espectrofotômetro (Carmouze, 1994).

O P-total dissolvido foi determinado através da oxidação/digestão de amostras, através da oxidação com persulfato de potássio e digestão em autoclave e, posteriormente, já em temperatura ambiente, adicionando-se solução de ácido ascórbico e solução ácida de molibdato de amônio para realização de medida colorimétrica em espectrofotômetro UV/VIS de duplo feixe (Carmouze, 1994).

1.3.3.2. Comunidade Fitoplanctônica

1.3.3.2.1. Análise qualitativa

A análise qualitativa da comunidade fitoplanctônica foi realizada através da utilização das amostras de rede fixadas com solução de lugol, e também através das amostras de contagem, após estas serem analisadas quantitativamente.

Para identificação dos táxons e obtenção da lista de espécies foi utilizado o microscópio ótico Zeiss Axioplan 350 C com aumento de até 1000 vezes, equipado com câmara clara e ocular de medição e microscópio invertido Zeiss 135 Axiovert, com aumento de 400 vezes. Os organismos foram identificados com auxílio de material bibliográfico especializado, analisando-se características morfológicas e morfométricas da vida vegetativa.

1.3.3.2.2. Análise quantitativa

1.3.3.2.2.1. Densidade fitoplanctônica

A contagem do fitoplâncton foi realizada a partir da sedimentação de subalíquotas das amostras coletadas utilizando-se câmara de sedimentação de Uthermöhl (Uthermöhl, 1958) em microscópio invertido Zeiss 135 Axiovert, com aumento de 400 vezes, após um tempo mínimo de sedimentação de 12 horas. O volume sedimentado (entre 5 e 25 mL) foi dependente da densidade de organismos na amostra.

O procedimento de contagem escolhido foi o dos campos aleatórios, descritos por Uehlinger (1964). As coordenadas dos campos foram geradas por computador e os campos localizados na platina do microscópio. O número de campos aleatórios a serem contados (de 25 a 100) foi dependente do número de organismos de uma mesma amostra encontrados em um campo de observação. O critério utilizado para determinação do número de campos a serem contados foi o que procura alcançar 100 indivíduos da espécie mais abundante. De acordo com Lund *et al.* (1958), isto permite

trabalhar com intervalos de confiança de +/- 20 % da média, a um nível de significância de 95 %, o que é considerado como suficiente para estudos desta natureza. Durante a contagem, cada célula, colônia, cenóbio ou filamento foi considerado como um indivíduo.

Os resultados foram expressos em indivíduos por unidade de volume (mL), calculado pela fórmula modificada de Wetzel & Likens (1979):

$$N = n \times \frac{A}{a} \times \frac{1}{V}$$

Onde: N = Número de células (ou indivíduos) por mL
 n = número de células (ou indivíduos) contadas
 A = Área total da câmara
 a = área contada (número de campos x área do campo)
 V = Volume total sedimentado

1.3.3.2.2.2. Biovolume

Para obtenção dos valores da biomassa celular fitoplanctônica foram estimados os volumes celulares das algas encontradas, utilizando-se o método de transformação das células em figuras geométricas tridimensionais proposto por Edler (1979). De acordo com Margalef (1983), multiplicando-se os valores numéricos de uma dada espécie pelo volume médio de sua célula, obtém-se um valor aproximado da sua biomassa.

Na determinação dos volumes celulares foram medidos cerca de 20 indivíduos das espécies mais abundantes para cada tratamento descrito acima. Já para os táxons menos abundantes foram medidos pelo menos 40 indivíduos ao longo de todos os tratamentos durante todo o período de estudo. As medidas foram obtidas utilizando-se o microscópio óptico comum equipado com câmara ocular de medição e o microscópio invertido também equipado com câmara ocular micrométrica. As médias aritméticas obtidas de cada espécie foram então multiplicadas pelos seus resultados obtidos na contagem do número de indivíduos estimando-se os biovolumes de todos os táxons sendo os resultados expressos em μm^3 .

1.4. Análise dos dados

Devido à possibilidade de evaporação durante os 10 dias de experimento os resultados obtidos foram corrigidos de acordo com a salinidade em cada mesocosmo ao longo dos dias a partir da multiplicação da concentração obtida pela razão salinidade inicial:final.

Estatística descritiva como média e desvio padrão foram utilizados para expressar os resultados. Todos os dados obtidos foram comparados através de análise de variância (ANOVA). Os resultados significativos da ANOVA foram distinguidos com o teste de Tukey-Kramer. Em caso de variâncias desiguais foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e *a posteriori* de Dunn. Todos em nível de significância (α) = 0,05.

Correlações de Spearman e Pearson foram utilizadas entre as variáveis: nutrientes dissolvidos, nutrientes particulados, clorofila-*a* e também em relação à fotossíntese, respiração e produção primária, $\alpha = 0,05$. Estes foram selecionados de acordo com as variâncias dos resultados comparados. Para variâncias iguais foi utilizada a correlação de Pearson e desiguais foi utilizada a correlação de Spearman (Software Statistica 7).

As análises multivariadas, Análise dos Componentes Principais (ACP) e Análise de Correspondência Canônica (ACC) foram realizadas através do software PC-ORD versão 5.0. A ACP foi utilizada para avaliar agrupamentos de variáveis abióticas que poderiam caracterizar diferentes tratamentos e a ACC foi utilizada para explicar as possíveis relações entre a comunidade fitoplanctônica e as variáveis ambientais. Para obtenção das matrizes de covariância, os resultados das variáveis foram transformados em “logaritmo natural + constante” [$\log(X+1)$]. O coeficiente de correlação adotado foi o de Pearson e Kendall (r), que resulta da relação entre os valores da ordenação, ou seja, posição das unidades na construção da ordenação. Para realizar a análise de ACC foram construídas duas matrizes, a matriz principal com os o número de indivíduos pertencentes às classes da comunidade fitoplanctônica e a matriz secundária contendo os dados abióticos. A significância dos dois principais eixos canônicos foi avaliada utilizando o teste de Monte Carlo (999 permutações; $p < 0,05$).

1.5. Resultados

1.5.1. Parâmetros físico-químicos

A água da lagoa, Ct0, caracterizou-se por pH básico (igual a 8,0) no Ponto 1, e ácido (igual a 6,7) no Ponto 2. O Ponto 1 apresentou salinidade maior (8,0) do que o Ponto 2 (1,1). As águas apresentavam-se pouco oxigenadas na parte da manhã, abaixo de 30% de saturação, e com alcalinidade elevada, maior que 3 mEq L⁻¹ em ambos os pontos. Com o aprisionamento da água nos mesocosmos ocorreu incremento significativo do pH e OD em ambos os pontos (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos nos dois pontos experimentais (n = 3). Para Ct0, foi realizada apenas uma medição no primeiro dia de experimento. As letras diferentes indicam se ocorreu diferença estatística entre os tratamentos.

Ponto 1	Ct0	Controle	N	P	NP
T (°C)	28	28±1,3	28±1,3 ^A	28±1,3 ^A	28±1,3 ^A
pH	8,00	8,79±0,1 ^A	8,79±0,1 ^A	8,81±0,2 ^A	9,03±0,2 ^B
OD (mg L ⁻¹)	2,2	6,2±0,9 ^A	6,4±1,0 ^A	6,6±1,0 ^A	7,6±1,0 ^A
Salinidade	8,07	9,74±1,6 ^A	8,76±1,5 ^A	8,85±1,6 ^A	8,74±1,6 ^A
Alc (mEq L ⁻¹)	4,59	4,35±0,1 ^A	4,5±0,1 ^A	4,62±0,1 ^A	4,37±0,1 ^A
Ponto 2	Ct0	Controle	N	P	NP
T (°C)	25	26±0,4 ^A	26±0,4 ^A	26±0,4 ^A	26±0,4 ^A
pH	6,7	8,23±0,3 ^A	8,47±0,3 ^A	8,28±0,3 ^A	8,88±0,6 ^A
OD (mg L ⁻¹)	0,9	2,3±0,1 ^A	2,6±0,03 ^A	2,3±0,1 ^A	2,9±0,04 ^A
Salinidade	1,06	1,58±0,2 ^A	1,51±0,2 ^A	1,44±0,2 ^A	1,35±0,2 ^A
Alc (mEq L ⁻¹)	3,25	2,95±0,1 ^A	2,63±0,1 ^B	2,49±0,1 ^{ABC}	2,48±0,1 ^C

Entre os tratamentos, a temperatura da água não apresentou variação significativa, refletindo a temperatura da água da lagoa, com valores entre 25 - 30 °C e 25 - 29,5°C nos Pontos 1 e 2, respectivamente (Tabela 1.2). Para pH e OD, o tratamento NP apresentou os maiores valores médios, com valores de pH em ambos os pontos de até 9,5 e de OD de até 13,0 mg L⁻¹ no Ponto 1 e de até 4,5 mg L⁻¹ no Ponto 2 (Figura 1.5).

Em ambos os pontos os valores de OD não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos. O OD tendeu a apresentar os maiores valores no 2° dia de amostragem no Ponto 1 e ao final do 3° dia no Ponto 2. No Ponto 1 o pH médio variou entre 8,8 (controle e NP) a 9,5 (NP), com o tratamento NP diferindo estatisticamente dos demais (H; p<0,05). Neste ponto, como observado para OD, observaram-se os maiores valores de pH no 2° dia de experimento. No Ponto 2 os valores de pH variaram entre 7,4 (Controle) a 9,5 (NP), mas sem diferença significativa

(Tabela 1.2). Os valores de pH e OD foram mais elevados ao final dos dias (1°, 2°, 3° e 9°, às 18 horas) do que no início do dia (às 6 horas). Apesar de não diferentes estatisticamente, observou-se uma tendência de incremento nos valores de pH ao longo do experimento no tratamento NP; enquanto nos demais tratamentos, após o 3° dia, observou-se declínio (Figura 1.5).

Para temperatura e salinidade não foi observada diferença entre os tratamentos em ambos os pontos (Tabela 1.2). Com relação à alcalinidade, no Ponto 1, não se observou diferença entre os tratamentos. No Ponto 2 os tratamentos controle e N; e NP em relação ao controle e N ($H; p < 0,05$) apresentaram diferença estatística (Tabela 1.2).

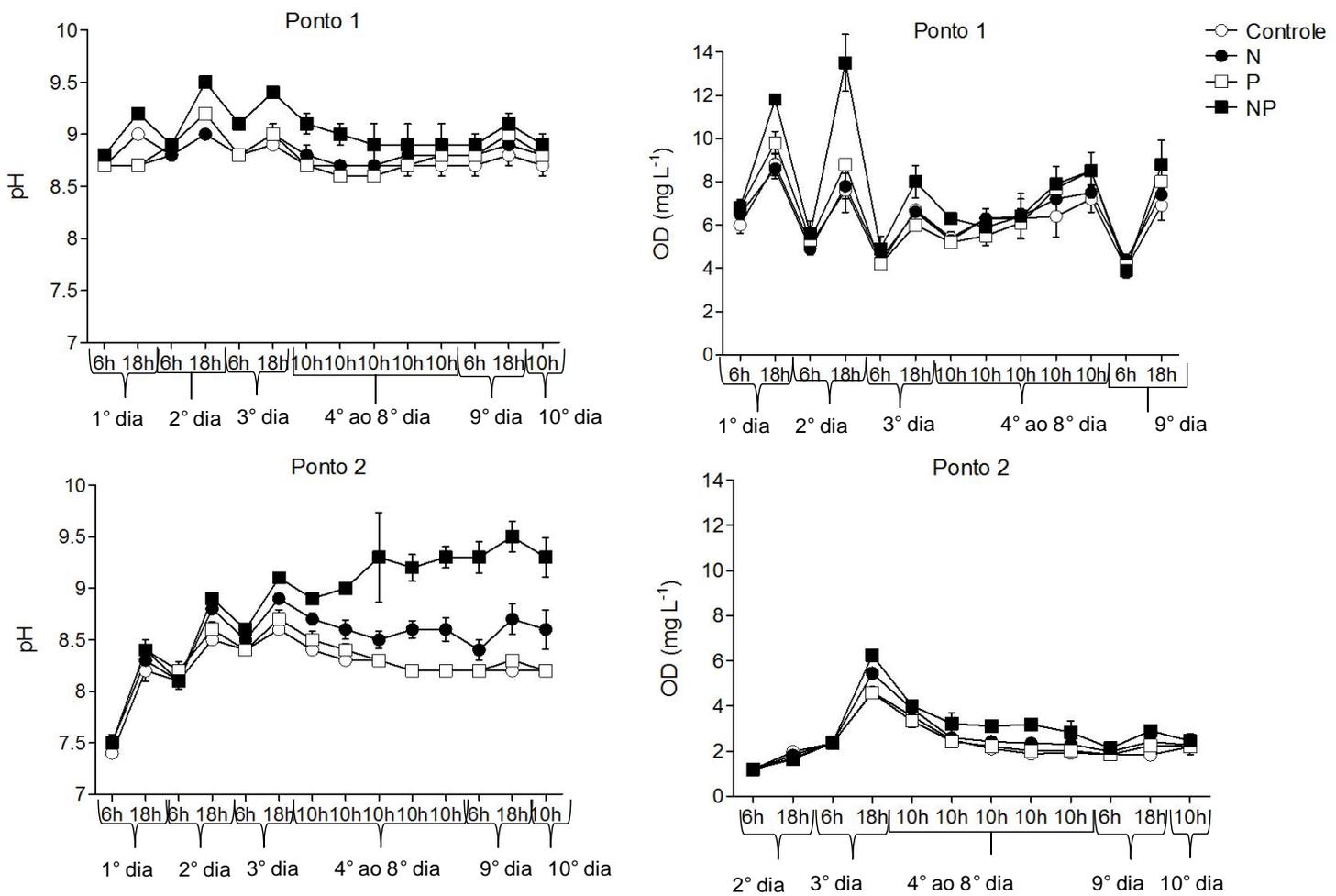


Figura 1.5. Variação média e desvio padrão do pH e OD (mg L^{-1}) ($n = 3$) ao longo dos 10 dias de experimento nos Pontos 1 e 2, às 6h, 10h e 18h.

1.5.2. Nutrientes

Em ambos os pontos onde foram realizados os experimentos, a variação na concentração de ortofosfato e N-amoniaco dentro dos mesocosmos foi abrupta já no primeiro dia nos mesocosmos enriquecidos (Figuras 1.6 e 1.7).

No Ponto 1, o ortofosfato apresentou diminuição de mais de 50% neste 1º dia. A partir do 4º dia observou-se valores de ortofosfato semelhantes entre todos os tratamentos, com média igual a $0,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$. As concentrações de P-total dissolvido apresentaram padrão semelhante às concentrações de ortofosfato e N-amoniaco. Os valores diminuíram cerca de 70% e 60% do 1º para o 2º dia nos tratamentos com adição de P (P e NP, respectivamente). Praticamente as concentrações nesses tratamentos se igualaram as concentrações médias dos demais tratamentos, que estiveram em torno de $1,5 \pm 0,3$ a $2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Figura 1.6). As concentrações de N-amoniaco apresentaram diminuição em torno de 80% e 98% nos mesocosmos enriquecidos com N (N e NP) do 1º dia de experimentação para o 2º dia. O tratamento N apresentou diferença estatística do controle e do tratamento P (H; $p < 0,05$). Por outro lado, os valores de nitrato (Figura 1.6) apresentaram incremento nestes mesmos tratamentos no 2º dia (N e NP), 8º dia (N) e 10º dia (NP) indicando a oxidação de grande parte do N-amoniaco a nitrato. Este mesmo nitrato, que chegou a apresentar concentração no 2º dia de até $38 \pm 9 \mu\text{M}$ nos tratamentos N e NP apresentou oscilação das concentrações ao longo dos dias. O tratamento N diferiu estatisticamente do controle e do tratamento P (H; $p < 0,05$). As concentrações de nitrito apresentaram um padrão consistente de incremento ao longo do tempo nos tratamentos enriquecidos com N. O silicato reativo apresentou padrão de diminuição de suas concentrações ao longo do tempo em todos os tratamentos, chegando a praticamente se esgotar nos tratamentos controle, N e P.

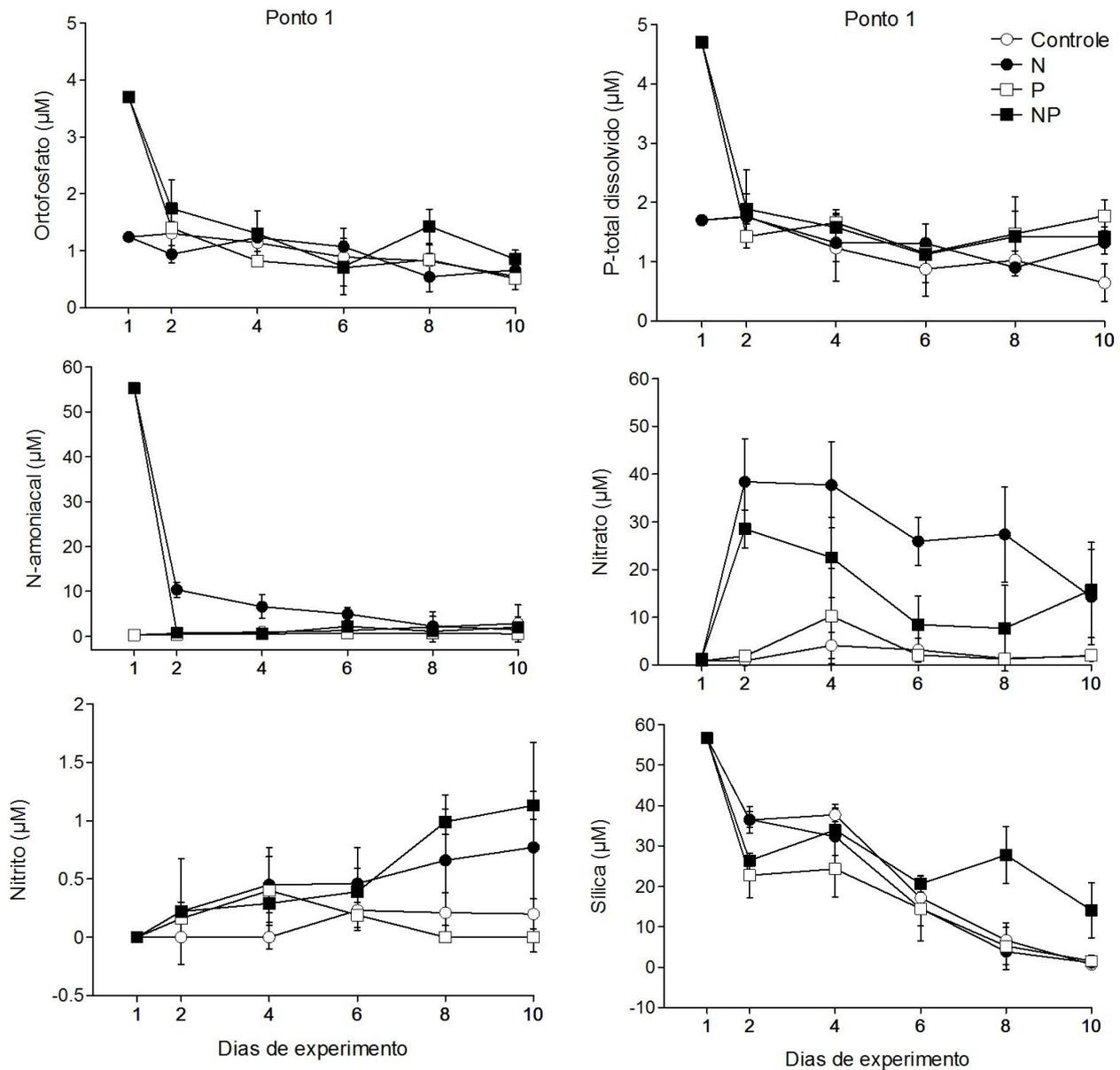


Figura 1.6. Média e desvio padrão dos nutrientes dissolvidos ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento no Ponto 1.

No Ponto 2, a queda nas concentrações de P-total dissolvido, ortofosfato e N-amoniacoal foram mais gradativas ao longo do experimento do que no Ponto 1. No Ponto 2 os tratamentos com adição de P (P e NP) apresentaram concentração de ortofosfato no 2º dia de experimento 88% maior do que o controle e o tratamento N. A partir do 4º dia ocorreu uma diminuição nas concentrações de ortofosfato, e o tratamento P manteve a concentração média em torno de $12 \pm 0,1 \mu\text{M}$ até o 10º dia, enquanto o tratamento NP apresentou maior diminuição ao longo do tempo, chegando a um valor médio de $3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ no 10º dia (Figura 1.7). O controle apresentou diferença

estatística para o tratamento P, enquanto o tratamento N diferiu estatisticamente dos tratamentos P e NP (H; $p < 0,05$). Com relação aos tratamentos que não receberam adição de ortofosfato, controle e tratamento N, estes apresentaram padrão semelhante de diminuição ao longo do tempo (Figura 1.7).

Os tratamentos P e NP apresentaram queda nas concentrações de P-total dissolvido iguais a 36% e 88% do 1° até o 10° dia de experimento, respectivamente. O controle e o tratamento N apresentaram concentração média máxima de $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ durante os dez dias (Figura 1.7). Os tratamentos P e NP apresentaram diferença estatística em relação ao controle e o tratamento N (H, $p < 0,05$). As concentrações de N-amoniaco apresentaram diminuição em torno de 85% e 74% nos mesocosmos enriquecidos com N (N e NP) do 1° dia de experimentação para o 2° dia. O tratamento N apresentou diferença estatística do controle e do tratamento P (H; $p < 0,05$). Como observado no Ponto 1, os valores de nitrato (Figuras 1.6 e 1.7) apresentaram incremento nestes mesmos tratamentos (N e NP) no 2° e 6° dia no Ponto 2 e também oscilação das concentrações ao longo dos dias. O tratamento N diferiu estatisticamente do controle e do tratamento P (H; $p < 0,05$). Com relação às concentrações de nitrito apenas o tratamento NP e em menor intensidade o tratamento N apresentaram aumento nas concentrações até o 6° dia de experimento. A concentração de nitrito foi deplecionada no controle no 6° dia. O silicato reativo apresentou cerca de 50% de diminuição em sua concentração, chegando ao mínimo de $13 \pm 2,2 \mu\text{M}$ no tratamento NP (Figura 1.7).

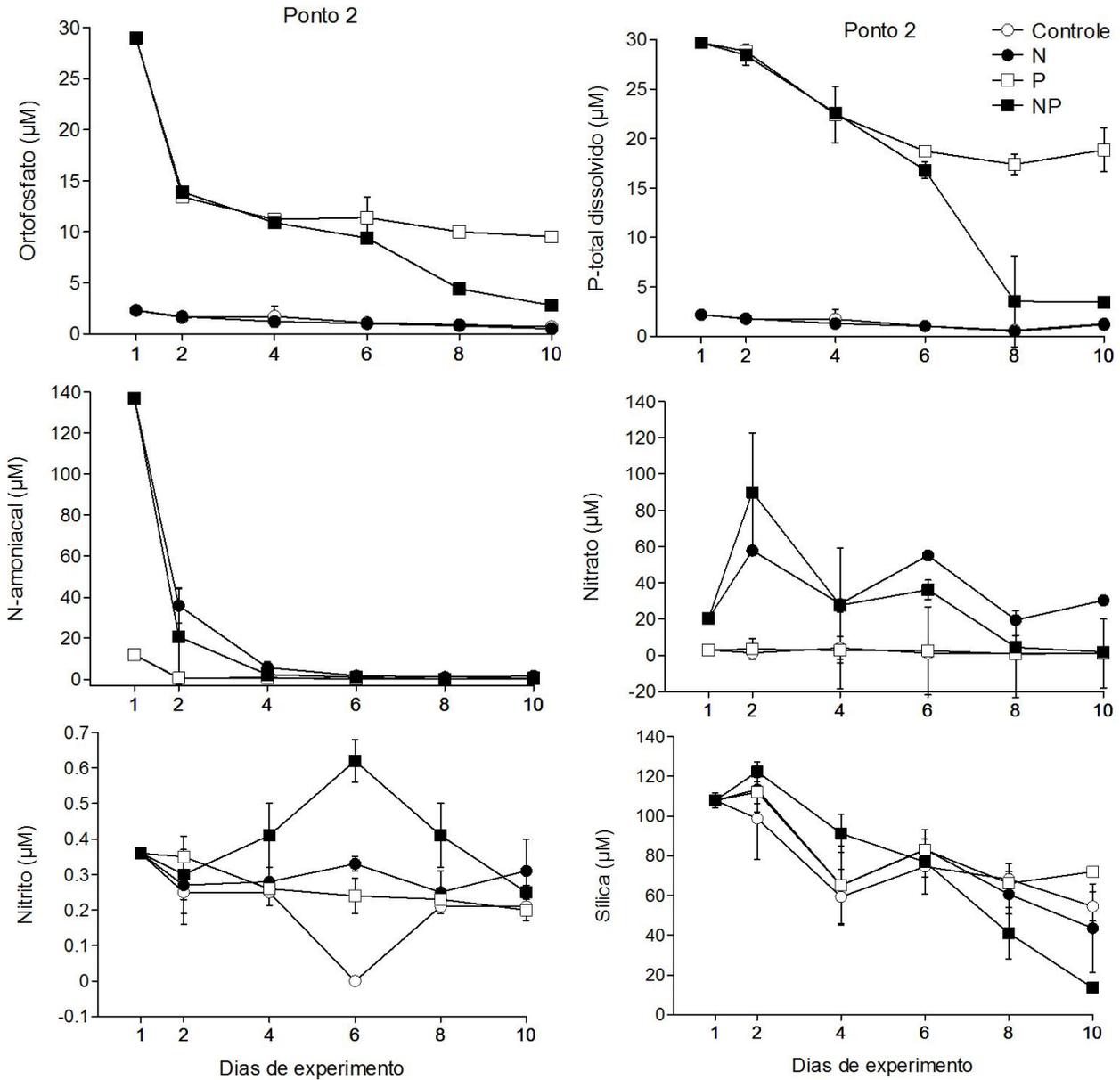


Figura 1.7. Média e desvio padrão dos nutrientes dissolvidos ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento no Ponto 2.

Em relação à fração particulada, no Ponto 1, as concentrações de P-particulado nos mesocosmos não apresentaram uma tendência clara ao longo do experimento, e os tratamentos P e N apresentaram as maiores variações. Ao longo dos dias de amostragem, o tratamento P apresentou valores médios variando de $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ a $3,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ enquanto o tratamento N apresentou valores médios entre $1,7 \pm 0,1$ a $4,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Figura 1.8). Pode-se observar, entre os tratamentos, tendência ao declínio nas concentrações ao longo do tempo, excetuando-se o 8º dia nos tratamentos

enriquecidos, que apresentaram os maiores valores neste dia. A maior concentração média de P-particulado ocorreu no tratamento NP (Figura 1.8).

O tratamento NP apresentou o maior valor médio de N-particulado, igual a $171 \pm 7 \mu\text{M}$. Esse tratamento apresentou tendência de incremento nos valores de N-particulado até o 8º dia, decaindo no 10º dia (queda de cerca de 41%). Neste 10º dia, também os tratamentos controle e N apresentaram valores médios menores que nos dias anteriores (Figura 1.8). Estes tratamentos e o tratamento P apresentaram oscilações pequenas nas concentrações de N-particulado ao longo do período experimental, em torno de 143, 145 e $132 \mu\text{M}$, respectivamente. Até o 8º dia, as concentrações de C-particulado variaram entre 903 a $1676 \mu\text{M}$, mas, no 10º dia, em todos os tratamentos, as valores aumentaram, para $3773 \mu\text{M}$ no controle, e aproximadamente $7100 \mu\text{M}$ nos tratamentos N, P e NP (Figura 1.8).

No Ponto 2, embora o tratamento NP tenha apresentado os maiores valores médios dos nutrientes particulados, para P-particulado, os valores apresentaram declínio gradativamente ao longo dos dias, chegando a uma média igual a $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$. Este mesmo padrão foi observado nos tratamentos N e P do 1º ao 10º dia. A queda dos valores de P-particulado foi em média de 77% para o tratamento NP e de 59% nos tratamentos N e P (Figura 1.8).

A tendência de declínio nos valores de N-particulado ao longo do experimento no Ponto 2 foi mais evidente nos tratamentos controle e P após o 2º dia, quando foram observados os maiores valores médios para estes tratamentos. Já os tratamentos NP e N apresentaram picos no 4º e 6º dias, respectivamente, e após, seguindo os demais tratamentos, apresentaram declínios chegando a valores próximos aos apresentados pelos demais tratamentos (Figura 1.8). O tratamento NP apresentou um pico de incremento nas concentrações de C-particulado no 4º dia. Com exceção do tratamento N, que apresentou um suave aumento nas concentrações de C-particulado entre o 4º e 8º dia, nos demais tratamentos ocorreram redução dos valores de C-particulado até o final do experimento (Figura 1.8). As concentrações de C-particulado apresentaram forte correlação com as concentrações de N-particulado ($r = 0,92$, $p < 0,0001$, Spearman).

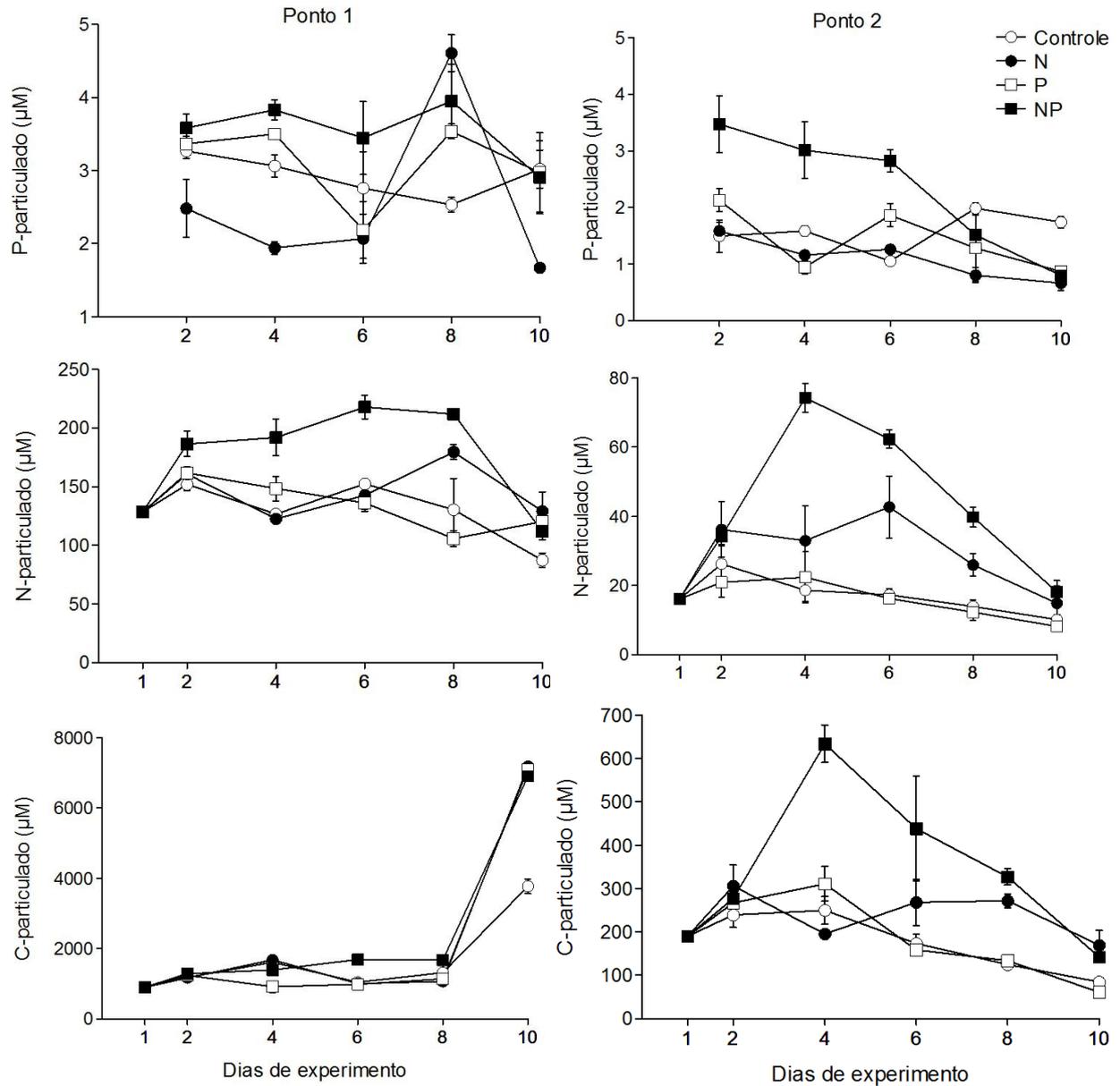


Figura 1.8. Média e desvio padrão das concentrações dos nutrientes particulados ($n = 6$) ao longo dos dez dias de experimento. Os gráficos da esquerda são referentes aos resultados obtidos no Ponto 1, e os da direita são referentes ao Ponto 2.

1.5.3. Comunidade fitoplanctônica: biomassa e estrutura

A biomassa fitoplanctônica medida como clorofila-*a* apresentou tendência de diminuição nos seus valores ao longo do tempo em ambos os pontos de experimentação em praticamente todos os tratamentos. Destaca-se a diferença entre as concentrações iniciais que aponta o Ponto 1 como mais produtivo, com valor inicial de $207 \mu\text{g L}^{-1}$ e o Ponto 2 com cerca de metade deste valor, $110 \mu\text{g L}^{-1}$. Apenas o

tratamento NP, em ambos os pontos, apresentou incremento significativo na concentração de clorofila-a em algum momento do experimento (2° dia no Ponto 1 – $231 \mu\text{g L}^{-1}$ e 4° dia no Ponto 2 - $417 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 1.9). No Ponto 2 as concentrações de N-particulado e C-particulado apresentaram forte correlação com as concentrações de clorofila-a ($r = 0,83$ e $0,87$, $p < 0,0001$, Spearman, respectivamente).

A relação entre clorofila-a e densidade fitoplanctônica não foi observada no Ponto 1, uma vez que as maiores densidades foram verificadas no tratamento N, tanto no 4° quanto no 10° dia, quando a densidade alcançou $36.167 \text{ ind mL}^{-1}$. No Ponto 2 a densidade fitoplanctônica (Figura 1.10) mostrou decréscimo ao longo do tempo em todos os tratamentos, diferindo do incremento de clorofila observado no tratamento NP no 4° dia. Os menores valores de densidade estiveram relacionados aos tratamentos controle e P, enquanto os maiores ao tratamento N no 4° dia e NP no 10° dia (Figura 1.10).

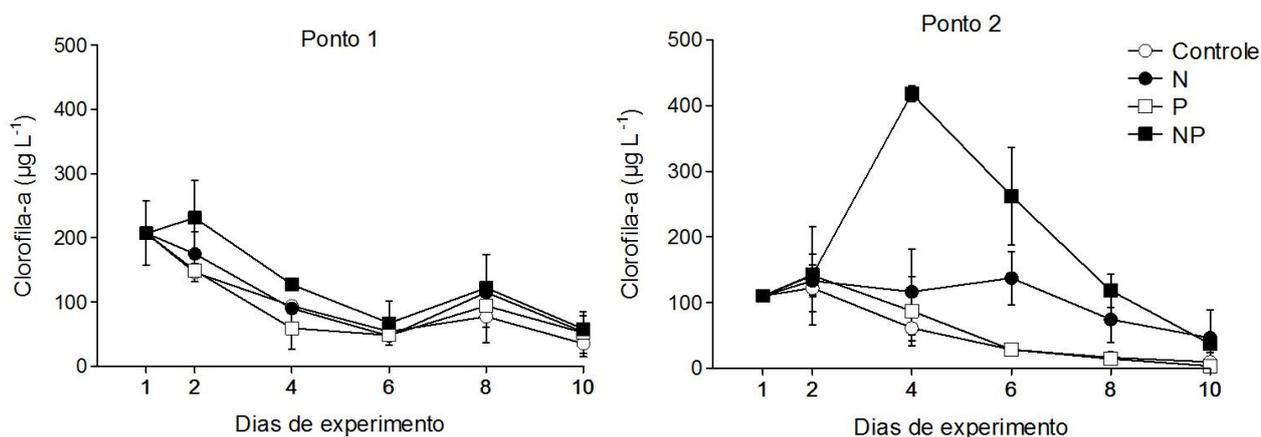


Figura 1.9. Média e desvio padrão da biomassa fitoplanctônica ($n = 6$) por meio da clorofila-a nos dias avaliados nos Pontos 1 e 2.

Nas águas iniciais (Ct0), em ambos os pontos, a comunidade fitoplanctônica era composta por 80% de Cyanophyceae, 18% por Bacillariophyceae e menos de 3% por Chlorophyceae e Cryptophyceae.

No Ponto 1 das Cyanophyceae destacaram-se com 76% do número de indivíduos. *Limnothrix sp.*, *Synechocystis aquatilis* e *Anabaenopsis elenkinii f. circularis* foram os táxons mais representativos. *Limnothrix sp.* representou 57% do número de indivíduos (Figura 1.10). No Ponto 2 *Aphanocapsa delicatissima* apresentou dominância de mais de 80% no número de indivíduos (Figura 1.10).

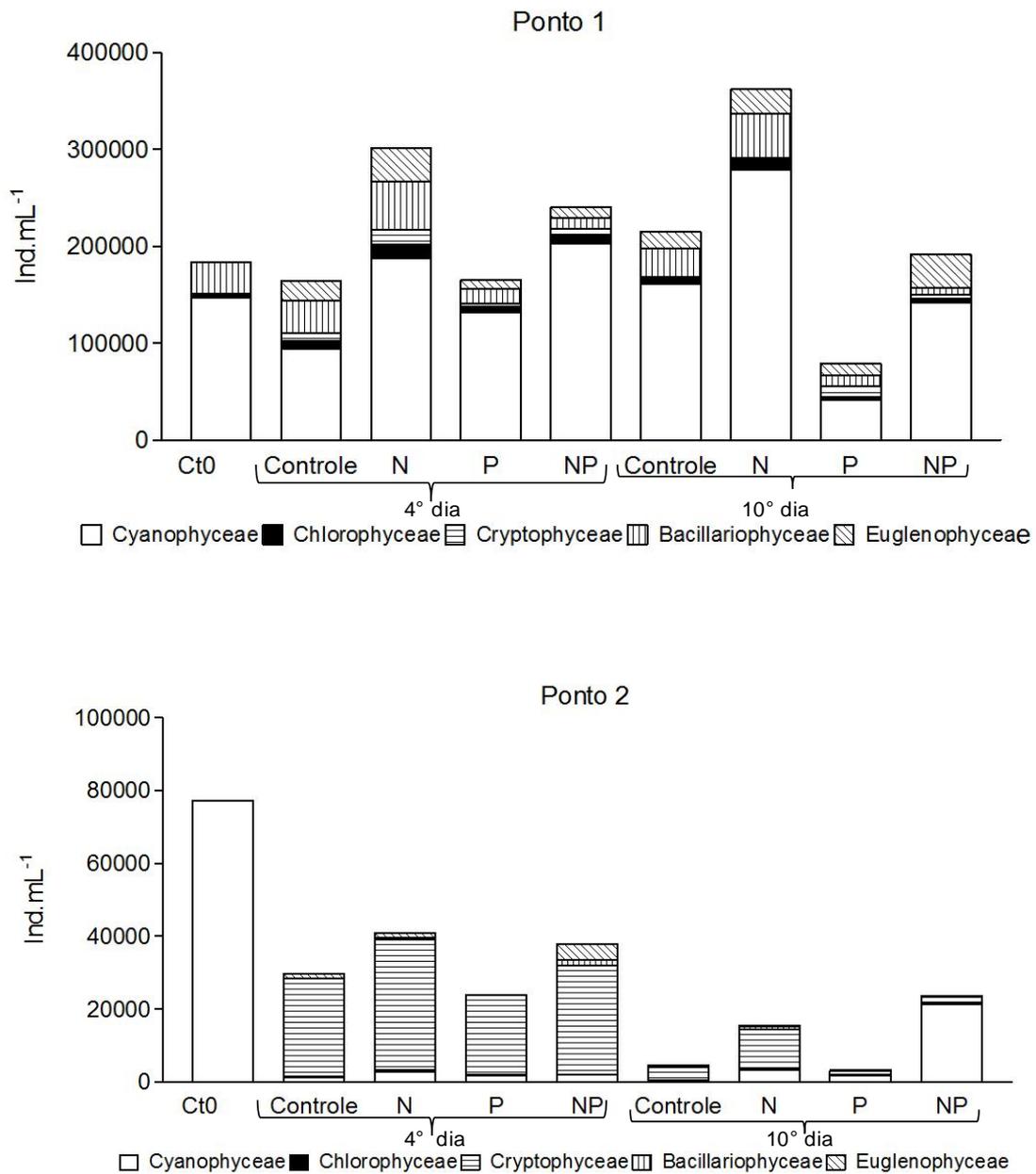


Figura 1.10. Número de indivíduos obtidos no 4° e 10° dias de experimento e na água da lagoa, Ct0, nos Pontos 1 e 2.

Durante os dez dias de experimento a comunidade apresentou mudança em número e composição entre os tratamentos (Figura 1.10). Apesar disso, no Ponto 1, a classe Cyanophyceae sempre foi o grupo de maior abundância com mais de 70% do número de indivíduos e 95% do biovolume total, em todos os tratamentos. Entretanto, no Ponto 2, já no 4° dia ocorreu uma mudança na comunidade. A classe Cryptophyceae passou a compor mais de 80% da comunidade fitoplanctônica em todos os tratamentos, predominando *Rhodomonas* sp. e *Cryptomonas marssonii*. No último dia de experimento, com exceção do controle e N que continuaram apresentando

dominância de Cryptophyceae, os tratamentos P e NP passaram a ter o domínio da classe Cyanophyceae, com 50 e 90% do número de indivíduos, respectivamente, predominando *Synechocystis aquatilis*.

No Ponto 1 o biovolume no 4° e 10° dia foi composto na maior parte por *Limnothrix* sp. (Cyanophyceae) em todos os tratamentos, com exceção do controle no 10° dia, com maior biovolume representado por *Epigloeosphaera brasílica* (Cyanophyceae) (Figura 1.11). Já no Ponto 2, o maior biovolume até o 4° dia esteve associado à classe Cryptophyceae, com mais de 40% do biovolume no tratamento N, 52% do biovolume no controle e 97% no tratamento P. No tratamento NP a classe Euglenophyceae, representada principalmente com *Trachelomonas* sp., apresentou 37% do biovolume. A classe Cryptophyceae apresentou o segundo maior biovolume, com *Cryptomonas marssonii* representando 28% do biovolume. No décimo dia, a classe Cryptophyceae predominou em biovolume, com *Cryptomonas marssonii* dominando em todas as condições experimentais, com exceção do tratamento NP. Neste tratamento a classe Bacillariophyceae apresentou 78% do biovolume, com o predomínio de *Cyclotella* sp. (Figura 1.11).

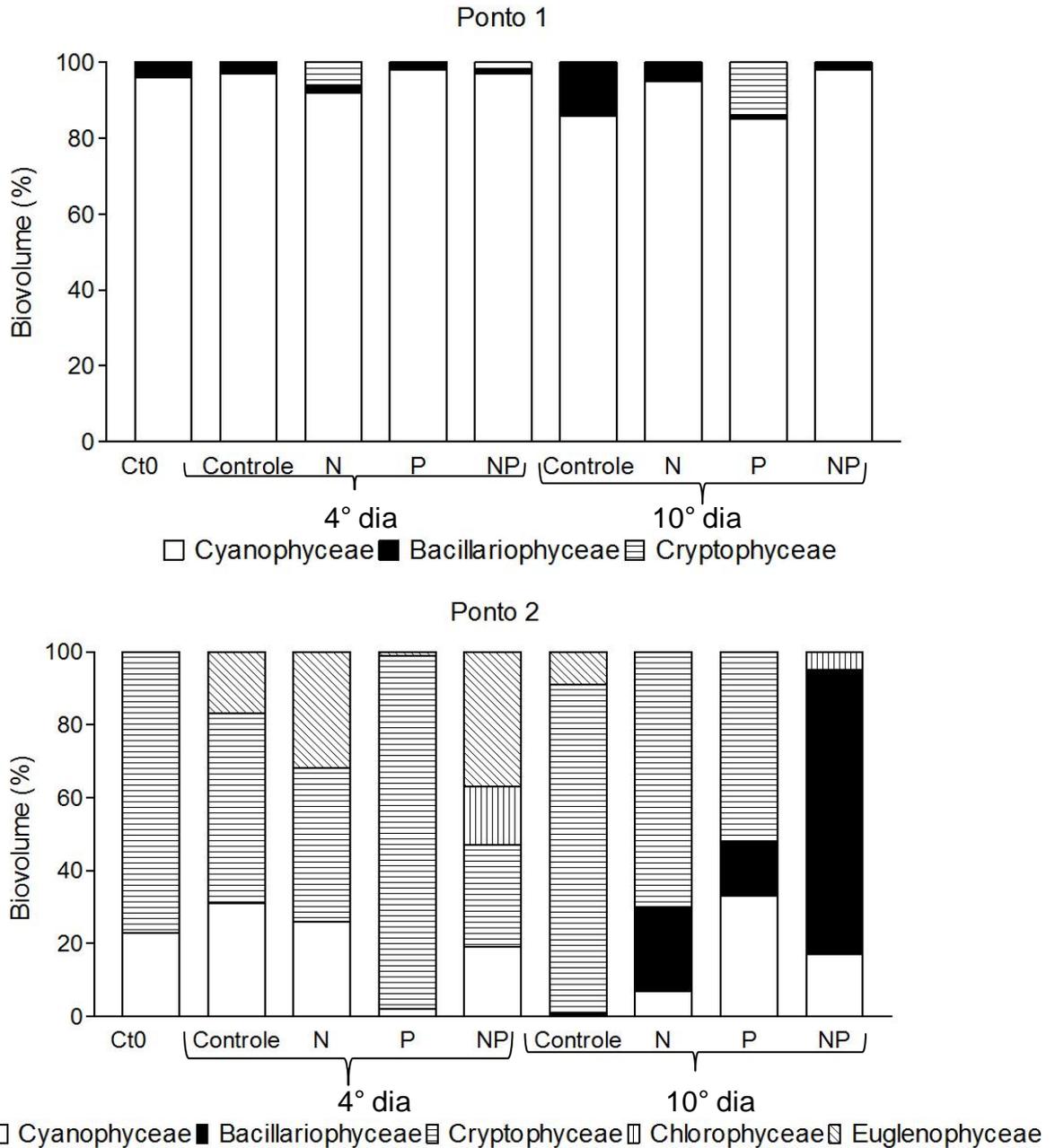


Figura 1.11. Biovolume obtidos no 4° e 10° dias de experimento nos Pontos 1 e 2 e na água da lagoa, Ct0.

1.5.4. Comunidade perifítica: biomassa

Em relação à clorofila-a perifítica, após dez dias de experimento, no Ponto 1 e 2, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos. Entretanto, no Ponto 1, o tratamento N apresentou o menor valor médio ($0,01 \mu\text{g cm}^{-2}$), e os tratamentos P e NP apresentaram os maiores valores médios, em torno de $0,08$ e $0,07 \mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente. No Ponto 2 a maior concentração média foi obtida no tratamento NP.

As concentrações neste tratamento foram 51, 81 e 97% maiores que o tratamento N, P e controle, respectivamente (Figura 1.12).

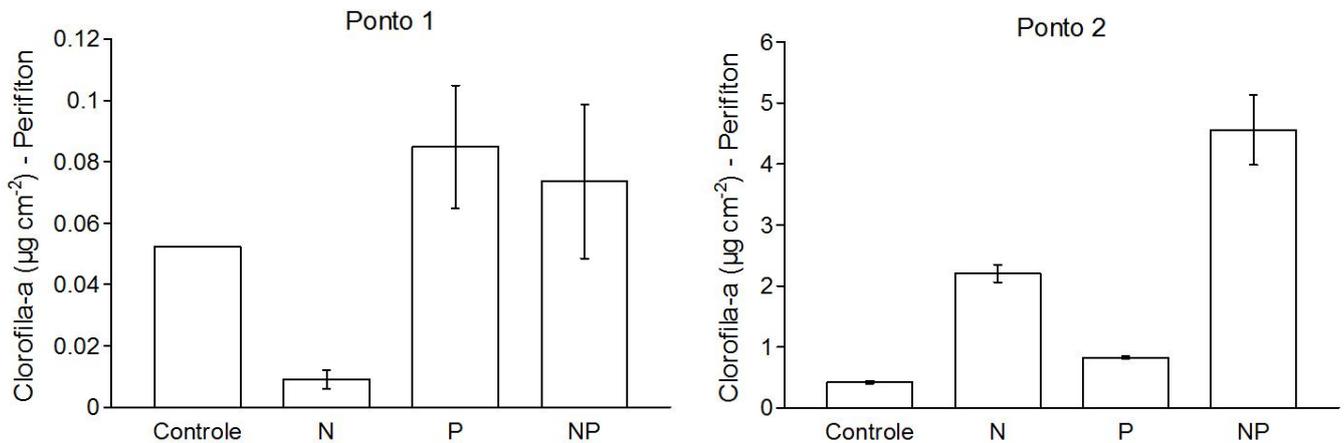


Figura 1.12. Média e desvio padrão da biomassa perifítica (n = 6) na forma de clorofila-a no 10° dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

1.5.5. Análise dos Componentes Principais (ACP)

No Ponto 1 a ACP mostrou, entre as características abióticas nos mesocosmos, que 85% da variabilidade dos dados foi explicada nos dois primeiros eixos, com 64 e 21%, respectivamente. No lado positivo do eixo 1 foram alocadas a maioria dos tratamentos e dias, negativamente correlacionados com os nutrientes, pH e OD. No lado negativo do eixo 1 os tratamentos N e P (2° dia) e NP (2°, 4° e 8° dias) correlacionaram-se fortemente com o pH e OD, possivelmente devido a maior atividade metabólica nesses tratamentos e dias. No eixo 2 os tratamentos controle e N (8° e 10° dia), P (2° e 8° dia) e NP (2° e 10° dia) correlacionaram-se positivamente com os valores de pH e OD. Os demais dias correlacionaram negativamente com as concentrações dos nutrientes, o que representa menor atividade metabólica e menor consumo dos nutrientes (Figura 1.13).

Tabela 1.3: Correlação das variáveis abióticas (n = 24) com os componentes principais no Ponto 1.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
P-PO ₄ ³⁻	-0,928	-0,275
P-total dissolvido	-0,895	-0,655
Si-SiO ₂	-0,746	-0,392
pH	-0,602	0,718
OD	-0,784	0,496

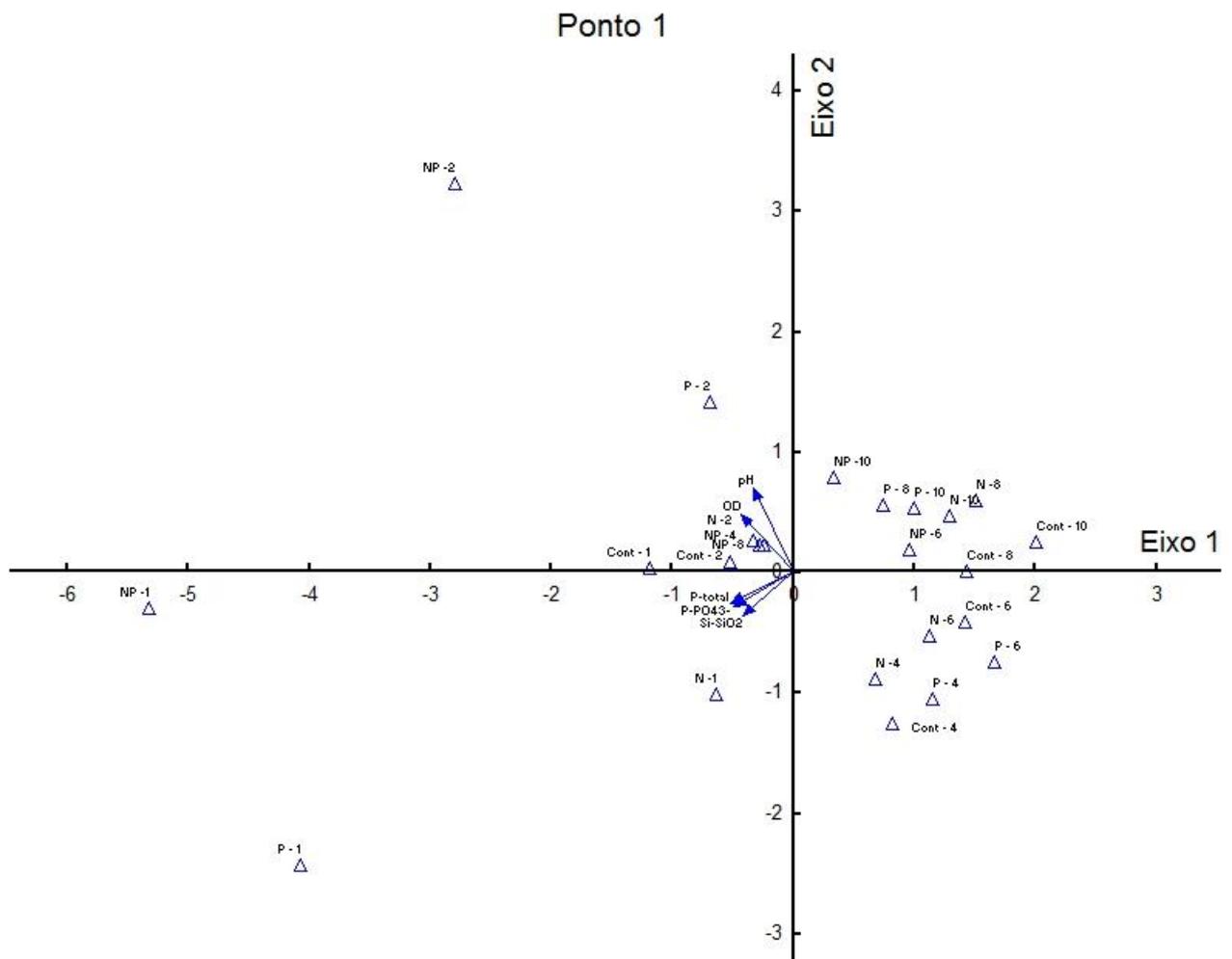


Figura 1.13. ACP com os valores médios das variáveis abióticas em cada tratamento nos dias 1, 2, 4, 6, 8 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, Si-SiO₂ = sílica, OD= oxigênio dissolvido, Cont – 1 = controle 1º dia, Cont – 2 = controle 2º dia, Cont – 4 = controle 4º dia, Cont – 6 = controle 6º dia, Cont – 8 = controle 8º dia, Cont – 10 = controle 10º dia, N – 1 = N - 1º dia, N – 2 = N - 2º dia, N – 4 = N - 4º dia, N – 6 = N - 6º dia, N – 8 = N - 8º dia, N – 10 = N - 10º dia, P – 1 = P - 1º dia, P – 2 = P - 2º dia, P – 4 = P - 4º dia, P – 6 = P - 6º dia, P – 8 = P - 8º dia, P – 10 = P - 10º dia, NP – 1 = NP - 1º dia, NP – 2 = NP - 2º dia, NP – 4 = NP - 4º dia, NP – 6 = NP - 6º dia, NP – 8 = NP - 8º dia e NP – 10 = NP - 10º dia.

No Ponto 2 a ACP apresentou que 71% da variabilidade dos dados foi explicada nos dois primeiros eixos, com 52 e 19%, respectivamente. No lado negativo do eixo 1 foram alocados os tratamentos P (em todos os dias amostrados) e NP (dia 2 e 4) mais associados aos valores de P-total dissolvido e ortofosfato (Tabela 1.4). Nesse caso, representa excesso de fósforo principalmente no tratamento P que esteve mais associado à elevada concentração de fósforo e menor biomassa algal. O que não ocorreu, por exemplo, nos dias finais, 8º e 10º, no tratamento NP, controle e tratamento N (Figura 1.14). Na parte positiva do eixo 2, o tratamento P (dias 4, 6, 8 e 10) associou-se mais fortemente com as concentrações de P-total, reforçando o excesso de fósforo nesse tratamento.

Tabela 1.4: Correlação das variáveis abióticas (n = 24) com os componentes principais no Ponto 2.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
N-NH ₄ ⁺	-0,533	-0,753
N-NO ₂ ⁻	-0,509	0,000
P-PO ₄ ³⁻	-0,898	0,297
P-total dissolvido	-0,861	0,449
Si-SiO ₂	-0,712	-0,354

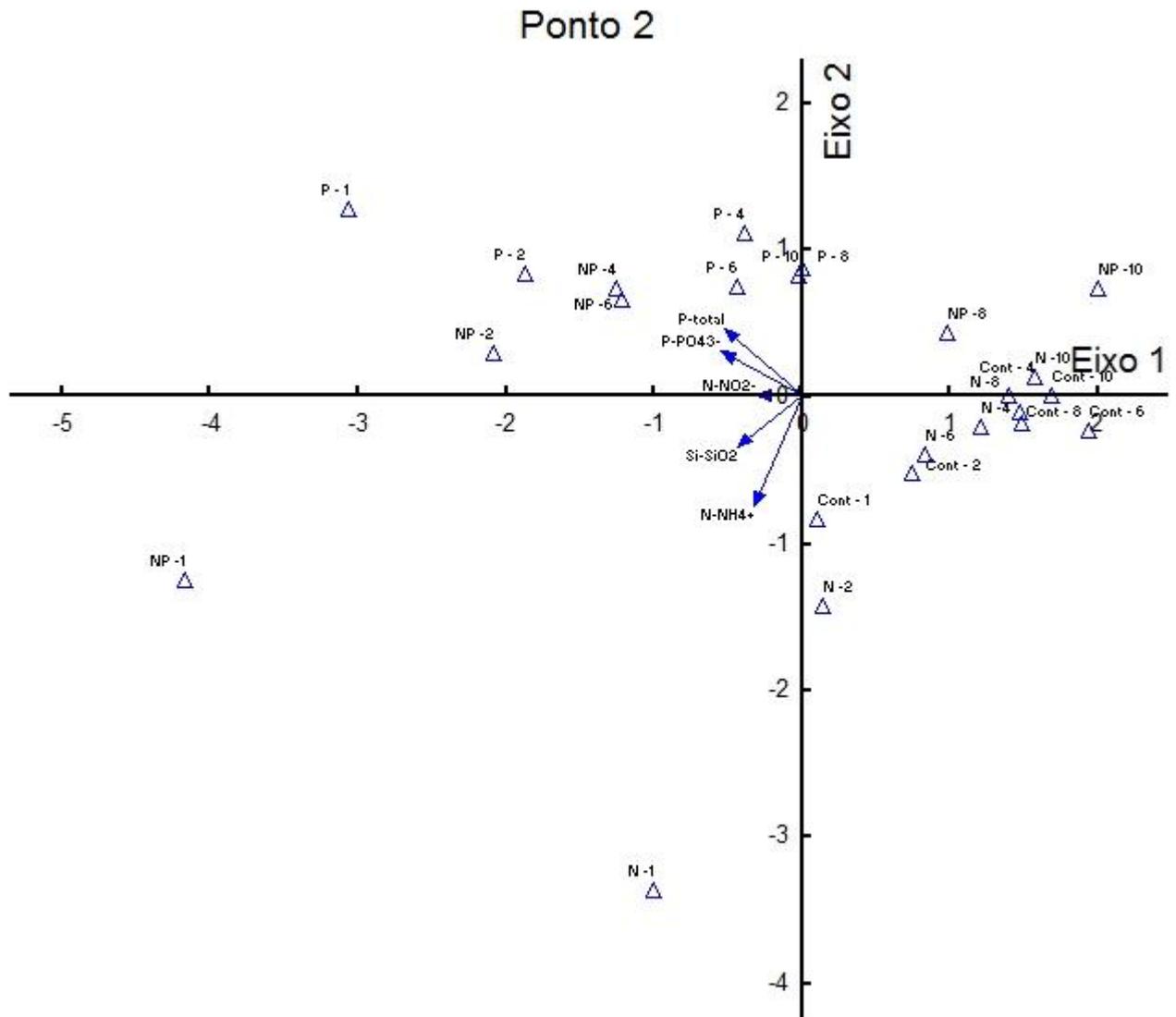


Figura 1.14. ACP com os valores médios das variáveis abióticas em cada tratamento nos dias 1, 2, 4, 6, 8 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, Si-SiO₂ = sílica, N-NH₄⁺ = N-amoniacal, N-NO₂⁻ = nitrito, Cont - 1 = controle 1° dia, Cont - 2 = controle 2° dia, Cont - 4 = controle 4° dia, Cont - 6 = controle 6° dia, Cont - 8 = controle 8° dia, Cont - 10 = controle 10° dia, N - 1 = N - 1° dia, N - 2 = N - 2° dia, N - 4 = N - 4° dia, N - 6 = N - 6° dia, N - 8 = N - 8° dia, N - 10 = N - 10° dia, P - 1 = P - 1° dia, P - 2 = P - 2° dia, P - 4 = P - 4° dia, P - 6 = P - 6° dia, P - 8 = P - 8° dia, P - 10 = P - 10° dia, NP - 1 = NP - 1° dia, NP - 2 = NP - 2° dia, NP - 4 = NP - 4° dia, NP - 6 = NP - 6° dia, NP - 8 = NP - 8° dia e NP - 10 = NP - 10° dia.

1.5.6. Análise de Correspondência Canônica (ACC)

No Ponto 1 a ordenação dos dados através da ACC explicou 61 e 32% dos dados biológicos nos eixos 1 e 2, respectivamente. A correlação de Pearson entre espécie e ambiente foi alta em ambos os eixos (Tabela 1.5) indicando uma forte relação

entre as variáveis abióticas e o fitoplâncton (Figura 1.15). O mesmo foi observado através do teste de Monte Carlo que indicou significância na ordenação entre os eixos 1 e 2 ($p < 0,05$).

Tabela 1.5: Síntese da ACC para os tratamentos.

Resultado da síntese	Eixo 1	Eixo 2
Autovalores	0,046	0,024
Variância explicada (%)	61	32
Correlação de Pearson (espécie-ambiente)	1	1
<i>Teste de Monte Carlo</i>		
Autovalores - p	0,002	0,002
Correlação espécie-ambiente	0,99	0,99

A ACC mostrou que o P-total dissolvido foi a variável mais importante para a ordenação do eixo 1 enquanto no eixo 2 as variáveis mais importantes foram pH e OD (Tabela 1.6). A classe Cyanophyceae apresentou a mais alta correlação com o P-total dissolvido, enquanto a classe Bacillariophyceae foi à única classe que se correlacionou negativamente. As classes Cryptophyceae e Euglenophyceae correlacionaram-se mais forte e positivamente com o pH e OD, enquanto a classe Bacillariophyceae correlacionou-se negativamente. A classe Euglenophyceae esteve mais associada ao tratamento NP no 4º e 10º dia do que as demais classes (Tabela 1.7).

Tabela 1.6: Correlação das variáveis abióticas ($n = 9$) com os componentes principais no Ponto 1.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
N-NH ₄ ⁺	-0,101	-0,159
N-NO ₃ ⁻	0,134	0,191
P-PO ₄ ³⁻	0,157	-0,196
P-total dissolvido	-0,195	0,494
Si-SiO ₂	0,097	-0,344
pH	-0,008	0,621
OD	-0,082	0,618
Alcalinidade total	0,071	-0,247

Tabela 1.7: Correlação das variáveis biológicas (n = 9) com os eixos 1 e 2 no Ponto 1.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
Cyanophyceae	0,662	-0,338
Chlorophyceae	-0,062	-0,257
Cryptophyceae	-0,643	0,440
Bacillariophyceae	-0,091	-0,744
Euglenophyceae	0,298	0,394

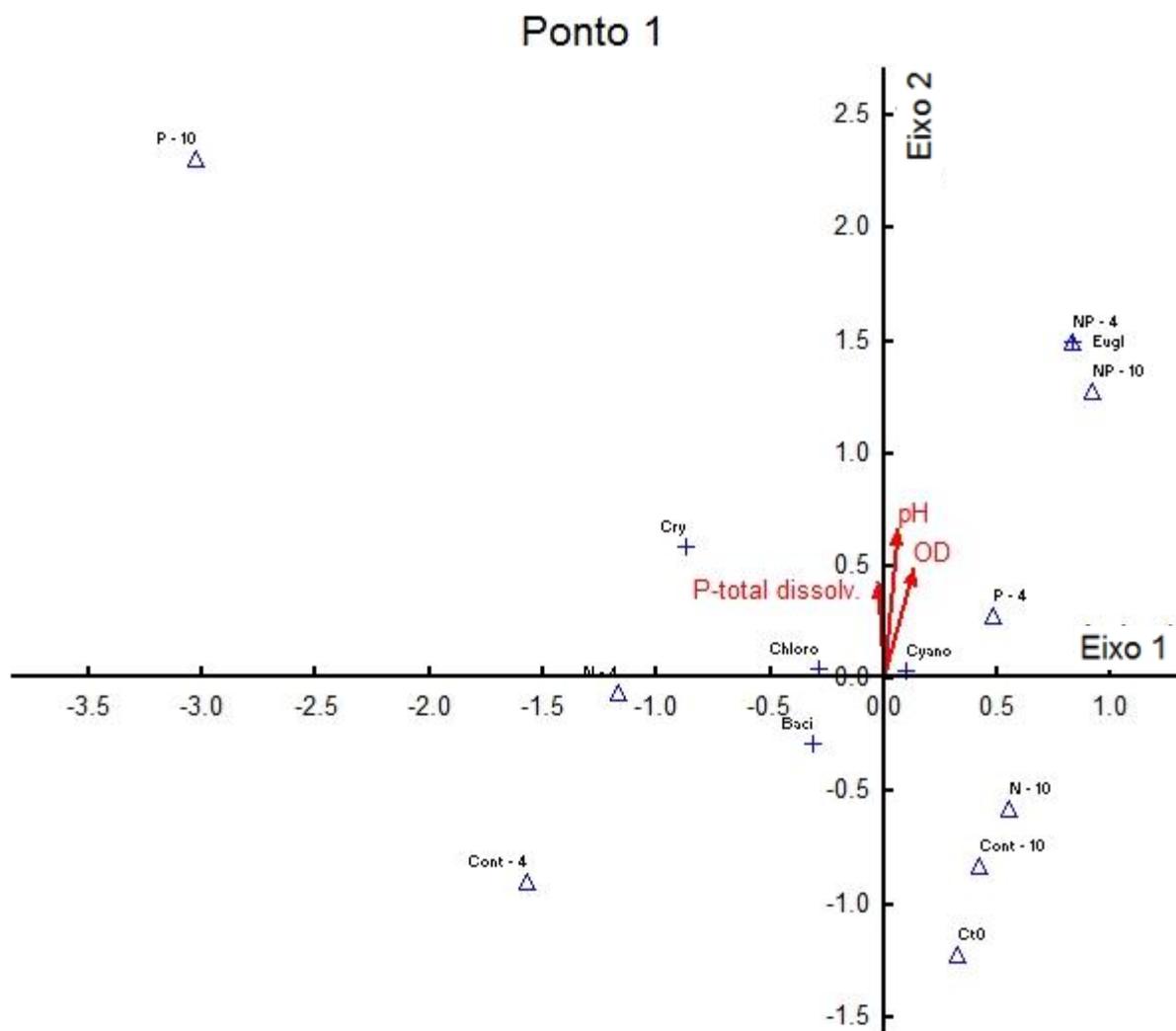


Figura 1.15. ACC com os valores médios das variáveis abióticas e bióticas em Ct0 e em cada tratamento nos dias 4 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, OD= oxigênio dissolvido, Ct0 = água da lagoa, Cont – 4 = controle, Cont – 10 = controle 10º dia, N – 4 = N - 4º dia, N – 10 = N - 10º dia, P – 4 = P - 4º dia, P – 10 = P - 10º dia, NP – 4 = NP - 4º dia e NP – 10 = NP - 10º dia.

No Ponto 2 a ACC explicou 92 e 4,6 % dos dados biológicos nos eixos 1 e 2, respectivamente. A correlação de Pearson entre espécie e ambiente foi alta em ambos os eixos (Tabela 1.8) e o teste de Monte Carlo indicou significância entre os eixos 1 e 2 ($p < 0,05$) o que indica forte relação entre as variáveis abióticas e o fitoplâncton (Figura 1.16).

Tabela 1.8: Síntese da ACC para os tratamentos.

Resultado da síntese	Eixo 1	Eixo 2
Autovalores	0,732	0,036
Variância explicada (%)	92	4,6
Correlação de Pearson (espécie-ambiente)	1	1
<i>Teste de Monte Carlo</i>		
Autovalores - p	0,001	0,001
Correlação espécie-ambiente	0,99	0,95

A ACC apresentou o OD como a variável mais importante para a ordenação do eixo 1. No eixo 2 a alcalinidade total foi a variável mais importante para a ordenação dos dados (Tabela 1.9). A classe Cyanophyceae apresentou a maior correlação com o OD, enquanto a classe Cryptophyceae apresentou a correlação mais negativa. No eixo 2, as classes Bacillariophyceae e Euglenophyceae apresentaram maior correlação com a alcalinidade total (Tabela 1.10).

Tabela 1.9: Correlação das variáveis abióticas ($n = 9$) com os componentes principais no Ponto 2.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
N-NH ₄ ⁺	0,428	-0,146
N-NO ₃ ⁻	-0,438	0,071
P-PO ₄ ³⁻	-0,144	0,299
P-total dissolvido	-0,210	0,338
Si-SiO ₂	-0,044	0,248
pH	-0,373	0,004
OD	-0,755	-0,138
Alcalinidade total	0,007	-0,452

Tabela 1.10: Correlação das variáveis biológicas (n = 9) com os eixos 1 e 2 no Ponto 2.

Variável	Eixo 1	Eixo 2
Cyanophyceae	0,775	-0,111
Chlorophyceae	-0,222	-0,477
Cryptophyceae	-0,730	-0,320
Bacillariophyceae	-0,071	0,626
Euglenophyceae	-0,499	0,369

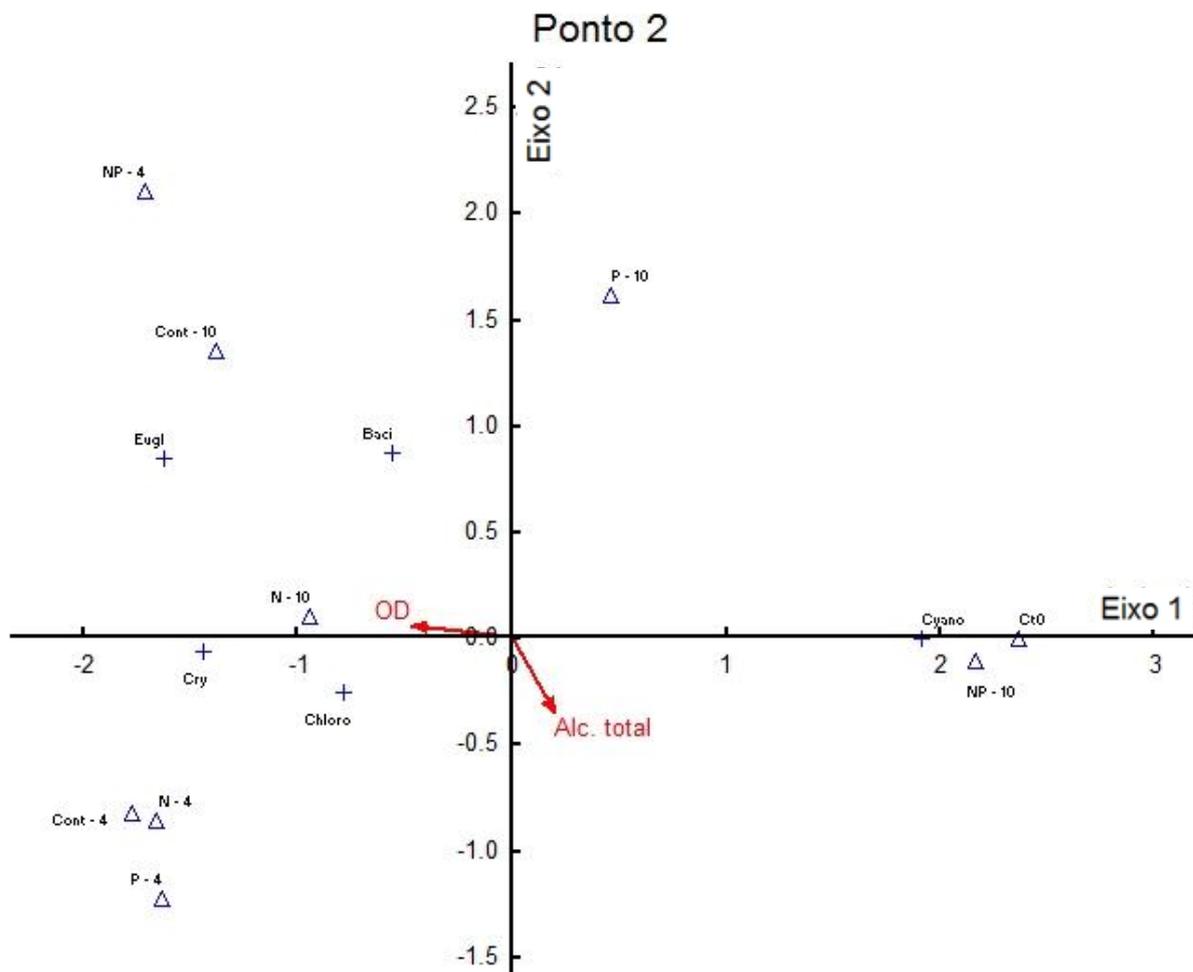


Figura 1.16. ACC com os valores médios das variáveis abióticas e bióticas em Ct0 e em cada tratamento nos dias 4 e 10. Abreviações: P-total = fósforo total, OD= oxigênio dissolvido, Ct0 = água da lagoa, Cont – 4 = controle, Cont – 10 = controle 10° dia, N – 4 = N - 4° dia, N – 10 = N - 10° dia, P – 4 = P - 4° dia, P – 10 = P - 10° dia, NP – 4 = NP - 4° dia e NP – 10 = NP - 10° dia.

A classe Cyanophyceae esteve associada ao Ct0 e ao tratamento NP no 10° dia, devido à modificação da composição da comunidade fitoplanctônica de

Cyanophyceae para Cryptophyceae no 4° dia de experimento. No 10° dia a classe Cyanophyceae retomou a dominância no tratamento NP (Tabela 1.10). As demais classes correlacionaram-se negativamente com o eixo 1. As classes Cryptophyceae e Chlorophyceae associaram-se mais fortemente com os tratamentos controle, N e P no 4° dia de experimento. No eixo 2 apenas as classes Bacillariophyceae e Euglenophyceae apresentaram correlação positiva (Figura 1.16). Com exceção de NP no 10° dia e N no 4° dia, os tratamentos com adição de N associaram-se positivamente com a alcalinidade total. Em relação ao controle e tratamento P, esses tratamentos apenas associaram-se positivamente no 10° dia de experimento (Tabela 1.10).

1.6. Discussão

1.6.1. Resposta da biomassa fitoplanctônica a adição de nutrientes

Em ecossistemas aquáticos é esperado que o incremento de nutrientes leve a mudanças nas características físico-químicas da água e alterações na biomassa e na composição fitoplanctônica (Estrada *et al.*, 2003). De fato, estas alterações puderam ser observadas nos experimentos realizados (Figuras 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 e 1.10). Entretanto, a maior modificação parece ter decorrido do próprio confinamento das águas nos mesocosmos, uma vez que as concentrações de clorofila-*a* e as densidades fitoplanctônicas mostraram decréscimo em relação às águas originais, especialmente no Ponto 1 devido principalmente a sedimentação e herbivoria (maiores detalhes item 2.5.3). Embora essas modificações tenham sido evidentes, os parâmetros determinados foram sensíveis à metodologia utilizada, com os mesocosmos e adição de nutrientes. As lagoas costeiras são conhecidas pelo elevado hidrodinamismo, resultante do aporte de energia externa na forma de constantes ventos (Knoppers, 1994). Assim, o confinamento de suas águas pode explicar as respostas em termos de diminuição da biomassa pelágica pelo processo de sedimentação dos organismos. O incremento em biomassa fitoplanctônica observado no Ponto 2 nos primeiros dias de experimento pode estar relacionado a populações que apresentam uma relativa motilidade, como as Cryptophyceae, que podem se manter na coluna d'água.

Muitos estudos experimentais com a comunidade fitoplanctônica visam acompanhar a composição e variações da comunidade em relação a sua biomassa, geralmente na forma de clorofila-*a*. Os resultados obtidos utilizando a clorofila-*a* como indexador de biomassa fitoplanctônica são em muitos casos considerados equivalentes

aos dados de densidade obtidos a partir de microscopia (Xu *et al.*, 2010). Por exemplo, se a biomassa fitoplanctônica aumentar após a adição isolada de N, mas não após a adição de P, esta indicaria limitação por N no sistema de estudo (Lin *et al.*, 2008). As adições de N e P em conjunto podem também estimular o incremento de biomassa, apresentando efeito sinérgico. O sinergismo pode ser observado a partir de comparações de tratamentos onde foi realizada a adição individualizada dos nutrientes com tratamentos onde foram realizadas adições combinadas. Quando ocorre maior estímulo ao incremento da biomassa fitoplanctônica no tratamento com adição combinada dos nutrientes, em relação aos tratamentos com adição individualizada, pode ser concluída a ocorrência de sinergismo (Paerl *et al.*, 2011). A colimitação por nutrientes pode ser também observada a partir desses tipos de avaliações. Nesse caso, os tratamentos com adição individualizada de N ou P podem não apresentar aumento nas concentrações de clorofila-a, principalmente quando comparada à biomassa do tratamento com adição combinada, N + P (Muhid *et al.*, 2013). Embora mudanças na composição da comunidade fitoplanctônica ocorram com maior frequência após a adição de nutrientes, a composição da comunidade também pode não ser alterada após eventos de incremento de nutrientes (Muhid *et al.*, 2013), o que não ocorreu no presente estudo, que apresentou modificações na comunidade fitoplanctônica ao longo dos dias dos experimentos.

Em ambos os pontos, a maior biomassa na forma de clorofila-a ocorreu no tratamento com adição combinada de N e P. O maior incremento de biomassa na forma de clorofila-a observado nesse tratamento foi seguido também de maiores concentrações de OD e pH do que os tratamentos com adição individualizada (Tabela 1.2 e Figura 1.5), o que sugere maior produtividade primária sob esta condição experimental (Sabater *et al.*, 2000). As maiores modificações no tratamento NP sugerem a ocorrência de efeito sinérgico devido à adição combinada dos nutrientes adicionados (Elser *et al.*, 1990; Elser *et al.*, 2007; Gruner *et al.*, 2008; Paerl *et al.*, 2011). Os tratamentos com adições individualizadas de N e P não apresentaram diferenças entre eles. Quando comparados ao tratamento NP, estes não estimularam o incremento de biomassa. Esse fato sugere limitação pelo outro nutriente que não foi adicionado nos tratamentos com adição individualizada, ou seja, colimitação nutricional. Nesse caso, por exemplo, a adição apenas de N, pode ter gerado ou aumentado a limitação por P, enquanto a adição somente de P pode ter contribuído para a ocorrência ou aumento de limitação por N (Muhid *et al.*, 2013).

O efeito sinérgico pôde ser observado também em relação à comunidade perifítica em ambos os pontos de experimentação. Entretanto, a adição individualizada de P estimulou maiores concentrações de biomassa, semelhante ao observado em NP (Figura 1.12). Este fato indica que no Ponto 1, a comunidade perifítica é mais limitada por P, pois a adição individualizada de N não influenciou a ocorrência de elevada biomassa na forma de clorofila-*a*. No Ponto 2, ao contrário, o N pareceu ser mais limitante à essa comunidade do que o P, observando-se maior incremento em biomassa no tratamento N.

1.6.2. Limitação nutricional

A razão nitrogênio inorgânico dissolvido (NID, nitrato+nitrito+N-amoniaco) e ortofosfato, que é uma ferramenta utilizada para avaliar a limitação nutricional, confirma a colimitação nutricional (Dortch & Whittedge, 1992) (Tabela 1.11). Em ambos os pontos, o controle e o tratamento com adição individualizada de P foram limitados por N (NID:P-orto <10), enquanto o tratamento N foi limitado por P (NID:P-orto >30). O tratamento NP não apresentou limitação por nutrientes (NID:P-orto ~16) no Ponto 1, enquanto no Ponto 2, apresentou limitação por N. Estas diferentes limitações podem ter alterado a comunidade no Ponto 2: de cianocolonial para Cryptophyceae e outra vez para cianobactérias, com a presença de *Synechocystis aquatilis* que é capaz de fixar N (Crossetti & Bicudo, 2005).

Tabela 1.11: Razão molar NID:ortofosfato (orto-P) para os dois pontos amostrais em cada dia de coleta. As concentrações médias dos nutrientes estão em μM .

<i>Ponto 1</i>	Razão NID:orto-P 1° dia		Razão NID:orto-P 2° dia		Razão NID:orto-P 4° dia		Razão NID:orto-P 6° dia		Razão NID:orto-P 8° dia		Razão NID:orto-P 10° dia		Limitação média
		Limitação		Limitação									
Controle	1.1:1.2 = 0.9	N	1.5:1.3 = 1.2	N	5.0:1.1 = 4.5	N	4.6:0.89 = 5.2	N	3.6:0.8 = 4.5	N	4.8:0.5 = 10	N	N
N	56.6:1.2 = 47	P	47:0.9 = 52	P	45:1.2 = 37.5	P	31.3:1.0 = 31.3	-	30.2:0.5 = 60	P	16.4:0.65 = 25	-	P
P	1.2:3.7 = 0.3	N	2.4:1.4 = 1.7	N	11:0.8 = 14	-	2.9:0.7 = 4.2	N	1.9:0.8 = 2.4	N	2.5:0.5 = 5	N	N
NP	56:3.7 = 15	-	29.5:1.7 = 17	-	23.4:1.2 = 19	-	11.0:0.7 = 15.7	-	9.8:1.4 = 7	N	19:0.8 = 24	-	Nenhuma

<i>Ponto 2</i>	Razão NID:orto-P 1° dia		Razão NID:orto-P 2° dia		Razão NID:orto-P 4° dia		Razão NID:orto-P 6° dia		Razão NID:orto-P 8° dia		Razão NID:orto-P 10° dia		Limitação média
		Limitação		Limitação									
Controle	15.2:2.3 = 6.6	N	2.2:1.6 = 1.4	N	4.9:1.6 = 3	N	1.4:1.1 = 1.2	N	1.3:0.92 = 1.4	N	2:0.69 = 2.9	N	N
N	157:2.3 = 68	P	94:1.6 = 59	P	34:1.2 = 28	-	57.1:1 = 57	P	21/0.9 = 23	-	32:0.53 = 60	P	P
P	14.9:29 = 0.5	N	4.5:13 = 0.3	N	3.8:11 = 0.3	N	2.9:11 = 0.26	N	1.1:10 = 0.11	N	1.9:9.4 = 0.2	N	N
NP	157:29 = 5.4	N	111:14 = 8	N	30:11 = 2.8	N	38:9 = 4	N	5:4.3 = 1.1	N	2.4:2.7 = 0.9	N	N

Legenda: (-): nenhuma limitação.

Limitação por N: razão NID:orto-P < que 10; limitação por P: razão NID:orto-P > que 30.

Por meio da razão NID:orto-P, 11:0.6 = 18, a água da lagoa, (Ct0), no Ponto 1 não indicou limitação nutricional. No Ponto 2, a razão NID:orto-P de 28:5.5 = 5.2 indicou limitação por N.

Outra ferramenta utilizada em estudos limnológicos é a razão P-particulado:clorofila-a. Nos Pontos 1 e 2 o tratamento N apresentou na maior parte dos casos os menores valores da razão P-particulado:clorofila-a o que sugere maior biomassa e limitação por P nesse tratamento. Como esperado, o tratamento P apresentou excesso de fósforo, principalmente no Ponto 2 (Figura 1.17). Os valores obtidos a partir da razão reforçam o observado através da razão NID:orto-P, que sugere limitação nutricional por nitrogênio no controle e no tratamento P em ambos os pontos amostrais. No tratamento NP pode ter ocorrido leve limitação por N, como observado também através da razão NID:orto-P no Ponto 2. Embora esse tratamento tenha apresentado maiores concentrações de clorofila-a, a adição combinada dos nutrientes não estimulou ao maior incremento da biomassa quando observados os valores obtidos a partir da razão P-particulado:clorofila-a com o valores do tratamento N (Figura 1.17).

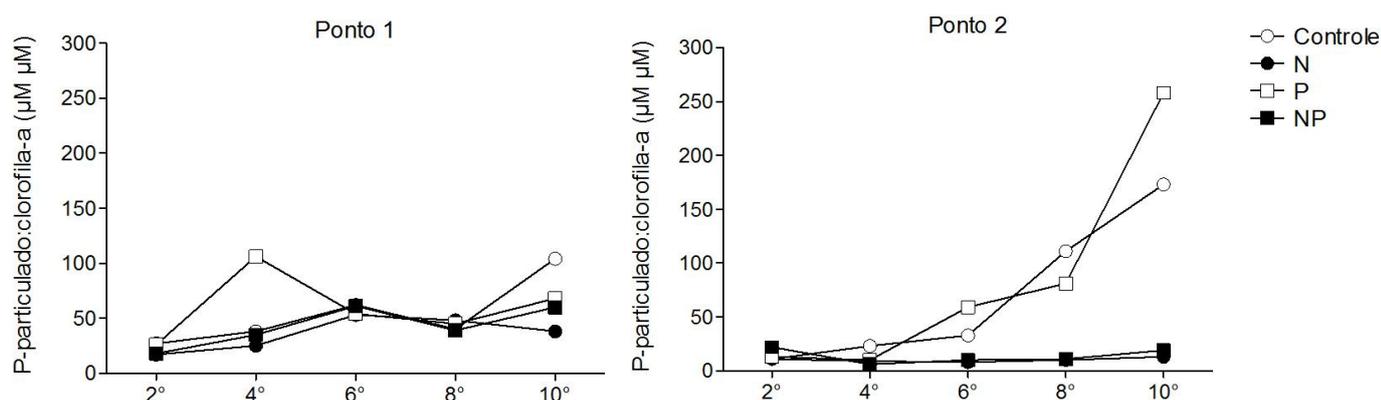


Figura 1.17. Valores obtidos a partir da razão P-particulado:clorofila-a ($\mu\text{M } \mu\text{M}$) ($n = 6$) durante o 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dias de experimento nos dois pontos amostrais.

Com relação à fração particulada dos nutrientes foram obtidas as razões C:N, N:P, C:P e também C:clorofila-a. Os valores encontrados foram comparados aos indicadores de deficiência nutricional proposto por Healey & Hendzel (1980). Neste caso, há intervalos que estabelecem o grau de limitação nutricional a partir de cada razão. Para a classificação, são utilizados os termos: nenhuma, moderada ou severa limitação, como observado na Tabela 1.12.

Tabela 1.12: Valores indicadores da deficiência nutricional a partir das razões C:N, N:P, C:P e C:clorofila-a. (Fonte: Hecky *et al.*, 1993).

Unidade	Razão	Deficiência	Nenhuma	Moderada	Severa
$\mu\text{M}:\mu\text{M}$	C:N	N	<8,3	8,3-14,6	>14,6
$\mu\text{M}:\mu\text{M}$	N:P	P	<22	-	>22
$\mu\text{M}:\mu\text{M}$	C:P	P	<129	129-258	>258
$\mu\text{M}:\mu\text{g L}^{-1}$	C:clorofila-a	Geral	<4,2	4,2 – 8,3	>8,3

A comunidade fitoplanctônica na lagoa de Iquiparí, nos dois pontos amostrais, apresentou durante os dias dos experimentos algum grau de limitação nutricional por N e P (Tabela 1.13). O Ponto 1 apresentou maior limitação nutricional do que o Ponto 2, como observado a partir da razão C:clorofila-a que indica limitação geral. No Ponto 1 os intervalos de limitação nutricional apresentaram moderada e severa limitação. No entanto no Ponto 2 a limitação nutricional geral foi caracterizada como severa apenas a partir do 6° dia no controle e tratamento P a qual manteve-se no 8° dia. No 10° dia, a limitação ocorreu também no tratamento N (Tabela 1.13).

Tabela 1.13: Valores médios (n = 6) obtidos a partir da razão dos nutrientes particulados e clorofila-a: C:N, C:P, N:P ($\mu\text{M } \mu\text{M}$) e C:clorofila-a ($\mu\text{M } \mu\text{g L}^{-1}$) em ambos os pontos experimentais durante o 1°, 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dia de experimento.

	Ponto 1	C:N	C:P	N:P	C:clorofila-a		Ponto 2	C:N	C:P	N:P	C:clorofila-a
1° dia	Ct0	7*	----	----	4.4**	1° dia	Ct0	12**	----	----	2*
2° dia	Controle	8*	361***	46***	8**	2° dia	Controle	10**	160**	15*	2*
	N	8*	650***	81***	9***		N	13**	158**	12*	2*
	P	7*	310***	43***	7**		P	10**	82*	8*	1*
	NP	9**	368***	42***	6**		NP	9**	36*	4*	1*
4° dia	Controle	43***	1232***	29***	40 ***	4° dia	Controle	8.3**	53*	6*	1*
	N	7*	602***	83***	13***		N	8*	264	34***	3*
	P	8*	309***	39***	28***		P	9	207**	23***	2*
	NP	7*	262***	35***	8**		NP	7*	89*	13*	0.6*
6° dia	Controle	9**	387***	43***	20***	6° dia	Controle	9	259	30***	10***
	N	60***	3473***	58***	153***		N	8*	135**	16*	1*
	P	8*	566***	74***	26***		P	13**	144**	11*	10***
	NP	8*	266***	32***	14***		NP	14**	110*	8*	1*
8° dia	Controle	7*	389***	55***	13***	8° dia	Controle	10**	80*	8*	10***
	N	9**	248**	29***	10***		N	11**	167**	15*	2*
	P	59***	2009***	34***	7***		P	7*	48*	6*	4.4**
	NP	7*	326***	47***	11***		NP	8*	184**	23***	2*
10° dia	Controle	8*	462***	60***	40***	10° dia	Controle	8*	364***	48***	70***
	N	8*	1016***	131***	32***		N	8*	663***	86***	10***
	P	9**	564***	66***	32***		P	8*	377***	50***	109***
	NP	60***	2375***	40***	119***		NP	7*	179**	25***	4*

Legenda: * indica nenhuma limitação,
 ** indica moderada limitação e
 *** indica severa limitação.

Embora as limitações nutricionais sugeridas pelas razões obtidas utilizando os nutrientes dissolvidos e particulados tenham apresentado alguns contrastes, pode ser observada a ocorrência de colimitação nutricional também quando avaliada as formas particuladas. Provavelmente, a diferença entre os resultados obtidos utilizando as razões dissolvidas e particuladas estão associadas às baixas concentrações de P-particulado obtidas no presente estudo. Contudo, embora as concentrações de P-particulado tenham sido baixas em relação às concentrações de C-particulado e N-particulado (Figura 1.8), as concentrações de P-total (somatório da forma dissolvida com a particulada) não podem ser consideradas baixas. Os valores médios indicam em ambos os pontos um estado eutrófico (Carlson, 1977). A maior parte do P-total no Ponto 1 foi observada na fração particulada, enquanto no Ponto 2, nos tratamentos P e

NP, as maiores concentrações estiveram presentes na fração dissolvida (Figuras 1.6, 1.7 e 1.8).

A severa limitação por P em todos os dias no Ponto 1 e principalmente no 10º dia no Ponto 2 a partir das razões N:P, C:P e C:clorofila (Tabela 1.13) e a predominância dos intervalos com nenhuma ou moderada limitação por N a partir da razão C:N (Tabela 1.13) podem estar associados a diferentes fatores. As formas orgânicas e inorgânicas de N são mais solúveis e disponíveis do que as formas fosfatadas, o que geralmente, tende a aumentar a limitação por P em lagoas. Soma-se a isso, o fato de que os solos das restingas caracterizam-se por ser pobre em P (Souza & Davide, 2001) o que reduz o aporte deste composto para os ecossistemas aquáticos. Quando observado o ciclo do P, algumas características podem ser observadas. O intemperismo das rochas libera pouco P biologicamente aproveitável e a presença de plantas terrestres interceptam e retêm a maior parte dos compostos dissolvidos de fósforo. Além disso, a capacidade de adsorção do fosfato a partículas ou precipitado com ferro, manganês ou carbonato de cálcio, dificultam sua disponibilização para os organismos fitoplanctônicos (Esteves, 1998).

A baixa concentração de P-particulado está associada geralmente à ausência de poluição e baixas concentrações de sólidos suspensos. A ocorrência de chuvas tende a aumentar a entrada de sólidos suspensos, carbono orgânico dissolvido e carbono orgânico particulado a partir do escoamento superficial e erosão do solo, favorecendo ao aumento da fração particulada (Arreghini *et al.*, 2005). No caso do ecossistema de estudo, a lagoa de Iquiparí, ainda é um ecossistema pouco afetado por atividade antrópicas. Soma-se a isso, principalmente no Ponto 2, a baixa ocorrência de precipitação pluviométrica no mês que foi realizado o experimento, média do mês igual a 58 mm, pode ter contribuído para a baixa concentração de P-particulado nesse ponto.

Outros indicativos de severa limitação por P no Ponto 1 podem ser observados a partir da comunidade perifítica, limitada por P, e dominância da classe Cyanophyceae na lagoa e durante os experimentos. Nesse ponto, a classe Cyanophyceae correlacionou-se positivamente com as concentrações de ortofosfato a partir da ACC. Algumas cianobactérias apresentam vantagens competitivas quando há limitação por P no ambiente porque apresentam a capacidade de estocar P quando este está disponível no meio e utilizá-lo em períodos de necessidade (Dokulil & Teubner, 2000). A capacidade de estocagem de P por algumas Cyanophyceae pode explicar a dominância dessa classe na lagoa de Iquiparí.

Quando comparados os Pontos 1 e 2 com relação as concentrações de C e N particulados observa-se, respectivamente, valores aproximadamente 10 e 3 vezes maiores no Ponto 1 (Figura 1.8). Os baixos valores da fração particulada no Ponto 2 podem estar associados a dominância de organismos pertencentes a classe Cryptophyceae que apresentam espécies capazes de realizar a mixotrofia. Este domínio de Cryptophyceae no Ponto 2 pode ter favorecido a ocorrência de menores concentrações da fração particulada nesse ponto (Crossetti & Bicudo, 2005).

1.6.3. Indicadores de estado trófico e composição da comunidade fitoplanctônica

Em ambientes aquáticos, uma forma de classificação dos corpos d'água consiste em diferenciar o grau de trofia, avaliando a qualidade da água em relação ao enriquecimento por nutrientes. Entre os extremos, os sistemas ultraoligotróficos são caracterizados por concentrações de P-total e clorofila-*a* em torno de 0,02 μM e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, com transparência da coluna d'água de até 64 metros. Enquanto ambientes hipereutróficos podem chegar a apresentar concentrações de P-total e clorofila-*a* superiores a 1,5 μM e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, com transparência inferior a 1 metro (Carlson, 1977).

No presente estudo, na água da lagoa, Ct0, as concentrações de clorofila-*a* foram altas (207 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, Pontos 1 e 2, respectivamente), com baixa transparência da coluna d'água (30 e 25 cm nos Pontos 1 e 2) (Tabela 1.2), sugerindo um estado hipereutrófico (Carlson, 1977). Não foram utilizadas concentrações de P-total para calcular o índice de estado trófico, porque devido a problemas operacionais não há dados de P-particulado em Ct0. Essas características também podem ser encontradas em lagoas costeiras da região, como a lagoa de Grussaí, localizada ao norte da lagoa de Iquiparí, porém mais afetada pela urbanização, que apresenta geralmente altos valores de pH (8 – 10) e alcalinidade total (3 – 5 mEq L^{-1}), supersaturação de OD e alta concentração de clorofila-*a* (60 – 300 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Suzuki *et al.*, 1998).

Ao longo dos dias dos experimentos, embora as concentrações de clorofila-*a* tenham diminuído (Figura 1.9), em todos os mesocosmos no Ponto 1, e no Ponto 2 com exceção do controle (eutrófico) e do tratamento P (mesotrófico), manteve-se a condição hipereutrófica no 10º dia de experimento (Carlson, 1977). Nos dois pontos estudados, a água da lagoa apresentava 80% da composição fitoplanctônica de organismos da classe Cyanophyceae. O filo Cyanobacteria é o mais antigo dos organismos fitoplanctônicos e um dos principais responsáveis por blooms algais,

destacando-se como principais gêneros formadores de blooms: *Anabaena*, *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* (O'Neil *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012). As cianobactérias apresentam também tolerância a ambientes com elevado pH e são capazes de tolerar alto grau de variabilidade ambiental (Brookes & Carey, 2011; Soares *et al.*, 2012; Rigosi *et al.*, 2014). A lagoa de Iquiparí em Ct0 (Tabela 1.2) apresentou todas essas características, o que pode explicar a dominância dessa classe nos dois pontos experimentais.

Nesse estudo, ocorreu a predominância de cianobactérias não fixadoras de N, como *Limnothrix sp.*, no Ponto 1, e *Aphanocapsa delicatissima* no Ponto 2, e de espécies fixadoras de N, nos Pontos 1 e 2, como *Synechocystis aquatilis* e *Anabaenopsis elenkinii f. circularis*. Entretanto, a partir de visualizações no microscópio, observou-se a não ocorrência de heterocitos, que são células que apresentam como função a fixação de N₂ na espécie *Anabaenopsis elenkinii f. circularis*. Este fato pode indicar que o N estava disponível no meio, não havendo a necessidade de fixação atmosférica, que apresenta um gasto energético elevado (Falconer, 2005). A ocorrência de processos de regeneração dos nutrientes nitrogenados pode ter ocorrido, principalmente de nitrito e nitrato, nos tratamentos N e NP, como pode ser observado nas Figuras 1.6 e 1.7. Embora modificações na comunidade tenham ocorrido nos dois pontos, no Ponto 1 a classe Cyanophyceae sempre dominou em número e biovolume (Figuras 1.10 e 1.11).

Durante décadas, estudos têm abordado a razão N:P de Redfield (1958) para acessar a limitação nutricional fitoplanctônica (Hecky *et al.*, 1993; Dodds, 2006). Segundo essa razão, uma razão N:P >16:1 indica limitação por P, enquanto uma razão N:P <16:1 indica limitação por N. Um ponto que gera questionamento sobre a viabilidade da utilização da razão de Redfield é que esta negligencia a importância da concentração do nutriente sobre o crescimento da comunidade fitoplanctônica (Xu *et al.*, 2010). A razão atômica N:P na fração dissolvida na água da lagoa, Ct0, no Ponto 1 foi igual a 18, sugerindo ligeira limitação por P, o que não ocorreu segundo os resultados obtidos a partir da razão Dortch & Whitedge (1992) e a partir das razões dos nutrientes particulados. As razões indicaram em Ct0 não limitação nutricional (Tabela 1.11) e moderada limitação geral a partir da razão C:clorofila-a (Ponto 1) (Tabela 1.13), respectivamente. Nesse ponto, mesmo sugerindo a ocorrência de moderada ou não limitação nutricional, a comunidade fitoplanctônica foi suficientemente sensível para apresentar modificações na sua biomassa e composição

após a adição dos nutrientes. Este fato demonstra a importância da concentração dos nutrientes e não apenas da proporção em relação ao controle algal (Cuvin-Aralar *et al.*, 2004).

No Ponto 2, a baixa razão N:P, igual a 5, em Ct0, que sugere limitação por N, foi observada também através da razão NID:ortofosfato e da razão C:N (Tabelas 1.11 e 1.12). Essa condição provavelmente favorecia a predominância da classe Cyanophyceae, principalmente *Microcystis aeruginosa*, que dominava na água lagoa. A classe Cyanophyceae caracteriza-se também por ocorrência em ambientes com baixa razão N:P, mesmo estando relacionadas a lagos eutróficos e processos de eutrofização (Kim *et al.*, 2007). Contudo, após a modificação na(s) concentração(ões) dos nutrientes, diminuiu a vantagem competitiva desse grupo, permitindo com que as Cryptophyceae dominassem (Crossetti & Bicudo, 2005). Essas modificações foram claramente observadas já no 4º dia de experimento. A classe Cryptophyceae passou a compor mais de 80% da comunidade fitoplanctônica em todos os tratamentos, predominando *Rhodomonas* sp. e *Cryptomonas marssonii*. A classe Cryptophyceae apresenta ampla distribuição em lagos húmicos e em ambientes estáveis com elevada disponibilidade de nutrientes (Phlips *et al.*, 2010), características que ocorreram no Ponto 2. As criptofíceas geralmente aparecem após o declínio de outras algas porque sua capacidade de locomoção e de assimilação da matéria orgânica lhes conferem vantagens em ambientes com populações senescentes. Provavelmente esses fatos ocorreram no presente estudo com a senescência das cianofíceas e posterior estabelecimento das criptofíceas (Crossetti & Bicudo, 2005). Contudo, ao longo dos dias, as variações nas concentrações dos nutrientes podem ter favorecido a modificações da comunidade para domínio novamente da classe Cyanophyceae no tratamento NP no 10º dia. Um exemplo disso é que a razão NID:orto-P apresentou diminuição ao longo dos dias de experimento sob essa condição experimental (Tabela 1.11).

1.6.4. Razão clorofila-a:densidade

Gêneros com tamanho pequeno (nano- e picoplanctônicos, que apresentam tamanho entre 0,2 a 20 µm) apresentam preferências por ambientes com maior disponibilidade de nutrientes. Geralmente, as cianobactérias podem apresentar dominância em número, mas devido a ocorrência de organismos com células pequenas

outros grupos algais podem apresentar maior biovolume (Muhid *et al.*, 2013), como observado no Ponto 2, em Ct0 e no 10° dia de experimento. Embora a classe Cyanophyceae apresentasse maior número, no tratamento NP a diatomácea *Cyclotella* sp. predominou em biovolume.

No Ponto 1, apesar de o tratamento NP ter apresentado maior biomassa fitoplanctônica na forma de clorofila-*a*, no 4° e 10° dia, o número de indivíduos foi maior no tratamento N. A classe Cyanophyceae apresentou maior número de indivíduos nesses dias (Figura 1.10), mas a contribuição de clorofila-*a* a partir da razão clorofila-*a*:densidade foi baixa (Tabela 1.14). Por outro lado, no tratamento N, a classe Chlorophyceae que apresentou baixa densidade no 4° e 10° dias contribuiu com os maiores valores obtidos através da razão clorofila-*a*:densidade. A maior biomassa em Ct0 pode estar associada também ao alto conteúdo de clorofila-*a* presente na classe Chlorophyceae, como pode ser observado na Tabela 1.14.

No Ponto 2 Ct0 apresentou elevado número de indivíduos em relação aos mesocosmos, com alta contribuição de clorofila-*a* oriunda das classes Bacillariophyceae, Cyanophyceae e Cryptophyceae. Quando comparados os pontos, observa-se altos valores da razão clorofila-*a*:densidade em Ct0 no Ponto 2 o que pode estar relacionado a limitação por luz, devido a ocorrência de águas ricas em substâncias húmicas o que favorece a predominância de organismos maiores e com relativa motilidade, como as Cryptophyceae. No 4° dia, NP apresentou alto conteúdo de clorofila-*a*, com as classes Chlorophyceae e Euglenophyceae apresentando 7,4 e 3,4 pg Cla.cel⁻¹. A alta concentração de clorofila-*a* por indivíduo pode estar associada a maior disponibilidade de nutrientes nessa condição experimental. Deste modo, no período até o quarto dia, a comunidade estaria alocando recursos para o crescimento celular nesse tratamento. O tratamento N, com maior número de indivíduos no 4° dia, apresentou menor concentração de clorofila-*a* por indivíduo do que o tratamento NP. No 10° dia o número de indivíduos diminuiu 78%, o que demonstra que a mudança da comunidade de Cryptophyceae para Cyanophyceae possa ter influenciado nas concentrações de clorofila-*a* (Tabela 1.14).

Tabela 1.14: Valores obtidos a partir da razão clorofila-a:densidade (pg Cla.cel⁻¹).

Ponto 1	1° dia	4° dia	4° dia	4° dia	4° dia	10° dia	10° dia	10° dia	10° dia
	Ct0	Controle	N	P	NP	Controle	N	P	NP
Cyanophyceae	0.10	0.08	0.03	0.08	0.03	0.01	0.01	0.05	0.03
Chlorophyceae	1.06	0.12	0.17	0.09	0.08	0.02	0.11	0.10	0.11
Cryptophyceae	0.24	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01	0.05
Bacillariophyceae	-	0.02	0.01	0.02	0.06	0.01	0.03	0.08	0.03
Euglenophyceae	-	0.01	0.00	0.01	0.08	-	-	-	-
Ponto 2	1° dia	4° dia	4° dia	4° dia	4° dia	10° dia	10° dia	10° dia	10° dia
	Ct0	Controle	N	P	NP	Controle	N	P	NP
Cyanophyceae	2.52	0.09	0.45	0.27	0.34	0.56	0.10	0.02	0.01
Chlorophyceae	-	0.60	0.31	0.18	7.40	-	0.32	0.07	0.11
Cryptophyceae	2.51	0.01	0.11	0.02	3.42	0.22	0.32	0.16	0.58
Bacillariophyceae	4.02	0.73	0.38	0.01	0.60	0.18	0.28	0.10	0.43
Euglenophyceae	0.33	0.12	0.15	0.15	4.04	0.21	0.89	0.06	0.58

1.6.5. Eutrofização e futuras direções

Em muitos ecossistemas aquáticos ocorre colimitação nutricional, com os produtores primários apresentando maior resposta ao enriquecimento por mais de um nutriente, geralmente N e P (Elser *et al.*, 2007). As atividades antrópicas, como a liberação de efluentes domésticos e industriais, na maioria das vezes, liberam em conjunto para os ecossistemas aquáticos esses nutrientes (Withers *et al.*, 2014), o que potencializa a ação sinérgica, como destacado pelos experimentos realizados, causando maiores alterações na biomassa e estrutura da comunidade.

A lagoa de Iquiparí pode ser considerada segundo a Organização para Economia e Desenvolvimento (OECD) (Vollenweider & Kerekes, 1982) e por meio do índice de estado trófico (Carlson, 1977) como um ambiente aquático eutrofizado (concentração de clorofila-a >100 µg L⁻¹, e transparência da coluna d'água inferior a 0,03 metros). Esta característica é esperada em lagoas costeiras tropicais devido a sua localização entre o continente e o ambiente marinho, em local de baixa altitude, o que potencializa o aporte de materiais da sua bacia de drenagem, quando localizada em altitudes maiores. Em tais ambientes, o aporte de energia externa sob a forma de radiação solar e ventos incrementa a atividade biológica no sistema, resultando em elevada produção primária (Suzuki *et al.*, 2002). A dominância de cianobactérias na água da lagoa e durante os experimentos, principalmente no Ponto 1 são indicativos de que medidas de manejo e conservação da lagoa de Iquiparí devem ser realizadas. Embora nesse ecossistema aquático ainda não tenha ocorrido “*blooms*” de cianobactérias e

produção de toxinas, a redução da biodiversidade pode ser um problema a ser enfrentado. A não ocorrência de macrófitas aquáticas submersas já é observada ao longo da lagoa em resposta ao aumento da biomassa fitoplanctônica e diminuição da transparência da coluna d'água. Caso ocorra o incremento de nutrientes na lagoa de Iquiparí alterações na composição, dominância e na sucessão da comunidade fitoplanctônica são esperadas, podendo ocorrer "*bloom*" algal de espécies potencialmente tóxicas e também modificações na cadeia trófica, resultando em maiores alterações principalmente se ocorrer o aporte de ambos os nutrientes.

1.6.6. Conclusões

- O enriquecimento por nutrientes alterou a estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica. Porém, o confinamento da água nos mesocosmos alterou as características físico-químicas da água e influenciou a biomassa e o número de indivíduos que passaram a apresentar menor número do que o observado inicialmente na água da lagoa, Ct0.
- Embora os resultados dos parâmetros obtidos a partir dos experimentos nos mesocosmos tenham sido diferentes dos encontrados na lagoa, a metodologia utilizada foi sensível para observar alterações entre os tratamentos.
- A primeira hipótese de que a densidade, biomassa e composição da comunidade fitoplanctônica correlacionaria positivamente com a adição de nutrientes foi refutada. A adição de nutrientes estimulou esses dados ecológicos. Contudo, a ocorrência de limitação e colimitação nutricional detectada ao longo dos experimentos nos tratamentos com adição individualizada dos nutrientes impossibilitaram uma resposta mais clara da comunidade após a adição do nutriente.
- No presente estudo a adição de apenas um nutriente estimulou a limitação pelo outro nutriente. Na fração dissolvida foi possível observar claramente a ocorrência de colimitação nutricional em ambos os pontos. Neste caso, o tratamento P foi limitado por N enquanto o tratamento N foi limitado por P. Com relação à fração particulada, as respostas de limitação nutricional não foram tão claras, o que pode ser devido às baixas concentrações de P-particulado. Contudo, em ambos os pontos ocorreu algum grau de

limitação por N ou P, não podendo descartar o valor desses nutrientes sobre o controle da biomassa fitoplanctônica.

- A segunda hipótese de estudo, de que a adição combinada dos nutrientes resultaria em maior biomassa, densidade e modificações na composição da comunidade em relação aos tratamentos com adição individualizada foi aceita. A ação sinérgica dos nutrientes tende a estimular e incrementar as respostas da comunidade fitoplanctônica, diminuindo ou evitando a limitação nutricional, o que foi observada no presente estudo.

- O predomínio em número de indivíduos e biovolume da classe Cyanophyceae foi evidente no estudo, principalmente devido às características encontradas na lagoa, como por exemplo, estado eutrófico, altas concentrações de clorofila-a, baixa transparência, além de elevado pH, condições propícias para o desenvolvimento de organismos pertencentes a essa classe.

- Embora essas características sejam esperadas em lagoas costeiras tropicais, a dominância de cianobactérias na água da lagoa e durante os experimentos são indicativos de que medidas de manejo e conservação da lagoa de Iquiparí devem ser consideradas.

- Caso ocorra o incremento de nutrientes, principalmente se forem fontes concomitantes de N e P, não apenas alterações na composição, dominância e na sucessão da comunidade fitoplanctônica são esperadas, mas também modificações em toda a cadeia trófica, como a ausência de macrófitas aquáticas submersas que já é observada na água da lagoa.

CAPÍTULO 2

APLICAÇÃO DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO NA DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO PRIMÁRIA E RESPIRAÇÃO PELÁGICA NA LAGOA DE IQUIPARÍ (SÃO JOÃO DA BARRA, RJ)

2.1. Justificativa

O metabolismo aquático pode ser traduzido como o balanço entre a produção primária bruta (PPB), síntese de matéria orgânica, e respiração (R)/degradação, resumida na seguinte equação: $CO_2 + H_2O \Leftrightarrow (CH_2O) + O_2$. A PPB ocorre a partir da assimilação do carbono inorgânico em biomassa vegetal com liberação de oxigênio, no caso da fotossíntese aeróbica. Ainda existe outro tipo de fotossíntese como a anaeróbica ou fotorredução que utiliza o gás sulfídrico como doador de elétrons e resulta em liberação de S_2 , sempre em presença de luz, mas que não será abordada no presente estudo. A R e a decomposição consomem oxigênio, liberando carbono na forma inorgânica, isto é, CO_2 , após a oxidação completa do carbono orgânico. A respiração e a decomposição ocorrem na presença ou não de luz, durante as 24 horas do dia. A produção primária líquida (PPL) é a diferença entre a PPB e R (Grace & Imberger, 2006; Tuttle *et al.*, 2008; Staehr *et al.*, 2012).

O estudo do metabolismo aquático sempre foi um dos aspectos mais importantes em investigações limnológicas e oceanográficas (Staehr *et al.*, 2012). Diferentes objetivos norteiam os estudos que determinam medidas metabólicas em ecossistemas aquáticos. Dentre eles, podem ser destacados: (1) a determinação do estado trófico do ecossistema; (2) a avaliação do balanço entre as trocas com os sistemas adjacentes; (3) e as respostas do metabolismo às atividades naturais e antrópicas. Adicionalmente, a avaliação do metabolismo permite o conhecimento sobre o ciclo global do carbono e também a identificação das fontes e sumidouros de CO_2 atmosférico (Staehr *et al.*, 2012).

A produção primária frequentemente é limitada pela disponibilidade de nutrientes. Nesse sentido, em eventos de eutrofização há a tendência de ocorrer aumento da produção primária e alterações nos processos biológicos e físico-químicos. A entrada externa de nutrientes para a lagoa aumenta a biomassa dos produtores primários, as taxas de fotossíntese e o pH da água. O aumento da biomassa causa

diminuição da transparência da água e aumento das taxas de decomposição da matéria orgânica diminuindo as concentrações de OD e podendo causar a anoxia. A importância dos nutrientes no controle algal e sobre o metabolismo aquático foi observado em alguns estudos que abordam a redução da entrada do nutriente limitante (Cooke *et al.*, 2005). Contudo, embora seja conhecida a importância da eutrofização sobre o metabolismo aquático, o limite entre as possíveis vantagens e desvantagens desse processo e sua influência sobre o metabolismo aquático ainda não estão totalmente claras.

Os microrganismos são os responsáveis por grande parte da fotossíntese e respiração na maioria dos ecossistemas aquáticos (Fouilland & Mostajir, 2010). Dentre eles, podem ser destacados os organismos fitoplanctônicos, que são à base da cadeia trófica nesses ecossistemas e importantes no ciclo global do carbono (Marra, 2009). Além do fitoplâncton, bactérias e também organismos maiores, como as macrófitas aquáticas e peixes, participam ativamente do metabolismo nesses ecossistemas (Grace & Imberger, 2006). Dentre os produtores primários o fitoplâncton normalmente é responsável por entre 0,03 a 18% da produção primária anual dos ecossistemas lacustres. As macrófitas aquáticas submersas apresentam produção primária anual que pode variar de zero a 76%, enquanto a comunidade perifítica apresenta variação na produção entre 0,03 a 11%. A ampla diferença observada para a mesma comunidade ocorre porque há diferentes tipos de ecossistemas aquáticos e diferentes regiões climatológicas. Com relação à respiração, a comunidade planctônica é a responsável por aproximadamente 97% da respiração nos ecossistemas aquáticos lacustres (93% realizada pelo bacterioplâncton), enquanto a comunidade bentônica é responsável por apenas 3% (Westlake, 1963; Joiris, 1977; Vadeboncoeur & Steinman, 2002).

Além da composição e dominância dos organismos, outros fatores influenciam o metabolismo do ecossistema aquático. Desta forma, os fatores locais e regionais, a partir de variações na vegetação e geomorfologia, tempo de residência da massa de água, e também variações que ocorrem durante o dia, meses, estações e anos (radiação solar e temperatura), disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica, refletem em todo o ecossistema alterando as taxas metabólicas (Staeher *et al.*, 2007; Staeher *et al.*, 2010; Tank *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2011). Com relação aos nutrientes, a resposta do metabolismo aquático pode causar tanto efeitos positivos, como, aumento da produtividade, quanto efeitos negativos, como a anoxia no sistema. O incremento de nutrientes pode influenciar também na entrada e saída de CO₂ do ecossistema

aquático o que reflete no ciclo global do carbono (Marotta, 2006; Kemp *et al.*, 2009; Staehr *et al.*, 2012).

Desde a década de 1920, diferentes técnicas foram criadas a fim de mensurar as taxas metabólicas de ecossistemas aquáticos, baseadas na estequiometria da fotossíntese (Kohler, 1998). O trabalho pioneiro, nesta área, foi o de Gaarder & Gran (1927), no qual se determinou a variação nas concentrações de OD, utilizando garrafas claras e escuras em incubações.

Atualmente existem diferentes métodos para determinação do metabolismo aquático, que variam na precisão e escala temporal e espacial (litros para Km³, hora para anos) (Staehr *et al.*, 2012). Dentre os principais métodos existentes para avaliação do metabolismo aquático, destacam-se: 1) incubação em garrafas ou câmaras, 2) o método da “Água Livre”, que analisa variações nas concentrações de OD e de CO₂, 3) utilização de isótopos radioativos e estáveis, 4) sensoriamento remoto e 5) balanço de massa de C, N e P (Staehr *et al.*, 2012; Carvalho, 2013; Hoellein *et al.*, 2013).

Estudos indicam que nenhum destes métodos é precisamente confiável e permite a quantificação do metabolismo com exatidão (Tank *et al.*, 2010; Staehr *et al.*, 2012; Carvalho, 2013). Quando comparados os métodos, os resultados geralmente são inconsistentes entre eles (Yacobi *et al.*, 2007). Um dos problemas encontrados consiste em que na maioria dos métodos, a produção da matéria orgânica pela comunidade planctônica é determinada pela diferença entre a fotossíntese diurna e a respiração durante um período de 24 horas. Contudo, a respiração é mais difícil de ser medida do que a fotossíntese, devido às taxas mais baixas e porque as técnicas disponíveis para determinar a fotossíntese não são eficientes na determinação da respiração (Markager *et al.*, 1992).

Embora a maior parte das concentrações de OD e carbono inorgânico dissolvido (CID) no ambiente aquático sejam regulados pelo metabolismo dos organismos submersos (Cole *et al.*, 2000), as mudanças em suas concentrações podem ocorrer também devido a processos como:

- ✓ Entrada de substâncias de origem alóctone no sistema;
- ✓ Interações físico-químicas induzidas pela luz solar, como a foto-oxidação, ocasionando perda significativa de CO₂; e a fotorrespiração, que pode reduzir a eficiência da fotossíntese devido à competição de O₂ e CO₂ pela enzima Rubisco,
- ✓ Trocas com a atmosfera (Hanson *et al.*, 2006), que devem ser consideradas na avaliação do metabolismo aquático.

Um resumo com as vantagens e desvantagens de cada método utilizado no presente estudo é realizado a seguir.

1- Método de incubação em garrafas

O método de incubação em garrafas foi criado em 1927 (Gaarder & Gran, 1927) e ainda é amplamente utilizado. Inicialmente as incubações eram realizadas no claro e no escuro medindo as variações nas concentrações de OD e CID na água. Posteriormente, as incubações puderam ser realizadas somente no claro a partir do acúmulo de ^{14}C adicionado na água e também a partir da adição de isótopos estáveis como o ^{13}C e ^{18}O . Pelo método de incubação em garrafas é possível controlar o experimento e caso seja o objetivo do estudo, integrar o sedimento, avaliando o metabolismo pelágico-bentônico (Staeher *et al.*, 2012).

O método de incubação em garrafas que avalia as variações nas concentrações de OD ou CID é simples, barato e determina especialmente a PPB e R da coluna d'água. Entretanto, este método mede diretamente apenas a PPL e a R (Grace & Imberger, 2006). Outra questão que deve ser considerada é a baixa precisão desse método em ambientes oligotróficos, visto que as variações tanto no OD quanto de CID durante o tempo de incubação podem não ser significativas. As medições realizadas no campo que abrangem várias horas durante o dia podem avaliar períodos onde a produção primária geralmente é inibida, horário próximo ao meio dia. No outro extremo, o curto tempo dos experimentos, geralmente 12 horas, gera dificuldades de capturar eventos de alta produtividade. Além desses problemas, quando avaliada as variações nas concentrações de OD e CID pelo método de incubação em garrafas é assumido que a respiração na luz é igual à respiração no escuro (Bower *et al.*, 1987; Carvalho, 2013).

Em relação à incubação em garrafas a partir da adição do isótopo radioativo ^{14}C , se a incubação dura poucas horas, assume-se que é medida a PPB. Os resultados da PPB podem ser errôneos, porque o ^{14}C respirado volta para a água e é usado novamente na produção primária, o que pode não estar relacionado com a PPB (Carvalho, 2013).

O método que utiliza incubações e isótopos estáveis permite que as medições sejam feitas com menos erros e com medições reais da PPB. Embora existam inúmeras vantagens, a utilização de métodos com isótopos estáveis também

apresentam desvantagens, como a utilização de químicos perigosos, por ainda ser uma técnica custosa devido aos equipamentos e materiais, além de requerer profissionais capacitados e treinados para a utilização dos aparelhos, o que dificulta sua ampla utilização (Carvalho, 2013).

Para todas as variações do método de incubação em garrafas, os resultados apresentam algumas incertezas como modificações no ambiente referentes aos efeitos da incubação. Os efeitos de incubação podem causar, por exemplo, depleção de nutrientes, alteração na hidrodinâmica, remoção do efeito da reaeração, o que pode gerar resultados errôneos. As trocas entre diferentes massas d'água (se existirem) e as trocas entre a atmosfera e a água devem ser consideradas quando é avaliado o metabolismo aquático (Grace & Imberger, 2006). A técnica pode ainda apresentar problemas com a escala de tamanho do experimento (Grace & Imberger, 2006; Tank *et al.*, 2010) e as diferenças metodológicas empregadas em cada estudo podem dificultar comparações. Muitas vezes os autores não descrevem minuciosamente a metodologia utilizada, deixando de informar, por exemplo, o tamanho dos recipientes utilizados e as variações nas intensidades luminosas (Chen *et al.*, 2000; Staehr *et al.*, 2010).

2- Método da “Água Livre”

Esse método foi primeiramente utilizado em recifes de corais por Sargent & Austin em 1949, mas foi com Odum e colaboradores, a partir de 1955, avaliando o metabolismo de rios, lagos e também recifes de corais, que a utilização da técnica evidenciou sua importância para os estudos sobre o metabolismo aquático (Staehr *et al.*, 2010). O método da “Água Livre” é o mais utilizado atualmente para avaliação do metabolismo aquático (Staehr *et al.*, 2010; Tank *et al.*, 2010) e abrange uma grande escala espacial (Staehr & Sand-Jensen, 2007). Este método é determinado a partir do balanço entre fotossíntese e respiração, além de considerar a troca entre a atmosfera e água a partir de mudanças nas concentrações de OD, CID e isótopos de oxigênio, ^{17}O (Staehr *et al.*, 2010).

O método da “Água Livre” requer medidas precisas da concentração de OD e CID. Devido a sua realização *in situ*, em ambientes turbulentos, podem-se obter resultados incertos devido às variações nos gases que ocorrem durante as medições. Embora seja mais difícil trabalhar com sistemas abertos, este método traz resultados mais concretos e realistas (Carvalho, 2013).

A técnica da “Água Livre” apresenta também pontos negativos. Por exemplo, se utilizados sensores, estes devem ser colocados em locais onde há produção e consumo de oxigênio. Dependendo do posicionamento das sondas, pode haver modificações nas estimativas. Além disso, devido à utilização de sondas avançadas, o custo deste método tem se elevado, o que dificulta sua utilização concomitante em várias regiões do ecossistema de estudo (Staeher *et al.*, 2010).

A heterogeneidade horizontal e vertical do ecossistema é um dos problemas relacionados a esse método. Apenas a utilização de um sensor não consegue determinar o metabolismo de todo lago, sendo difícil integrar as zonas mais profundas. As características físicas do ecossistema também podem atrapalhar a identificação da influência dos componentes biológicos no metabolismo. O método da “Água Livre” não é capaz de identificar qual componente, seja fitoplâncton, algas bentônicas ou macrófitas aquáticas submersas, é o principal responsável pela PPL – a PPB não é medida diretamente, pois a respiração no claro não é conhecida – e também pela respiração (Grace & Imberger, 2006; Carvalho, 2013). Outra desvantagem refere-se à presença, especialmente em ambientes com zonas litorâneas bem desenvolvidas, de macrófitas emersas que podem representar um importante integrante da produção primária do ecossistema – estas não são incluídas no cômputo do metabolismo utilizando o método da “Água Livre”.

Atualmente existem diversos métodos para determinar a PPL de macrófitas emergentes. Uma revisão completa sobre este tema pode ser obtida em Santos (2004). Outra incerteza é a dificuldade de avaliar com precisão o fluxo de O₂ entre o ar e a água (Staeher *et al.*, 2010). As concentrações de OD e a respiração que ocorrem no sedimento podem não ser detectadas por sensores na coluna d’água, subestimando as taxas de heterotrofia bêntica (Hoellein *et al.*, 2013). Os fatores reguladores do metabolismo aquático como OD, temperatura da água, profundidade de mistura, latitude, dia do ano, altitude, salinidade, vento, irradiância, COD, P-total e clorofila-a, devem ser levados em consideração quando calculado o metabolismo de ecossistemas aquáticos utilizando a técnica da “Água Livre” (Staeher *et al.*, 2010).

Como vantagem, o método da “Água Livre” não utiliza químicos perigosos (Kohler, 1998). Este é um método alternativo ao método de incubações em garrafas, pois evita os erros oriundos do ‘efeito garrafa’ nas medições, proporcionando resultados mais realistas. O método utilizando sondas apresenta alta qualidade na determinação do OD, como medida em todos os componentes do sistema, além de ser

de fácil coleta de dados, com taxas diárias de PPL, R e PPB (Staehr *et al.*, 2012; Carvalho, 2013).

Os métodos de incubação em garrafas e “Água Livre”, com exceção daqueles que utilizam isótopos estáveis, medem a fotossíntese e a respiração separadamente, embora os processos ocorram simultaneamente, o que pode gerar dados errôneos (Bower *et al.*, 1987; Carvalho, 2013).

3- Método Água Livre com adição de ^{13}C (AL ^{13}C)

No presente estudo foi desenvolvido um novo método de determinação do metabolismo aquático utilizando a adição de ^{13}C . A adição de ^{13}C permite a modelagem do sistema de forma que as medições da fotossíntese e respiração sejam feitas diretamente e sem necessidade de incubações no escuro. A PPL por este novo método é calculada a partir da diferença entre o COP final e inicial, levando em consideração a produção e o consumo de COD.

A fotossíntese e a respiração além de alterarem a quantidade de OD e de CI, também modificam as proporções de isótopos estáveis sendo assim possível à utilização de isótopos estáveis na determinação do metabolismo aquático (Carvalho, 2013). Os métodos que existem até o momento utilizam isótopos estáveis de oxigênio para determinação do metabolismo aquático em sistemas abertos e fechados. Embora este método apresente algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais, algumas incertezas já foram encontradas para esses métodos (Carvalho, 2013).

Em relação à utilização de isótopos de carbono há apenas um estudo até o momento que determina o metabolismo aquático em sistemas fechados (Carvalho & Eyre, 2012). O presente estudo é um trabalho pioneiro na determinação do metabolismo aquático utilizando isótopos estáveis de carbono em sistemas abertos. A utilização de isótopos estáveis na determinação do metabolismo aquático permite avaliar diretamente a PPB porque determina a respiração na luz. Além disso, a realização de experimentos em sistemas abertos diminui os efeitos referentes à incubação o que gera resultados mais realistas (Carvalho, 2013).

Os isótopos estáveis de carbono são o ^{12}C e ^{13}C . A abundância do ^{12}C na superfície terrestre é de 98,89%, enquanto de ^{13}C é igual a 1,11% (Fry, 2008). As diferenças entre os isótopos de carbono vão além da abundância. A presença de um nêutron a mais no núcleo do isótopo estável mais pesado (^{13}C) resulta em reações

mais lentas do que ocorre no isótopo estável mais leve (^{12}C) (Fry, 2008). Neste sentido, as células durante a fotossíntese preferencialmente absorvem mais rápido o ^{12}C do que o ^{13}C , processo conhecido como fracionamento isotópico. A mudança na proporção de isótopos deve-se também ao CO_2 liberado durante a respiração que apresenta a composição isotópica próxima a da matéria orgânica (Fry, 2008; Carvalho, 2013).

Para realização dos experimentos utilizando isótopos estáveis deve ser realizada inicialmente uma coleta da água no ambiente de estudo e posterior análise da concentração de CID. Após conhecida a concentração de CID, antes de começar o experimento, é realizada a adição do ^{13}C (bicarbonato de sódio, 99% enriquecido com ^{13}C), com uma concentração 2 a 5% maior do que a concentração de CID presente na água. A adição de ^{13}C ao invés de ^{12}C nos experimentos ocorre devido à velocidade das reações que ocorrem no ^{13}C serem mais lentas do que no ^{12}C . Após o período de incubação, as amostras são filtradas em filtros que passaram por pré-combustão (~400-500 °C). Os filtros são acidificados com solução de HCl, secos em estufa a 60°C e colocados em um dessecador, para posterior análise dos isótopos estáveis de carbono. Enquanto na fração dissolvida é adicionado geralmente cloreto de mercúrio para preservação da amostra até a análise. Maiores detalhes sobre o novo método estão no item 2.3.1.3.

Um resumo dos pontos positivos e negativos de cada técnica utilizada na determinação do metabolismo aquático utilizada no presente estudo pode ser observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Resumo dos pontos positivos e negativos dos três métodos utilizados no presente estudo para a determinação do metabolismo aquático. Adaptado de Staehr *et al.* (2012).

Método	Pontos positivos	Pontos negativos
Incubação em garrafas	<p>Medida direta</p> <p>Controle do experimento</p> <p>Medições precisas</p> <p>Pode separar os componentes do ecossistema, discriminando a respiração e produção dos diferentes componentes</p>	<p>Contaminação e problema com a escala; variação de resultado entre as réplicas e intensivo trabalho</p> <p>Altera a físico-química, pode ocorrer supersaturação de O₂.</p> <p>Problema na conversão de O₂ para C</p> <p>Diferenças metodológicas que dificultam comparações entre os estudos</p> <p>Troca ar-água de difícil quantificação</p>
“Água livre”	<p>Medições de todos os componentes do sistema</p> <p>Fácil coleta de dados</p> <p>Medidas precisas com estimativa mais alta do metabolismo</p> <p>Curto tempo para detectar a produtividade</p> <p>Sensores variados</p> <p>Não ocasiona alterações físico-químicas (luz, temperatura, nutrientes, etc).</p>	<p>Dificuldade para quantificar o fluxo ar-água. Não isola diferentes componentes do ecossistema</p> <p>Fatores físicos como vento e temperatura podem atrapalhar o biológico</p> <p>Não determina a respiração anaeróbica</p> <p>Heterogeneidade do ambiente – ambientes estratificados ou com grande fluxo de águas subterrâneas comprometem as medições</p> <p>Não possui réplicas</p>
AL ¹³ C	<p>Medido em todos os componentes do sistema</p> <p>Método sensível</p> <p>Permite estimar a respiração na luz</p>	<p>Alto custo</p> <p>Troca ar-água de difícil quantificação</p> <p>Químicos perigosos</p> <p>Intensivo trabalho na amostragem</p>

2.2 Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Avaliar a respiração planctônica (fito- e bacterio-) na luz, e a produção primária bruta em unidades de carbono na lagoa de Iquiparí a partir de um novo método de determinação do metabolismo aquático, a fim de obter respostas relacionadas ao metabolismo e ao ciclo do carbono em lagoas costeiras.

O estudo ainda testou a hipótese de que o enriquecimento com nutrientes favorece a ocorrência de um metabolismo autotrófico devido ao incremento na produção primária em relação aos processos degradativos.

2.2.2. Objetivos Específicos

1 - Comparar os valores de produção primária bruta e respiração medidos através do método de incubação em garrafas com o novo método Água Livre com adição de ^{13}C (AL ^{13}C).

2 - Quantificar diversos fluxos de carbono, incluindo sua entrada e saída para a atmosfera, fotossíntese, respiração e produção e consumo da matéria orgânica dissolvida a partir das concentrações de CID e ^{13}C .

3 - Relacionar o enriquecimento por nutrientes em cada mesocosmo com os resultados obtidos pelos métodos avaliados.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Metodologia

Concomitantemente aos experimentos de adição de nutrientes realizados nos mesocosmos nos Pontos 1 e 2, descritos na seção 1.3, Materiais e Métodos do Capítulo 1, nos doze mesocosmos, considerando o controle, água da lagoa sem adição de nutrientes e os tratamentos enriquecidos por nutrientes, N, P e NP, também foram realizados experimentos relacionados ao metabolismo aquático. Para isso, três métodos foram utilizados, incubação em garrafas, “Água Livre” e o novo método AL ^{13}C .

Os resultados físico-químicos e biológicos obtidos no Capítulo 1 foram utilizados na discussão dos resultados desse capítulo. As metodologias empregadas em cada método para determinação do metabolismo aquático são descritas a seguir.

2.3.1.1. Método – Incubação em garrafas

O método de incubação em garrafas determina o metabolismo a partir de variações nas concentrações de OD que foram medidas com o auxílio do oxímetro (oxímetro portátil YSI 55). Para o experimento de incubação em garrafas, duas garrafas com capacidade de 50 mL, uma clara e uma escura (coberta com papel alumínio), cheias com a água presente no mesocosmo no dia do experimento foram colocadas no fundo de cada mesocosmo. A partir da variação nas concentrações de OD pode-se estimar a respiração e a fotossíntese. Na garrafa clara, é determinada a fotossíntese líquida. Como a fotossíntese ocorre apenas na presença de luz, na garrafa escura é possível, a partir da modificação na concentração de OD, determinar a respiração. O metabolismo aquático pode ser obtido a partir das seguintes fórmulas:

$$PPL = (OD)_{garrafa_clara}^* - (OD)_{inicial}$$

$$R = (OD)_{inicial} - (OD)_{garrafa_escura}^*$$

Onde: * significa após o período de incubação.

Os experimentos de incubação em garrafas foram realizados nos doze mesocosmos, no 1º, 3º e 9º dia de experimento, com incubações que compreenderam o período das 6 às 18 horas, totalizando 12 horas de experimento. Neste caso, as amostras de água foram retiradas cuidadosamente das garrafas a fim de evitar a formação de bolhas e perdas de OD para a atmosfera, colocadas em um béquer para posterior medição com o oxímetro.

2.3.1.2. Método – “Água Livre”

Como o método de incubação em garrafas, o método “Água Livre” foi determinado a partir da variação das concentrações de OD com o auxílio do oxímetro.

Este método permite obter dados sobre a PPL diurna e respiração (período noturno), calculando o metabolismo total do sistema. Além da fotossíntese e respiração, ainda pode ser incluída as trocas de oxigênio com a atmosfera como fonte ou perda de O₂. A PPL foi calculada pela seguinte fórmula:

$$PPL = (OD)tarde - (OD)manhã$$

As medições de OD pelo método “Água Livre” foram diárias, às 6 horas e 18 horas no 1º, 2º, 3º e 9º dia em cada mesocosmo. Nos demais dias às medições foram realizadas às 10 horas em todos os casos com o auxílio do oxímetro colocado dentro de cada mesocosmo na hora da medição.

Para calcular o balanço metabólico foram utilizados dados da soma da atividade biológica diurna e noturna de cada dia de experimento com o auxílio do programa bioflux que efetua cálculos levando em consideração as trocas com a atmosfera (Carmouze, 1994). A partir de dados obtidos de alcalinidade total, temperatura e salinidade foram calculadas as concentrações das diferentes formas de CO₂ e TCO₂ total em cada mesocosmo, utilizando um modelo de associação iônica proposto por Carmouze (1994). Para este método, um valor negativo da atividade biológica indica um sistema autotrófico (R<PPL), e resultados positivos, indicam metabolismo heterotrófico (R>PPL).

2.3.1.3. Método – Água Livre com adição de ¹³C (AL¹³C)

Este método é baseado em medições diretas de CID e $\delta^{13}\text{C}$, que mede as taxas de respiração e fotossíntese na luz baseado em unidades de carbono. Nos mesocosmos, o fluxo de carbono pode ser nas formas dissolvidas, CID e COD e particulada, COP. O modelo é um particionamento porque leva em consideração apenas o COP presente na coluna d’água dos mesocosmos. A comunidade perifítica por estar aderida a um substrato não foi considerada nos cálculos. Para maiores explicações ver seção 2.5.7. O mesmo ocorreu com as trocas entre a atmosfera que foi considerada como não pertencentes ao sistema (Figura 2.1). Para a realização dos cálculos é considerada a excreção de COD. Nesse caso, considera-se tanto a excreção pela comunidade fitoplanctônica quanto da comunidade zooplanctônica, pois foram utilizadas as concentrações de COP e COD nos cálculos. Os fluxos de carbono no sistema podem ser descritos como:

$$if = ii + r - p + ai - ia \quad (1)$$

$$of = oi - r + p - dp + dc \quad (2)$$

$$df = di + dp - dc \quad (3)$$

Onde: if = CID final,

ii = CID inicial;

r = respiração;

p = fotossíntese;

ai = entrada de carbono para o sistema;

ia = perda de carbono do sistema;

of = COP final;

oi = COP inicial;

dp = produção de COD;

dc = consumo de COD;

df = COD final;

e di = COD inicial.

Nessas equações o CID é diretamente determinado pela entrada e saída de carbono do sistema, respiração e fotossíntese da comunidade fitoplanctônica, enquanto o COP é determinado pela fotossíntese da comunidade fitoplanctônica, respiração, produção e consumo de COD. O COD é resultado da sua produção e do seu consumo, e os cálculos são independentes de todos os outros processos (fotossíntese, respiração, entrada e saída de carbono do sistema). A fotossíntese da comunidade fitoplanctônica e respiração são independentes da entrada e saída de carbono do sistema, mesmo se considerado a parte de fora do sistema, nesse caso, o perifíton e a troca com a atmosfera. A entrada e saída de carbono do sistema são dependentes de todos os outros cálculos (Figura 2.1).

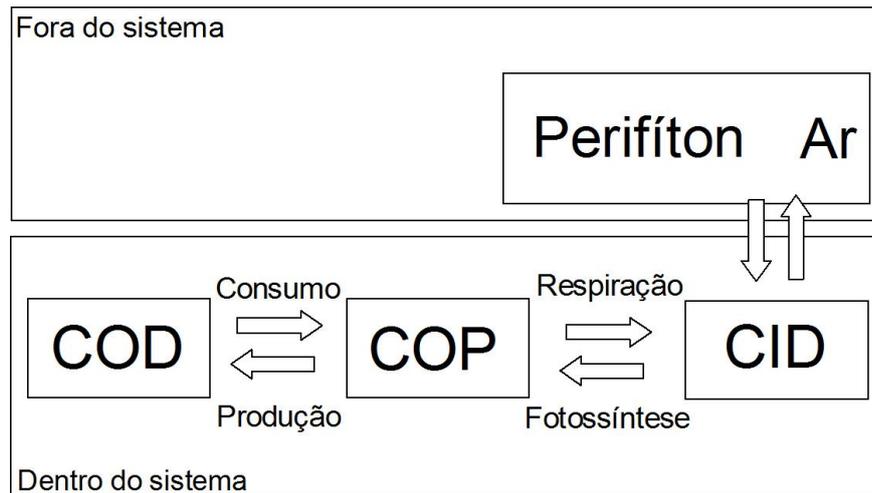


Figura 2.1. Fluxo de carbono dentro dos mesocosmos, compreendendo as formas dissolvidas e particuladas e os respectivos processos de consumo, produção, respiração e fotossíntese. A comunidade perifítica e a entrada e saída de carbono do sistema não foram considerados como pertencentes ao sistema.

Do mesmo modo, o balanço molecular para o isótopo mais pesado, ^{13}C , pode ser escrito como:

$$F_{if} \times i_f = F_{ii} \times i_i + F_r \times r - F_p \times p + F_{ai} \times a_i - F_{ia} \times i_a \quad (4)$$

$$F_{of} \times o_f = F_{oi} \times o_i - F_r \times r + F_p \times p - F_{dp} \times d_p + F_{dc} \times d_c \quad (5)$$

$$F_{df} \times d_f = F_{di} \times d_i + F_{dp} \times d_p - F_{dc} \times d_c \quad (6)$$

Onde F é a fração $^{13}\text{C}/(^{12}\text{C}+^{13}\text{C})$ sendo possível definir 3 sistemas de equações, cada uma com 2 equações: uma para as Equações 1 e 4, outra para as Equações 2 e 5, e outra para as Equações 3 e 6. Rearrmando estes pares de equações é possível escrever:

$$a_i = [F_{ia} \times (i_f - r + p - i_i) + F_r \times r - F_p \times p + F_{ii} \times i_i - F_{if} \times i_f] / (F_{ia} - F_{ai}) \quad (7)$$

$$p = [F_r \times (o_f - d_c + d_p - o_i) + F_{oi} \times o_i - F_{of} \times o_f + F_{dc} \times d_c - F_{dp} \times d_p] / (F_r - F_p) \quad (8)$$

$$d_p = [F_{dc} \times (d_f - d_i) + F_{di} \times d_i - F_{df} \times d_f] / (F_{dc} - F_{dp}) \quad (9)$$

O objetivo é resolver o modelo para a_i , i_a , r , p , d_p e d_c . Para isso, é necessário encontrar d_p e d_c para encontrar r e p , para finalmente encontrar a_i e i_a . Para isso, alguns parâmetros precisam ser estimados. Os parâmetros que podem ser diretamente

medidos são: ii, if, Fii, Fif, oi, of, Foi, Fof, di, df, Fdi e Fdf. Os parâmetros que precisam ser estimados, ou seja, não podem ser medidos diretamente são: Fia, Fai, Fr, Fp, Fdp e Fdc (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Estimativa dos valores para os parâmetros não medidos diretamente.

Parâmetro estimado	Realização da estimativa	Referência
Fp	É assumido como a média de Fi inicial e Fi final multiplicada pelo fator de fracionamento na fotossíntese (Bp, que varia entre 0.975 e 0.985).	Goericke <i>et al.</i> , 1994.
Fr	É assumido como variando entre a média de Fo inicial e Fo final, e 99% do valor de Fp.	Carvalho & Eyre, 2011.
Fdp	É assumido que varia como Fr.	
Fdc	É assumido como igual a média de Fdi e Fdf.	
Fai	É assumido como um valor que varia entre a composição atmosférica ($F = 0.01102441$) e uma mistura desse valor com uma do carbono gerado por uma possível respiração de carbono novo pelo perifíton, gerando um valor que é a média entre 0.01102441 e Fp.	Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001.
Fia	É assumido como a média de Fi inicial e Fi final multiplicada pelo fator de fracionamento na transferência da água para atmosfera (Bia, 0.99).	Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001.

Para alguns parâmetros estimados são utilizados valores médios dos parâmetros medidos (Tabela 2.2) a fim de simplificar os cálculos. Embora seja correto usar uma abordagem dinâmica, com os valores variando ao longo do tempo, a matemática envolvida seria muito complexa e com pouca modificação dos resultados apresentados.

Fp, Fdc e Fia são os valores médios de F nos compartimentos relevantes multiplicados por fatores de fracionamento. Para Fr, Fdp e Fai, no entanto, o mesmo não ocorre. No caso de Fr, o fator preponderante é a existência ou não de respiração de carbono novo, e também o fato de que parte do COP é composto por detritos (não respiram nem produzem COD); mas pode ser substrato para respiração e produção de COD. Neste caso, se o carbono que sai do COP apresenta $\delta^{13}\text{C}$ semelhante à média do COP ele é considerado como já existente no sistema. Caso o valor do $\delta^{13}\text{C}$ seja

semelhante com o valor de F_p , o COP é considerado novo no sistema. O mesmo raciocínio vale para F_{dp} .

No caso de F_{ai} , o fator que gera complexidade é a possível participação do perifíton. Se somente o perifíton contribuísse com CID no interior do sistema, o F nesse carbono seria no máximo igual à F_p . No entanto, foi claro no estudo que houve trocas gasosas com a atmosfera porque o vento sempre foi intenso, com média de 5 m s^{-1} no Ponto 1 e de 3 m s^{-1} no Ponto 2 (INMET, Estação Campos São Tomé). Segundo a escala Beaufort que classifica a intensidade dos ventos, esses ventos caracterizam-se por brisa moderada e fraca, provocando ondulações de 1 metro e 60 cm, respectivamente. Considerando o tamanho dos mesocosmos, a velocidade dos ventos permitiu constantes movimentos na água presente dentro deles, o que pode ter favorecido as trocas com atmosfera. Então, assumiu-se que o valor máximo de F_{ai} não seria o máximo teórico para o perifíton, mas sim uma mistura de 50% desse carbono com mais 50% do carbono vindo do ar.

F e β são parâmetros utilizados para o balanço molecular, mas seus valores são difíceis de serem trabalhados devido a pequena diferença entre os valores. Então, por uma questão de clareza, ao comentar sobre os resultados dos seguintes parâmetros são usados:

$$\delta^{13}\text{C} = [F / (R \times (1 - F) - 1)] \times 10^3\text{‰} \quad (9)$$

$$\Delta = [(\beta - F_{\text{água}}) / (1 - F_{\text{água}}) - 1] \times 10^3\text{‰} \quad (10)$$

Onde R é a razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de Vienna Pee-Dee Belemnite, igual a 0.0112372.

A PPL por este método foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$PPL = COP_{\text{final}} - COP_{\text{inicial}} + COD_{\text{produção}} - COD_{\text{consumo}} \quad (11)$$

No presente estudo, inicialmente, uma análise da concentração de CID foi realizada nos dois pontos amostrais, uma semana antes de cada experimento. Conhecida a concentração de CID, antes de começar o experimento, foi realizada a adição de 0,2% a mais de CID (na forma de ^{13}C) do que a concentração de CID inicialmente obtida na água da lagoa em cada mesocosmo (Figura 2.2).

Para este método foram coletadas amostras em garrafas plásticas, evitando a formação de bolhas no 1º, 3º e 9º dia de experimento, às 6 horas (tempo inicial) e às 18 horas (tempo final). As amostras foram imediatamente filtradas (filtros GF/F, 47 mm) com auxílio de seringa em filtros que passaram por pré-combustão (~400 - 500 °C) e acondicionada à fração particulada em placas de Petri e a fração líquida em frascos âmbar com capacidade de 40 mL contendo 40 µL de cloreto de mercúrio (10 gramas para 100 mL) para preservação da amostra (Figura 2.2).

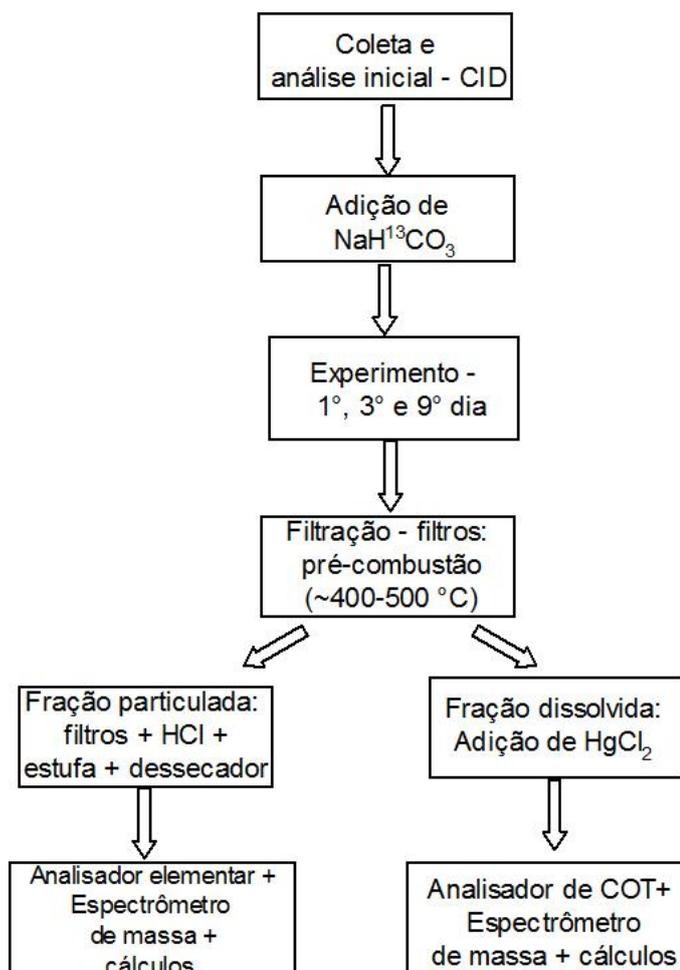


Figura 2.2. Fluxo esquemático das etapas realizadas utilizando o método AL^{13}C na determinação do metabolismo aquático na fração particulada e dissolvida.

2.3.2. Análises

2.3.2.1. Carbono inorgânico na fração dissolvida

A concentração de CID foi medida por coulometria, ou seja, a medição de coulombs usando um UIC 1055 coulômetro acoplado a um Marianda VINDTA 3C. Este é o método mais preciso para a medição do CID disponível atualmente (Mintrop *et al.*,

2000). Amostras d'água foram coletadas em frascos de 40 mL contendo 40 µL de solução saturada de cloreto de mercúrio para inibir a atividade bacteriana. Por ocasião da medição, uma alíquota de aproximadamente 20 mL da amostra foi introduzida no VINDTA, onde ocorreu a acidificação quantitativa da amostra. Imediatamente após a reação, o coulômetro titula as moléculas de CO₂, convertendo quantitativamente a um ácido orgânico, que então é neutralizado por moléculas de OH⁻. Cada molécula de OH⁻ corresponde a certa quantidade fixa de coulombs, e essa medição oferece exatamente a quantidade de CO₂ introduzida no equipamento.

2.3.2.2. Carbono orgânico na fração dissolvida

As amostras filtradas foram transferidas para frascos de vidro âmbar contendo 5% (v/v) de ácido fosfórico 10%, sendo estocado em geladeira até a análise propriamente dita. A determinação de COD foi realizada através de um analisador de carbono orgânico total (TOC-VcpH Shimadzu acoplado à autosampler). Toda a vidraria utilizada para essa análise foi lavada com solução sulfocrômica.

2.3.2.3. Carbono orgânico na fração particulada

As análises de COP foram realizadas utilizando um analisador elementar (Flash EA, Thermo Fisher). Após a filtração os filtros foram acidificados para retirar o excesso de carbonato, secos em estufa, embrulhados em cápsulas de estanho e então usados para medição do COP.

2.3.2.4. Composição isotópica do CID, COD e COP

A técnica utilizada consiste na estimativa da razão isotópica na matéria orgânica da fração particulada, por meio de um espectrômetro de massa (erro analítico da ordem de 0,2 ‰), que mede a razão entre o isótopo pesado e o leve, comparando os resultados com um padrão. Os filtros foram colocados em um dessecador na presença de ácido clorídrico concentrado pelo período de 3 a 4 horas a fim de retirar o excesso de carbonato e secos em estufa a 60 °C. Os filtros secos foram embrulhados em cápsulas de estanho e então usados para medição do ¹³COP e COP usando um analisador elementar (Flash EA, Thermo Fisher) acoplado a um espectrômetro de

massa para medição de isótopos estáveis (Delta V plus, Thermo Fisher) por meio de um redutor de fluxo (Conflo IV, Thermo fisher). As amostras foram medidas em conjunto com substâncias de referência (ureia e glicose) para calibração dos resultados.

A proporção de ^{13}C no CID e COD foi determinada com o uso de um TOC analyzer (Aurora 1030, OIC Scientific) acoplado a um espectrômetro de massa (Delta V advantage, Thermo Fisher). As amostras foram filtradas com auxílio de seringas e acondicionadas em frascos de vidro de 40 mL contendo 40 μL de cloreto de mercúrio para inibir a atividade bacteriana, e mantidos sob refrigeração a 4 °C até a medição.

Por ocasião da medição, por meio de um amostrador automático, uma alíquota de aproximadamente 5 mL da amostra foi transferida para o analisador de carbono orgânico (Aurora 1030, OI analytical). Uma alíquota de 1 mL foi transferida do frasco para a câmara de reação no analisador de carbono orgânico e adicionado 1mL de ácido fosfórico (5%). A mistura foi borbulhada com gás He e o CO_2 resultante da acidificação foi conduzido ao espectrômetro de massa. Após a acidificação, 4 mL de uma solução de persulfato de sódio (40%) foi adicionada a câmara de reação para oxidação da matéria orgânica. O CO_2 resultante da oxidação foi também carregado pelo He até o espectrômetro de massa por meio de uma coluna cromatográfica gasosa onde a proporção de ^{12}C e ^{13}C foi medida. Os dados do espectrômetro de massa foram usados para quantificar o ^{13}COD e ^{13}CID . As amostras foram medidas em conjunto com substâncias de referência (ureia e glicose) para calibração dos resultados (Peterson & Fry, 1987).

Análises dos dados – AL ^{13}C

Os fluxos foram estimados em d^{-1} , a partir de mudanças dos parâmetros entre o dia 0 e 3, e entre o dia 3 e 9. A precisão nas medidas utilizando isótopos foi de $\pm 0,2\%$, para CID $\pm 3 \mu\text{M}$, para o COP $\pm 5 \mu\text{M}$, e para o COD $\pm 10 \mu\text{M}$. Incertezas associadas a β e Fr foram tratadas de similar modo, alterando os possíveis valores descritos para cada parâmetro. Todas as incertezas foram calculadas repetidas vezes assumindo erros em cada parâmetro utilizando o programa Oracle Open Office Calc 3.3. No presente estudo foram utilizados os valores médios calculados para a análise dos dados.

2.3.2.5. Determinação da pressão parcial de CO₂ (pCO₂)

Devido ao metabolismo aquático ser influenciado pela troca atmosfera-água, no presente estudo foi quantificada a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) a fim de verificar a ocorrência de troca com atmosfera-água e a resposta do metabolismo aquático a adição de nutrientes em cada mesocosmos. A pCO₂ foi calculada por um método indireto com o auxílio do programa CO₂sys (Pierrot *et al.*, 2006). Por este método utilizam-se dados de diferentes parâmetros para a determinação da pCO₂. Para o cálculo foram utilizados dados de alcalinidade total, pH, salinidade, temperatura, fósforo, sílica e as concentrações de carbono inorgânico obtidos em cada mesocosmo. Os valores da pCO₂ acima ou abaixo do equilíbrio atmosférico (380 µatm) resultam, respectivamente, na evasão ou na apreensão líquidas desse gás (Duarte & Prairie, 2005).

2.4. Resultados

2.4.1. Oxigênio Dissolvido

2.4.1.1. Incubações em garrafas claras e escuras

As concentrações de OD nas garrafas claras variaram de 0,12 mM a 0,33 mM (Ponto 1), e 0,05 mM a 1,5 mM (Ponto 2) (Figura 2.3). No Ponto 1, a maior concentração média ocorreu no tratamento NP nos três dias avaliados, enquanto no Ponto 2 as maiores concentrações ocorreram no tratamento P. Nas garrafas escuras, as concentrações de OD variaram de 0,02 mM a 0,11 mM no Ponto 1, com as menores concentrações de OD em NP. Em relação ao Ponto 2, as concentrações de OD nas garrafas escuras variaram de 0,05 mM a 1,15 mM (Figura 2.3), com o tratamento P apresentando concentrações de OD com os maiores valores médios. O tratamento N e o controle apresentaram os menores valores médios de OD. Nos dois pontos as concentrações médias de OD não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos.

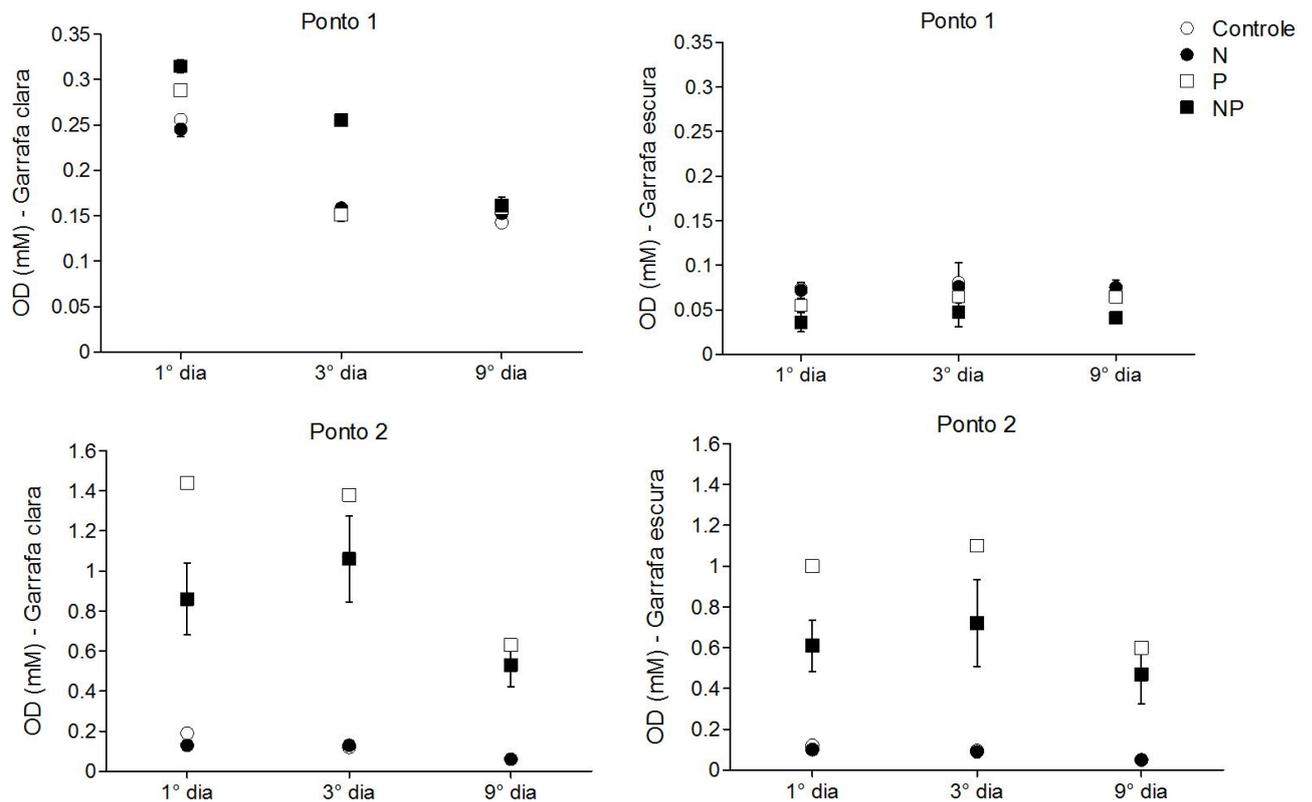


Figura 2.3. Valores médios e desvio padrão de OD (mM) ($n = 6$) no 1º, 3º e 9º dia de experimento nas garrafas clara e escura obtidas através do método de incubação em garrafas nos Pontos 1 e 2.

2.4.1.2. “Água Livre”

As concentrações de OD pelo método da “Água Livre” variaram de 0,12 mM a 0,37 mM no Ponto 1, e de 0,04 mM a 0,17 mM no Ponto 2. O tratamento NP apresentou o maior valor médio das concentrações de OD em ambos os pontos. No Ponto 1, as maiores concentrações de OD ocorreram no 1º e 2º dia de experimento (Figura 2.4). Em relação ao Ponto 2, ocorreu um pico nas concentrações de OD no 3º dia em todos os tratamentos (Figura 2.4). Devido a problemas operacionais não há medições de OD no 1º dia de experimento no Ponto 2.

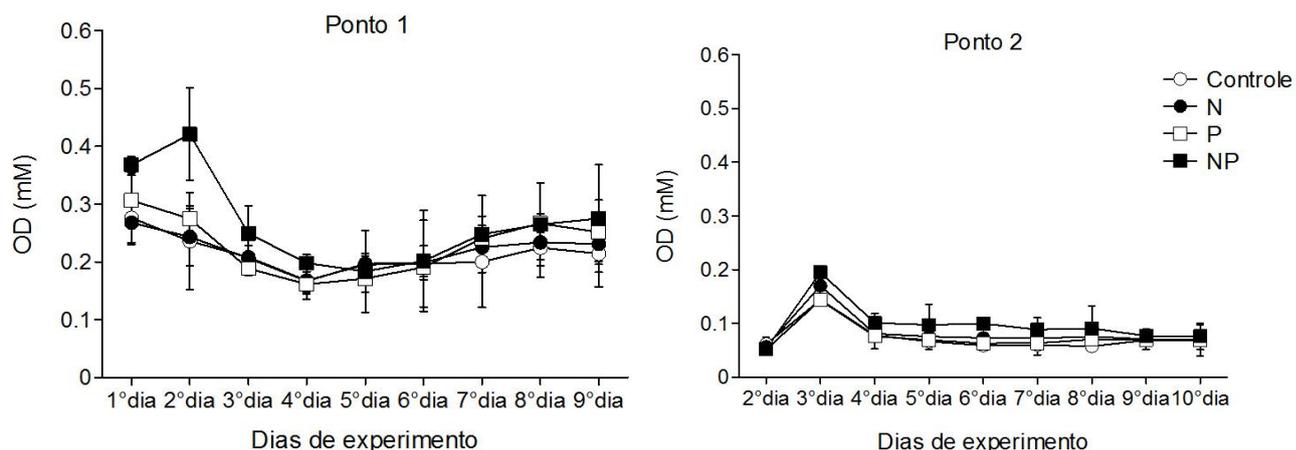


Figura 2.4. Valores médios e desvio padrão de OD (mM) ($n = 3$) obtidos através do método da “Água Livre”.

2.4.2. Carbono inorgânico dissolvido

As concentrações médias de CID variaram entre 3 mM a 3,3 mM, no Ponto 1, e entre 2,4 mM a 2,7 mM, no Ponto 2. Nos dois pontos, o menor valor médio de CID ocorreu no tratamento NP (Figura 2.5).

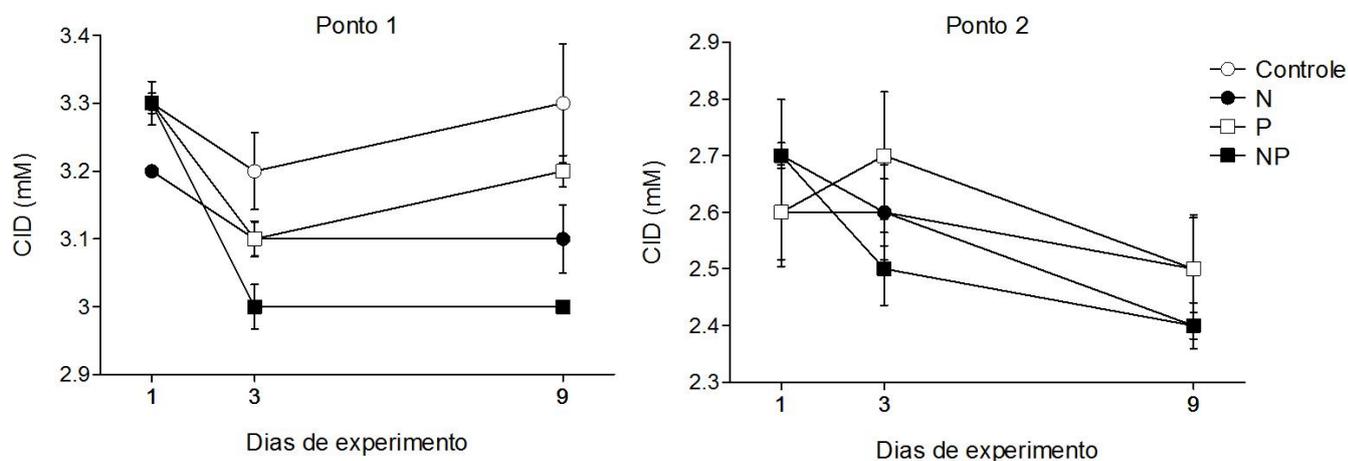


Figura 2.5. Concentrações médias de CID (mM) e desvio padrão ($n = 6$) no 1º, 3º e 9º dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

2.4.3. Carbono orgânico dissolvido

As concentrações médias de COD nos Pontos 1 e 2 não apresentaram diferença estatística, variando de 4,5 a 4,8 mM e 2,9 a 3,9 mM, respectivamente (Figura 2.6). Em ambos os pontos a tendência apresentada foi de diminuição nas

concentrações de COD do 1° ao 9° dia, com exceção do controle no Ponto 1 que manteve a mesma concentração durante o experimento.

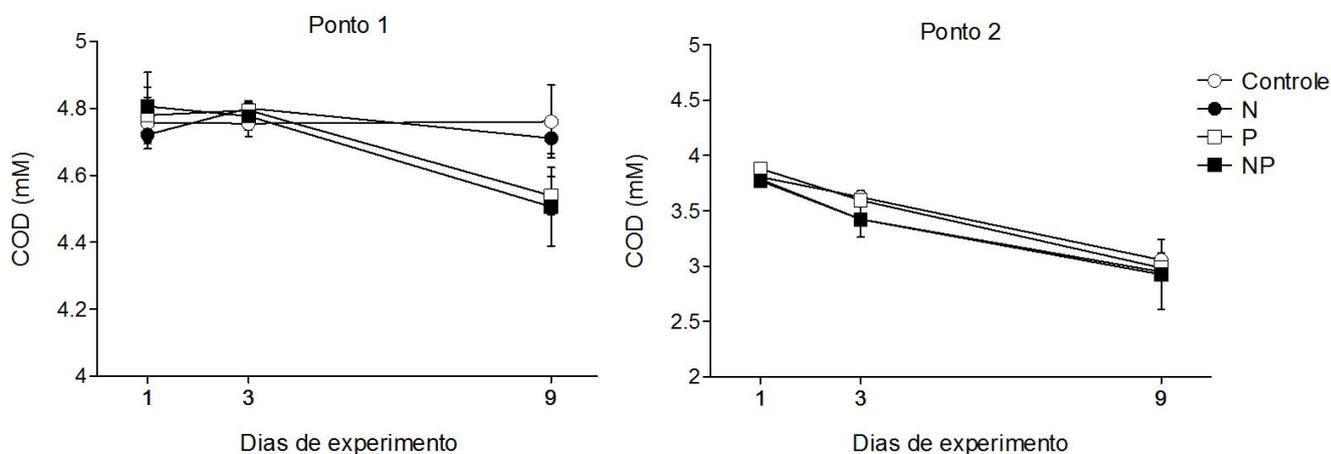


Figura 2.6. Concentrações médias de COD (mM) e desvio padrão (n = 6) no 1°, 3° e 9° dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

2.4.4. Carbono orgânico particulado

Os valores médios de C-particulado variaram de 1,0 a 1,4 mM e de 0,95 a 1,29 mM nos Pontos 1 e 2, respectivamente (Figura 2.7). Em ambos os pontos os tratamentos apresentaram o mesmo padrão de resposta. A tendência apresentada foi de queda nas concentrações de C-particulado ao longo dos dias no controle e tratamentos N e P, excetuando-se o tratamento N no Ponto 1 (com aumento do 3° para o 9° dia). O tratamento NP apresentou aumento nas concentrações de C-particulado no 3° dia de experimento. No Ponto 1 as concentrações médias de C-particulado apresentaram moderada e forte correlação com as concentrações de clorofila-a do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia, respectivamente ($r = 0,77$ e $0,8$, Spearman).

No Ponto 2 as concentrações médias de C-particulado no 1° dia diferiram estatisticamente das concentrações médias do 9° dia ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, Dunn). Neste ponto ocorreu forte correlação das concentrações de C-particulado com as concentrações de clorofila-a do 3° ao 9° dia ($r = 1$, $p < 0,0001$, Spearman).

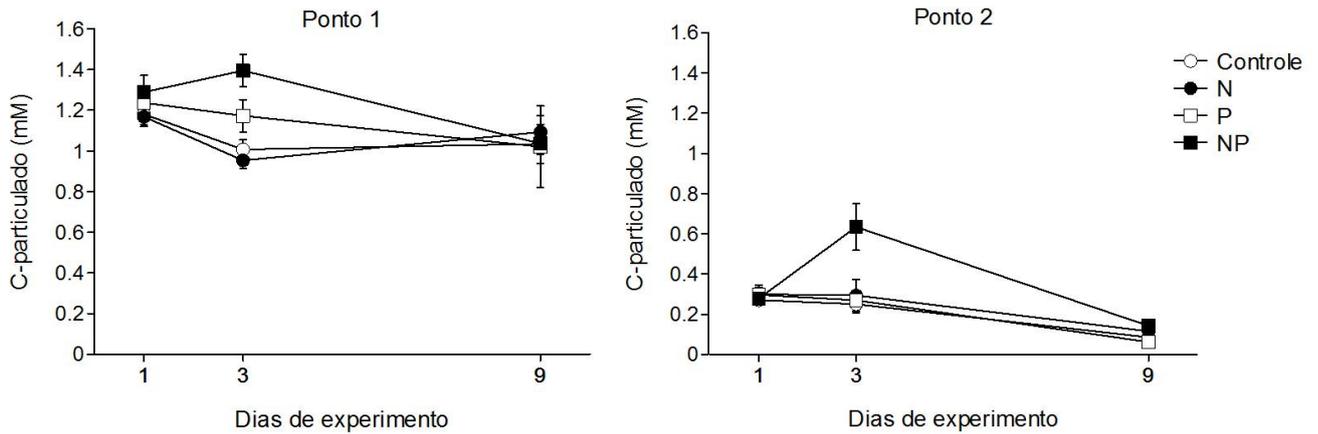


Figura 2.7. Concentrações médias de COP (mM) e desvio padrão (n = 6) no 1º, 3º e 9º dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

2.4.5. Composição isotópica (^{13}CID , ^{13}COD e ^{13}COP)

As composições isotópicas do CID e COD mudaram em cada tratamento nos mesocosmos como resultado da adição de carbono inorgânico, enriquecido em ^{13}C . Os valores de ^{13}CID diminuíram ao longo dos dois experimentos, com diferença estatística entre os três dias avaliados em ambos os pontos ($p < 0,01$, ANOVA, Tukey) (Figura 2.8), enquanto os valores de ^{13}COD apresentaram um padrão inverso ao ^{13}CID em todos os tratamentos (Figura 2.8). Em ambos os pontos os valores de ^{13}COD do 1º dia diferiram estatisticamente dos valores obtidos no 9º dia ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, Dunn).

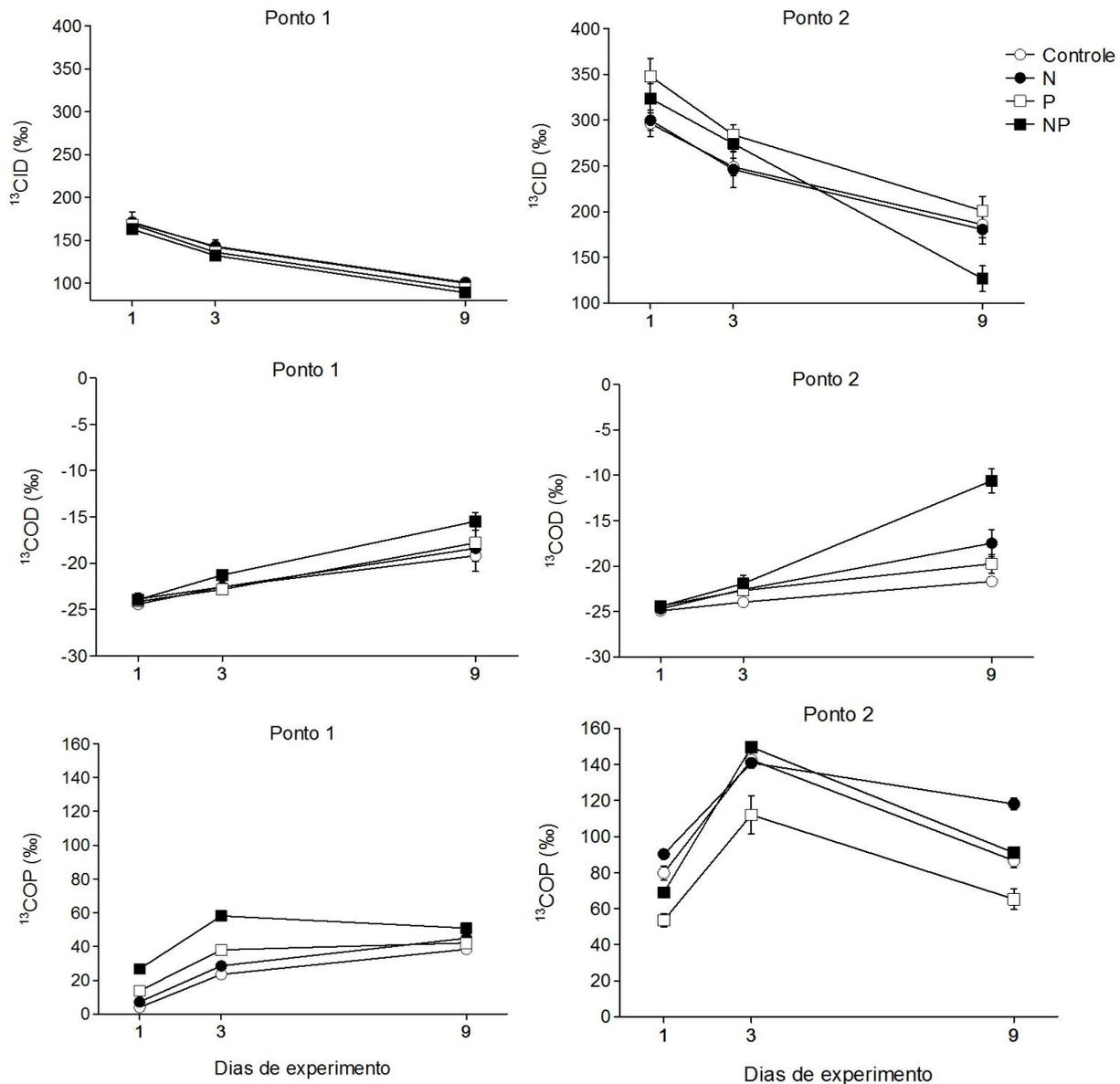


Figura 2.8. Composição isotópica do CID, (^{13}CID), COD (^{13}COD) e COP (^{13}COP) nos dias avaliados, nos Pontos 1 e 2 ($n = 6$).

O enriquecimento com ^{13}C resultou em mudanças também no ^{13}COP . Nos Pontos 1 e 2 os valores de ^{13}COP aumentaram em todos os tratamentos do 1º para o 3º dia, o que demonstra que o fitoplâncton tornou-se mais enriquecido após a adição de ^{13}C , pois o ^{13}C foi rapidamente fixado por esses organismos (Figura 2.8). No Ponto 1 apenas o tratamento NP apresentou decréscimo no valor de ^{13}COP no 9º dia, enquanto no Ponto 2 todos os tratamentos apresentaram diminuição nos valores do 3º para o 9º dia de experimento (Figura 2.8). No Ponto 1 os valores de ^{13}COP do 1º dia apresentaram diferença estatística para os valores obtidos entre o 3º e 9º dia ($p < 0,05$,

ANOVA, Tukey). No Ponto 2 os valores de ^{13}COP do 2º dia diferiram estatisticamente dos valores obtidos nos demais dias ($p < 0,05$, ANOVA, Tukey).

2.4.6. Fotossíntese

A fotossíntese foi em média aproximadamente 73% maior no método AL^{13}C do que no método de incubação em garrafas no Ponto 1 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, Dunn) (Figura 2.9), com forte correlação entre os métodos do 3º ao 9º dia ($r = 1$, $p < 0,0001$, correlação de Spearman). No Ponto 2 o método AL^{13}C apresentou taxas 95% maiores do que no método de incubação em garrafas, com exceção dos tratamentos P e NP no 3º dia (superiores 48 e 45%, respectivamente). Os resultados obtidos pelos métodos apresentaram diferença estatística ($p < 0,01$, ANOVA, Tukey).

No Ponto 1 no método de incubação em garrafas, destaca-se uma queda dos valores de fotossíntese de 0,21 para 0,12 mM d^{-1} no tratamento NP do 3º para o 9º dia. Com relação ao método AL^{13}C , todos os tratamentos apresentaram uma tendência de queda nas taxas de fotossíntese do 3º para o 9º dia de experimento, com as maiores taxas no tratamento NP (Figura 2.9). No Ponto 1 as concentrações de COD apresentaram moderada correlação negativa ($r = 0,6$, Spearman) com a fotossíntese pelo método de incubação em garrafas no 9º dia e forte correlação positiva com os resultados obtidos pelo método AL^{13}C no 3º e 9º ($r = 0,89$ e $0,76$, Spearman).

No Ponto 2 em ambos os métodos ocorreram diminuições dos valores de fotossíntese do 3º para o 9º dia de experimento em todos os tratamentos (Figura 2.9). No método de incubação em garrafas, as taxas nos tratamentos P e NP apresentaram as maiores quedas, em torno de 87%.

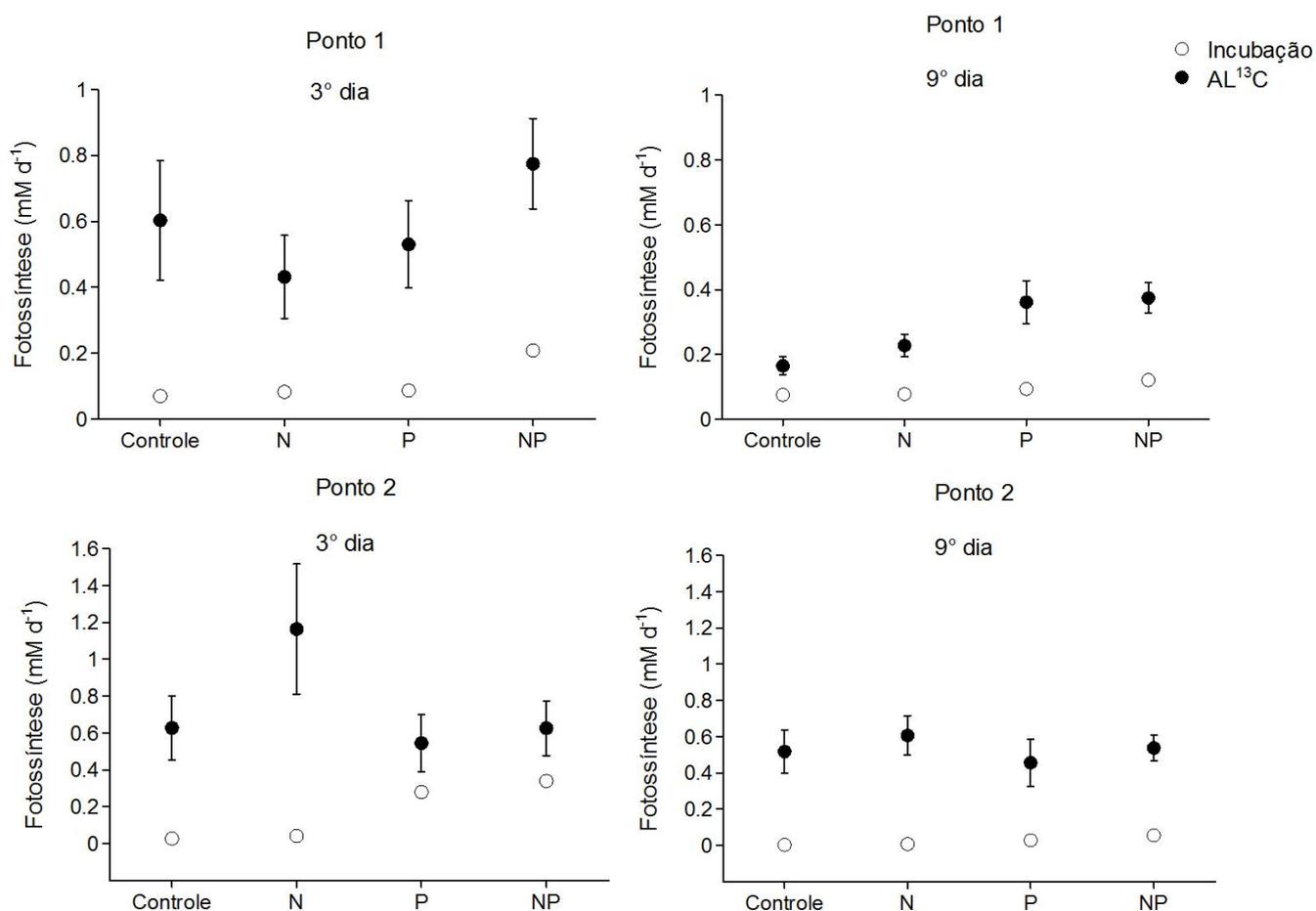


Figura 2.9. Valores médios e desvio padrão da fotossíntese ($n = 3$) pelos métodos de incubação em garrafas e $AL^{13}C$, em cada tratamento, compreendendo o período do 1º ao 3º dia e do 3º ao 9º dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

2.4.7. Respiração

O método $AL^{13}C$ apresentou valor médio de respiração aproximadamente 79% e 100% maior do que os valores obtidos pelo método de incubação em garrafas nos Pontos 1 e 2, respectivamente ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, Dunn). Os métodos apresentaram forte correlação no Ponto 1 ($r = 0,76$, Spearman) e a partir dos resultados obtidos no 3º dia e no 9º dia ($r = 0,8$, Spearman) (Figura 2.10).

No Ponto 1 o tratamento NP apresentou as maiores taxas no 3º dia, com média de 0,12 e 0,7 mM nos métodos de incubação em garrafas e $AL^{13}C$, respectivamente. Para ambos os métodos todos os tratamentos apresentaram queda nos valores de respiração do 3º para o 9º dia. As concentrações de COD correlacionaram-se positivamente com a respiração pelo método $AL^{13}C$ ($r = 0,76$, Spearman).

No Ponto 2, pelo método $AL^{13}C$, o controle e os tratamentos N e P apresentaram diminuição das taxas de respiração, ocorrendo o inverso com o tratamento NP do 3º para o 9º dia (Figura 2.10). Em relação ao método de incubação em garrafas, as taxas foram negativas em todos os tratamentos, com exceção do controle e tratamento N no 9º dia. Provavelmente, esses valores negativos estão associados a problemas com o oxímetro durante as medições.

As taxas de respiração apresentaram forte correlação com a biomassa na forma de clorofila-a pelo método incubação em garrafas ($r = 0,8$, $p < 0,01$, Spearman) e pelo método $AL^{13}C$ no Ponto 1 no 3º dia ($r = 0,9$, Spearman). No Ponto 2 a respiração apresentou forte correlação com a biomassa no 9º dia pelo método $AL^{13}C$ ($r = 0,8$, Spearman).

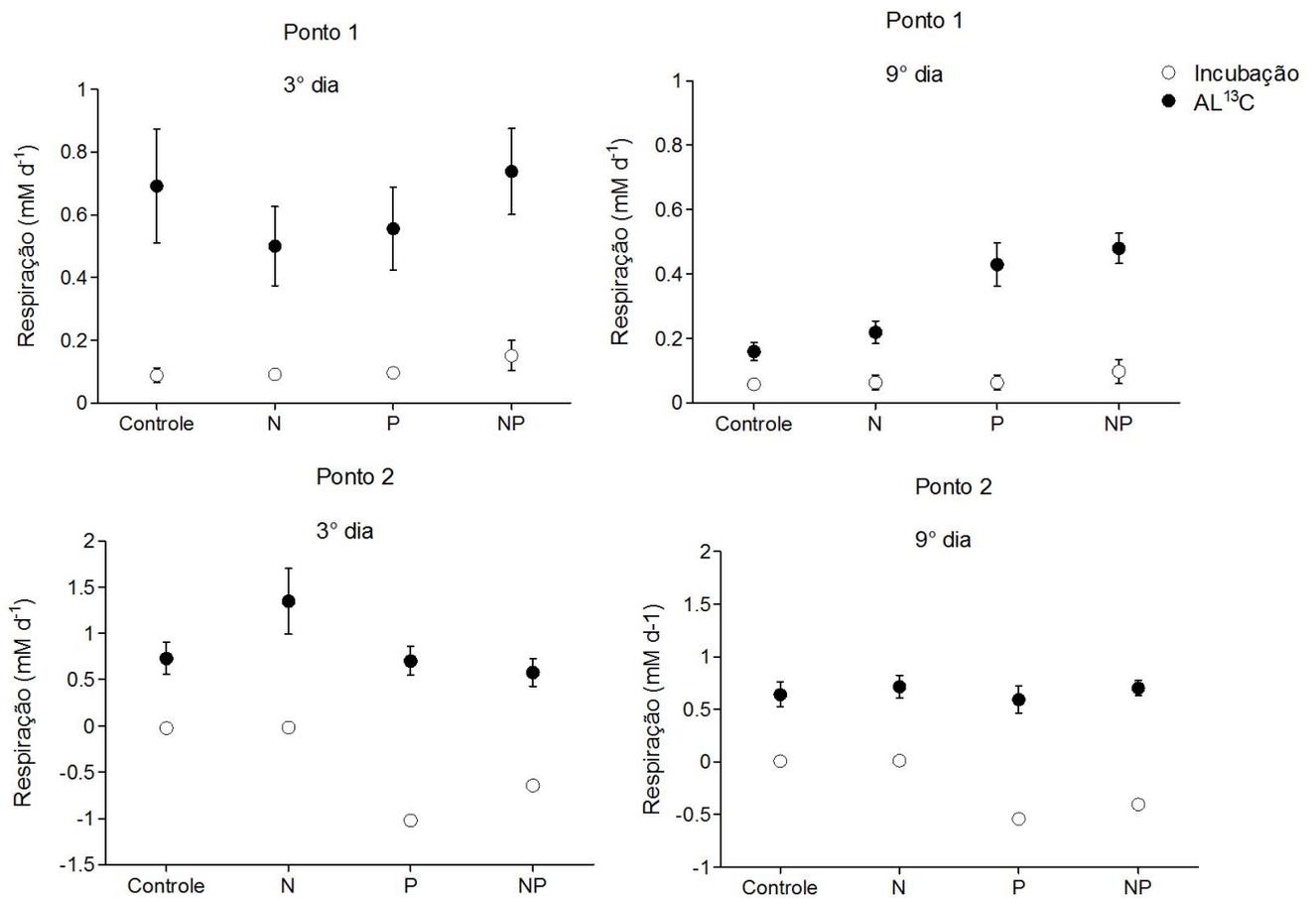


Figura 2.10. Valores médios e desvio padrão da respiração ($n = 3$) pelos métodos de incubação em garrafas e $AL^{13}C$, em cada tratamento, no 3º e 9º dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

2.4.8. Transferências

2.4.8.1. COD para COP

No Ponto 1, com exceção do controle, as maiores transferências de COD para COP ocorreram do 3° ao 9° dia, com o tratamento NP apresentando os maiores valores nos dois períodos. No Ponto 2 as maiores transferências ocorreram até o 3° dia em todos os tratamentos com exceção do controle. O tratamento N apresentou o maior valor de transferência até o 3° dia, e o tratamento NP o maior valor do 3° ao 9° dia (Figura 2.11).

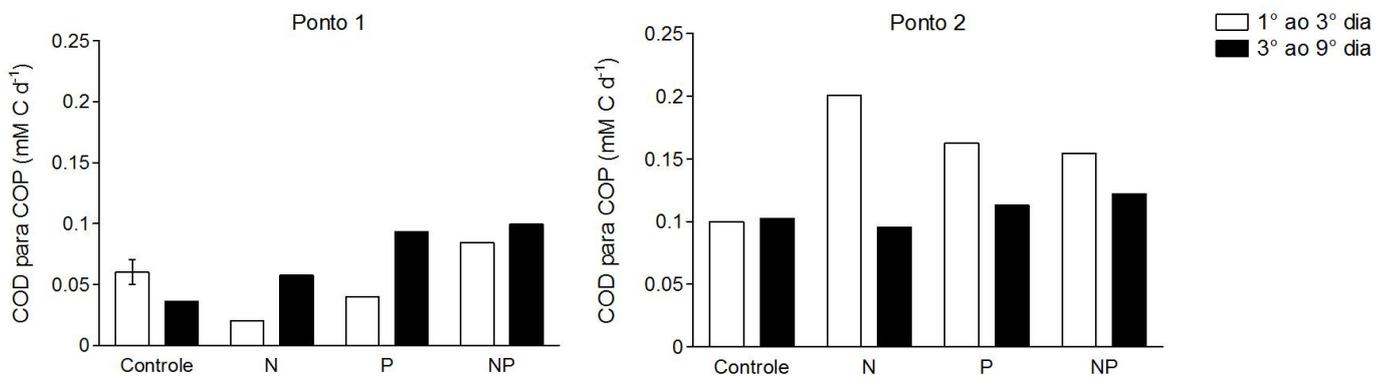


Figura 2.11. Valores médios e desvio padrão da transferência COD para COP do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia de experimento para cada tratamento nos Pontos 1 e 2.

2.4.8.2. COP para COD

Os valores médios de transferência COP para COD no Ponto 1 variaram de 0,04 a 0,14 mM C d^{-1} , com o tratamento NP apresentando os maiores valores médios. No Ponto 2 os valores de transferência variaram de 0,01 a 0,04 mM d^{-1} . O tratamento NP apresentou os maiores valores de transferência do 3° ao 9° dia (Figura 2.12). As transferências COP para COD foram menores do que a transferência COD para COP no Ponto 2 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis, Dunn).

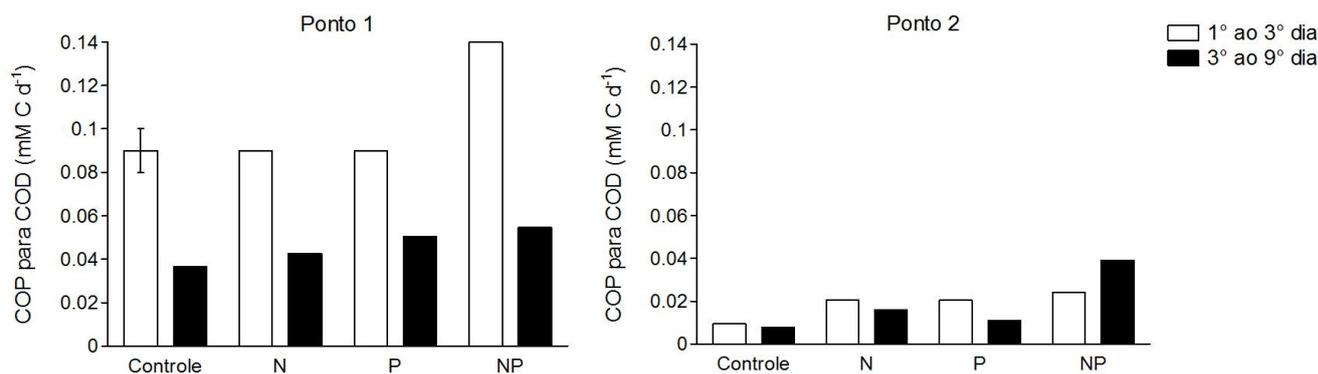


Figura 2.12. Valores médios e desvio padrão da transferência COP para COD do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia de experimento para cada tratamento nos Pontos 1 e 2.

2.4.8.3. Água-exterior e exterior-água

As estimativas de transferência água-exterior dos mesocosmos foram estimativas mínimas porque assumem que não houve participação do perifíton na absorção de carbono. Ainda assim, os valores foram elevados, próximos ou maiores que aqueles obtidos para os demais fluxos de carbono.

Quando as taxas de respiração foram superiores a fotossíntese a transferência água-ar predominou nos mesocosmos. O inverso também foi observado, quando a fotossíntese foi maior do que a respiração, a transferência ar-água que ocorreu nos mesocosmos.

No Ponto 1 a transferência exterior-água, com exceção do controle, e a transferência água-exterior foram maiores até o 3° dia, com o tratamento P (exterior-água) e N (água-exterior) apresentando as maiores taxas. No Ponto 2 os valores de transferência exterior-água foram inferiores as do Ponto 1, com exceção do tratamento NP do 3° ao 9° dia. Neste ponto, a transferência exterior-água e água-exterior foram maiores até o 3° dia de experimento no controle e tratamento N, enquanto nos tratamentos P e NP as taxas foram maiores do 3° ao 9° dia (Figura 2.13). A transferência exterior-água apresentou valores inferiores aos da transferência água-exterior ao longo do experimento ($p < 0,01$, ANOVA, Tukey) (Figura 2.13).

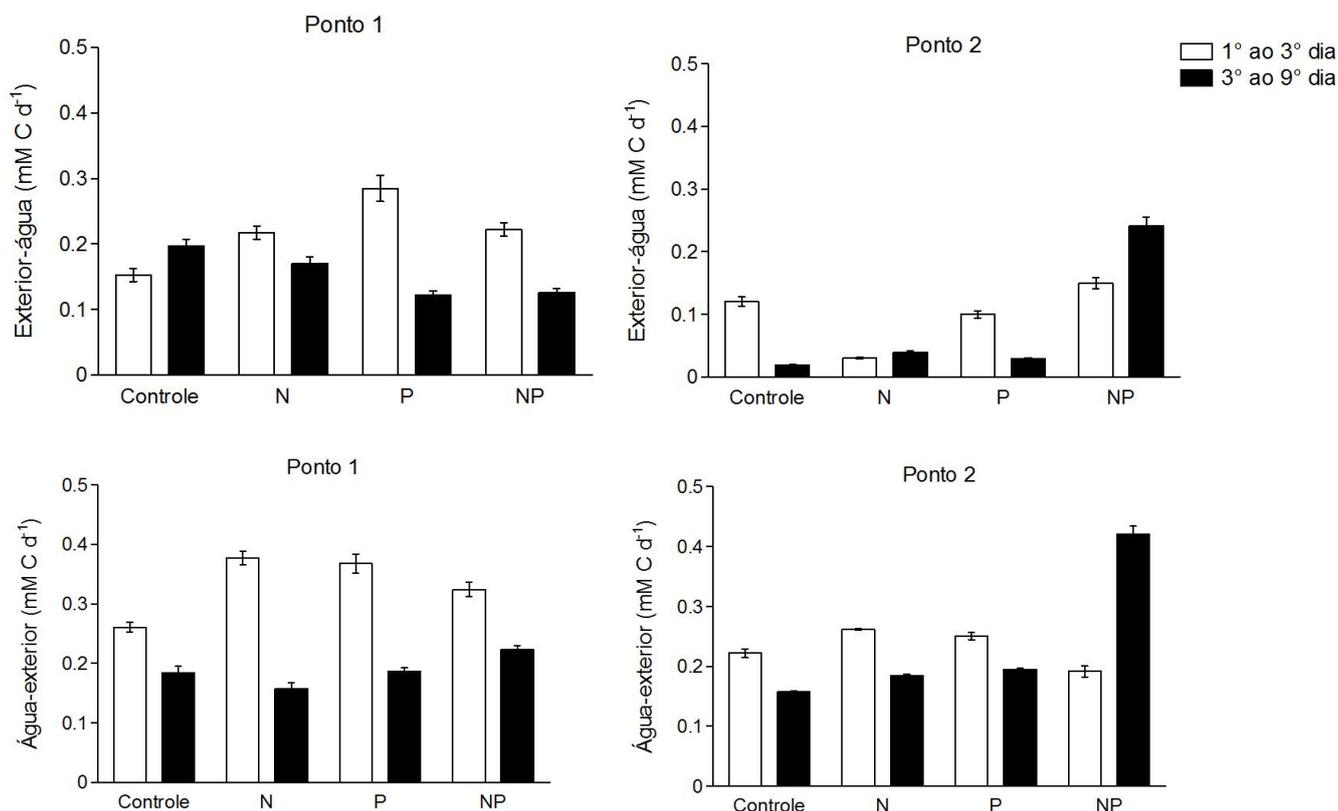


Figura 2.13. Valores médios e desvio padrão da transferência água-exterior e exterior-água do 1° ao 3° dia, e do 3° ao 9° dia para cada tratamento nos Pontos 1 e 2.

Os resultados da $p\text{CO}_2$ obtidos a partir do programa CO_2sys (Pierrot *et al.*, 2006) nos dois pontos amostrais apresentaram valores de $p\text{CO}_2$ inferiores ao valor de equilíbrio atmosférico (Figura 2.14), o que sugere um fluxo atmosfera-água em todos os tratamentos e dias avaliados. Esses resultados divergem do padrão encontrado pelo método AL^{13}C , que com exceção dos tratamentos controle e N (do 3° ao 9° dia) no Ponto 1, apresentaram maior fluxo água-exterior em todos os dias e tratamentos. A diferença observada entre os dois métodos provavelmente se deve ao uso de carbono pela comunidade periférica, não avaliada pelo método AL^{13}C .

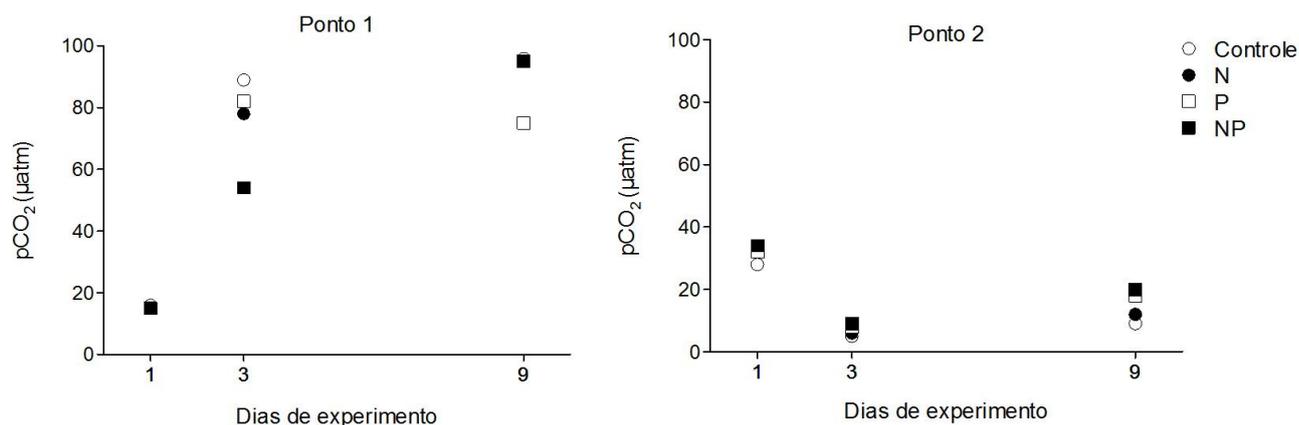


Figura 2.14. Valores da $p\text{CO}_2$ obtidos através do programa CO_2sys para cada condição experimental no 1º, 3º e 9º dia. Os valores foram inferiores aos valores de equilíbrio atmosférico ($380 \mu\text{atm}$) o que representa fluxo atmosfera-água em todos os mesocosmos e tratamentos.

2.4.9. Produção Primária Líquida e Balanço Metabólico

Os valores obtidos de PPL pelo método da “Água Livre” apresentaram diferença estatística dos métodos de incubação em garrafas e do método AL^{13}C ($p < 0,01$, ANOVA, Tukey). O maior valor de PPL pelo método da “Água Livre” ocorreu no tratamento NP nos dois pontos amostrais ($0,025$ e $0,024 \text{ mM d}^{-1}$ nos Pontos 1 e 2, respectivamente). No Ponto 1 os valores de PPL não apresentaram grandes modificações entre o 3º e 9º dia, com exceção do tratamento NP com queda de $0,25 \text{ mM d}^{-1}$ para $0,15 \text{ mM d}^{-1}$. No Ponto 2 a PPL apresentou queda dos valores em todos os tratamentos do 3º ao 9º dia, o que também foi observado em relação aos resultados obtidos pelo método de incubação em garrafas (variando de $1,3 \text{ mM d}^{-1}$ a zero) (Figura 2.15).

Em ambos os pontos o tratamento NP apresentou a maior PPL até o 3º dia pelo método AL^{13}C ($0,16$ e $0,22 \text{ mM d}^{-1}$, Pontos 1 e 2, respectivamente). No Ponto 1 no 9º dia, o tratamento N ($0,12 \text{ mM d}^{-1}$) e o controle ($0,03 \text{ mM d}^{-1}$) apresentaram os maiores valores de PPL, enquanto o tratamento NP o menor valor ($-0,4 \text{ mM d}^{-1}$). Em relação ao Ponto 2, a PPL foi negativa em todos os dias, com exceção do tratamento NP no 3º dia (Figura 2.15).

No método de incubação em garrafas, no Ponto 1, a PPL apresentou maior valor no tratamento NP até o 3º dia ($0,06 \text{ mM d}^{-1}$), enquanto no 9º dia o tratamento P apresentou a maior PPL ($0,03 \text{ mM d}^{-1}$). No Ponto 2 a maior PPL esteve associada ao

tratamento P no 3º dia ($1,3 \text{ mM d}^{-1}$). No 9º dia de experimento a PPL foi negativa no controle e tratamento N (Figura 2.15). Um resumo com o balanço metabólico obtido nos três métodos pode ser observado na Figura 2.16.

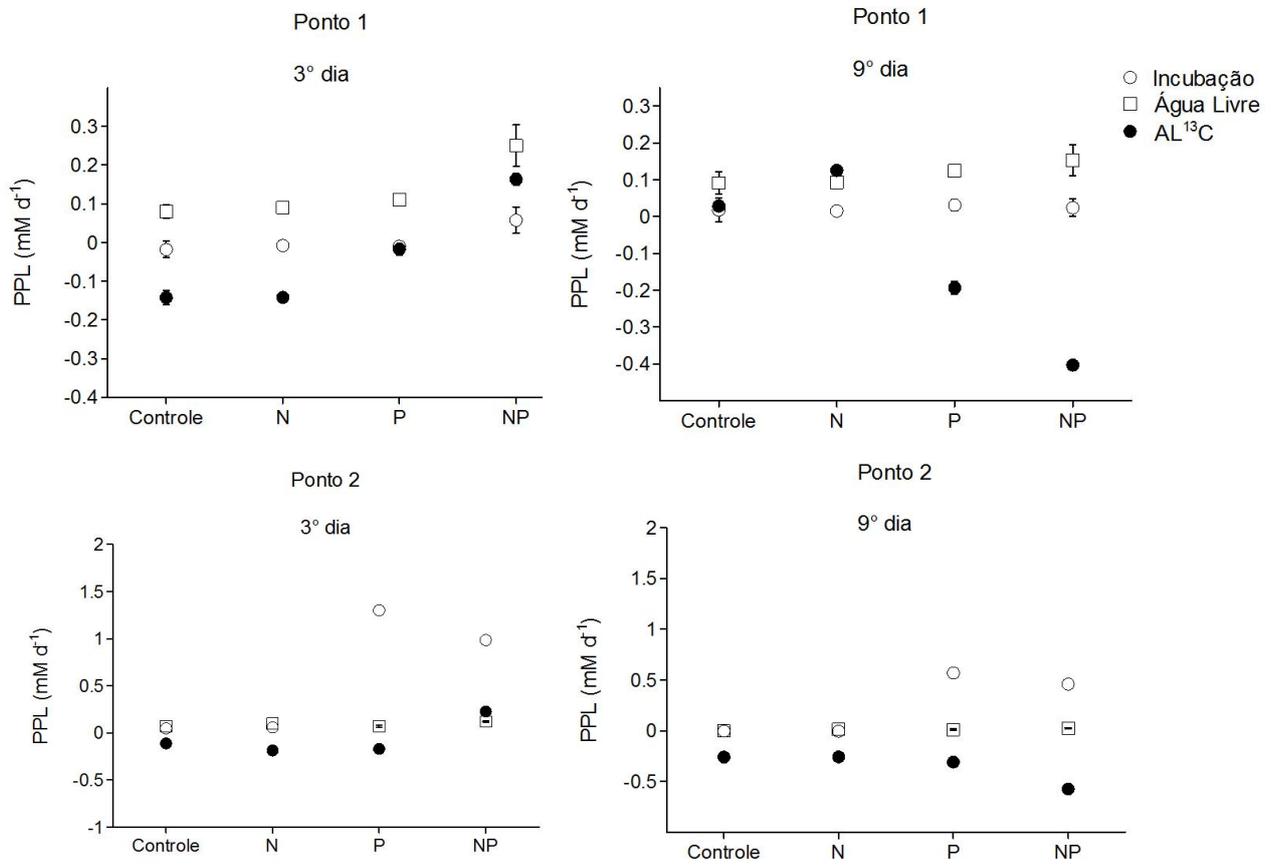


Figura 2.15. Valores médios e desvio padrão da PPL pelos métodos de incubação em garrafas, “Água Livre” e AL¹³C, em cada tratamento, compreendendo o 3º e 9º dia de experimento nos Pontos 1 e 2.

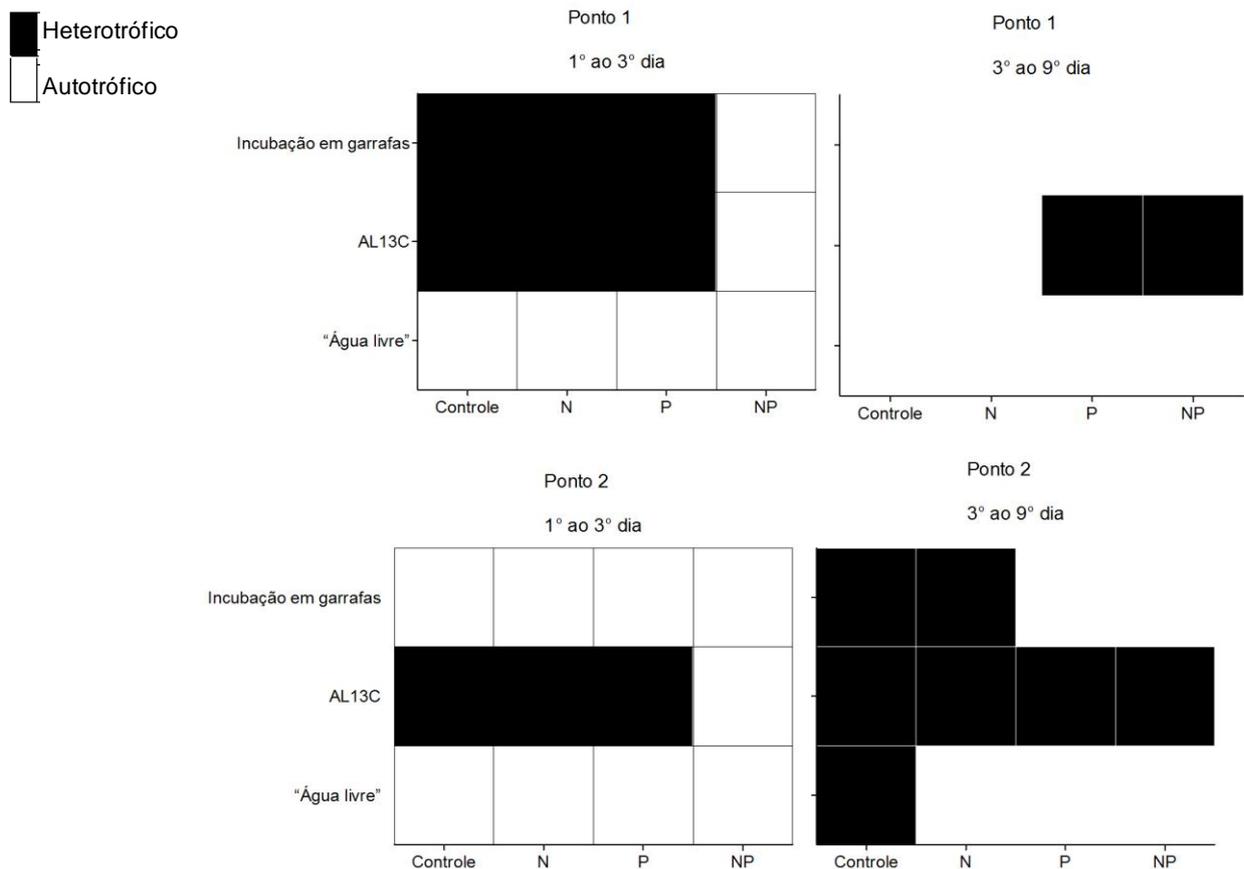


Figura 2.16. Balanço metabólico do 1° ao 3° dia e do 3° ao 9° dia em cada tratamento pelos três métodos utilizados nos Pontos 1 e 2.

2.5. Discussão

2.5.1. Alterações físico-químicas

Este estudo demonstrou modificações na composição e biomassa da comunidade fitoplanctônica, bem como alterações no metabolismo aquático após a adição de nutrientes. As maiores atividades metabólicas estiveram associadas ao tratamento com adição combinada dos nutrientes, tratamento NP (Figuras 2.9, 2.10, 2.15 e 2.16), de modo que o efeito sinérgico da atuação em conjunto dos nutrientes N e P pôde ser observado.

Nos ecossistemas aquáticos os valores de pH e OD são influenciados por processos de fotossíntese e respiração/mineralização. O elevado pH pode ser indicativo da ocorrência de elevada biomassa algal, incrementando as taxas fotossintéticas e conseqüentemente o consumo de CO₂. Os maiores valores de pH (Figura 1.5) e as menores concentrações de CID nos dois pontos amostrais ocorreram no tratamento NP (Figura 2.5), tratamento este que apresentou maior valor médio de

biomassa fitoplanctônica na forma de clorofila-a (Figura 1.9). Com relação às concentrações de OD, a elevada concentração sugere que o ambiente apresenta elevada atividade fotossintética, enquanto a baixa concentração de OD se deve provavelmente à predominância de processos de respiração/mineralização. O tratamento NP também apresentou as maiores concentrações de OD, com exceção dos resultados obtidos pelo método de incubação em garrafas no Ponto 2, o que pode ter ocorrido possivelmente devido a problemas com o oxímetro nos primeiros dias de experimento.

No Ponto 1, pelo método da “Água Livre”, que avalia o metabolismo aquático por meio das variações nas concentrações de OD, observou-se que embora o tratamento NP tenha apresentado as maiores concentrações de OD, em todos os tratamentos os valores foram próximos a saturação de oxigênio, sugerindo a ocorrência de elevada atividade metabólica (Figura 1.5). No entanto, esse padrão não foi observado no Ponto 2. A baixa concentração de OD (valor médio entre 2,3 e 2,9 mM) (Figura 1.5) pode estar relacionada às características físico-químicas da água nesse ponto. A densa vegetação de restinga as margens da lagoa exporta grande quantidade de matéria orgânica para dentro do ambiente aquático, que apresenta além de altas concentrações de COD e de substâncias húmicas (importante fonte para o metabolismo bacteriano), baixa transparência (Suhett *et al.*, 2006). Essas características podem aumentar os processos de respiração e decomposição, deplecionando as concentrações de OD da coluna d’água (Marotta, 2006). De fato, foram observados nesse ponto os maiores valores de respiração em todos os tratamentos pelo método AL¹³C do que no Ponto 1 (Figura 2.10). Soma-se a isso o fato de que em ambientes húmicos, como no Ponto 2, há a tendência que ocorra aumento da produção e respiração bacteriana, principalmente devido a processos de fotodegradação do COD, produzindo CO₂ (Suhett *et al.*, 2006; Farjalla *et al.*, 2009).

2.5.2. Adição de nutrientes X balanço metabólico

O metabolismo aquático é regulado por diferentes fatores como luz, temperatura, vento, interações biológicas e nutrientes. O incremento de nutrientes tende a estimular tanto a produção primária (PP) quanto à respiração. Contudo, o metabolismo autotrófico ($P > R$) tende a predominar em relação ao metabolismo

heterotrófico ($P < R$) em ambientes ricos em nutrientes estimulando mais a PP do que a R (Cole *et al.*, 2000; Marotta, 2006; Staehr *et al.*, 2010).

No presente estudo as respostas referentes ao balanço metabólico entre os três métodos foram diferentes. Entretanto, um padrão pôde ser observado. Em ambos os pontos, o tratamento com a adição combinada dos nutrientes, NP, até o 3° dia de experimento apresentou metabolismo autotrófico pelos três métodos utilizados. Este padrão encontrado reforça a ação de sinergismo da adição combinada dos nutrientes e da maior atividade metabólica nesse tratamento.

A ocorrência de metabolismo heterotrófico do 3° ao 9° dia no tratamento NP obtido através do método $AL^{13}C$ pode ter ocorrido devido a diferentes fatores. As maiores concentrações médias de clorofila-*a* ocorreram até o 3° dia de experimento, com exceção no Ponto 2 do tratamento NP, que no 4° dia apresentou um pico de biomassa. Nesse período, as atividades metabólicas foram mais elevadas (Figuras 2.9, 2.10 e 2.15), estimulando a ocorrência do metabolismo autotrófico, principalmente no tratamento com adição combinada dos nutrientes. A diminuição das concentrações de clorofila-*a*, no número de indivíduos e também nas concentrações dos nutrientes (Figuras 1.9, 1.10, 1.6 e 1.7) ocasionou diminuição nas taxas de fotossíntese do 3° para o 9° dia em ambos os pontos e em todos os tratamentos (Figura 2.9), o que pode ter favorecido a ocorrência do metabolismo heterotrófico.

Em relação aos demais tratamentos, levando em consideração o período de maior atividade da comunidade (do 1° ao 3° dia), a ocorrência de metabolismo heterotrófico pode ser devido a colimitação nutricional nos tratamentos com adição individualizada dos nutrientes, N ou P. A adição de nutrientes nesses tratamentos não foi capaz de estimular a ocorrência do metabolismo autotrófico, principalmente no Ponto 2. Ainda há a possibilidade de que a comunidade zooplanctônica possa ter dominado nos mesocosmos, uma vez que essa comunidade não foi removida da água utilizada nos experimentos. Em ambientes dominados pelo zooplâncton há impedimento de aumento da biomassa algal, refletindo consequentemente na menor produção da comunidade e favorecendo o metabolismo heterotrófico (Cole *et al.*, 2000).

2.5.3. Herbivoria

Como mencionado anteriormente, um fator que pode controlar a biomassa e composição da comunidade fitoplanctônica e que apresenta grande influência na disponibilidade de nutrientes é a herbivoria ou predação. A capacidade de evitar a herbivoria resulta em mudanças na comunidade fitoplanctônica, na morfologia das algas e na estrutura do sistema (Pacheco *et al.*, 2010). O confinamento da água, além de ter alterado as características físico-químicas (discutidos anteriormente na seção 1, item 1.6.1), pode ter proporcionado aumento da herbivoria (não quantificada no presente estudo). Estudos realizados em mesocosmos indicam que a herbivoria pela comunidade zooplanctônica pode reduzir a biomassa fitoplanctônica (Cole *et al.*, 2000; Sommer *et al.*, 2001), bem como o controle da comunidade predadora pode permitir aumento na biomassa da comunidade fitoplanctônica (Mette *et al.*, 2011).

A herbivoria pode ter contribuído para a diminuição das concentrações de clorofila-*a* e do número de indivíduos dos organismos fitoplanctônicos no presente estudo. Além de impedir a “fuga” dos produtores primários devido ao confinamento da água nos mesocosmos, a não utilização de peixes planctívoros no presente estudo, que são predadores do zooplâncton, pode ter aumentado as taxas de herbivoria sobre os organismos fitoplanctônicos (Cole *et al.*, 2000). No estudo de Mette *et al.* (2011), sob condições de elevada disponibilidade de nutrientes e presença de peixes, a biomassa fitoplanctônica se elevou devido à diminuição da herbivoria. Esta diminuição seria resultado da presença dos peixes, consumindo os organismos zooplanctônicos, resultando em águas mais turbidas. Hu *et al.*, (2013) encontraram semelhante resultado quando removido o zooplâncton, com imediata resposta do crescimento fitoplanctônico a adição de nutrientes.

Em estudos que abordam a comunidade fitoplanctônica e os fatores reguladores dessa comunidade, não apenas a atuação dos fatores físico-químicos deve ser considerada, mas também as interações biológicas como herbivoria e competição.

2.5.4. Produção e consumo de COD

As concentrações médias de COD nos dois pontos experimentais foram elevadas (entre 2,9 a 4,8 mM). Geralmente, os ecossistemas aquáticos apresentam concentrações de COD variando entre 0,2 a 2 mM C. Alguns ecossistemas podem apresentar concentrações extremas, de 14 mM C, como algumas lagoas de águas

ricas em substâncias húmicas (Bertilsson & Tranvik, 2000; Amado *et al.*, 2003). Os processos de produção de COD podem estar associados à excreção e perda devido à lise celular das comunidades planctônicas, enquanto o consumo pode ocorrer devido à mineralização por microrganismos, fotodegradação e incorporação na biomassa dos organismos (Bertilsson & Jones, 2003; Farjalla *et al.*, 2009). Em muitos casos, as concentrações de COD estão integradas a processos de fotossíntese e respiração, o que foi observado no presente estudo. Em ambos os pontos, os processos metabólicos estiveram associados à produção e consumo de COD quando comparados os resultados de fotossíntese e respiração obtidos pelo método de incubação em garrafas e pelo método AL¹³C.

O maior consumo de COD observado do 3° ao 9° dia no Ponto 1, e do 1° ao 3° dia no Ponto 2 podem estar associados a diminuição da atividade fitoplanctônica observada no estudo. Esses organismos são parcialmente responsáveis pela produção e excreção de COD em suas atividades, incrementando os processos de uso ou degradação de COD pelo bacterioplâncton. O mesmo observa-se no tratamento NP que apresentou além de maior biomassa fitoplanctônica maior consumo de COD.

Com relação às maiores taxas de produção de COD que ocorreram do 1° ao 3° dia no tratamento NP em ambos os pontos e também no tratamento N no Ponto 2, podem estar relacionadas a maior biomassa e número de indivíduos nesse período e tratamentos. A maior atividade metabólica nesses tratamentos e dias podem ter incrementado os processos de produção e excreção de COD devido a maior atividade fitoplanctônica.

2.5.5. Razão produção de COD:consumo de CID e razão consumo de COD:entrada de CID

No Ponto 1 a maior razão produção de COD:consumo de CID ocorreu no tratamento NP (até o 3° dia) e nos tratamentos N e P (do 3° ao 9° dia). No Ponto 2 o tratamento N apresentou a maior razão produção de COD:consumo de CID (Figura 2.17). A alta produção de COD nesses tratamentos pode estar associada à predominância de processos de lise celular e excreção pelo zooplâncton em relação a processos de fotossíntese principalmente devido à diminuição da atividade metabólica ao longo dos dias dos experimentos (Bade *et al.*, 2007).

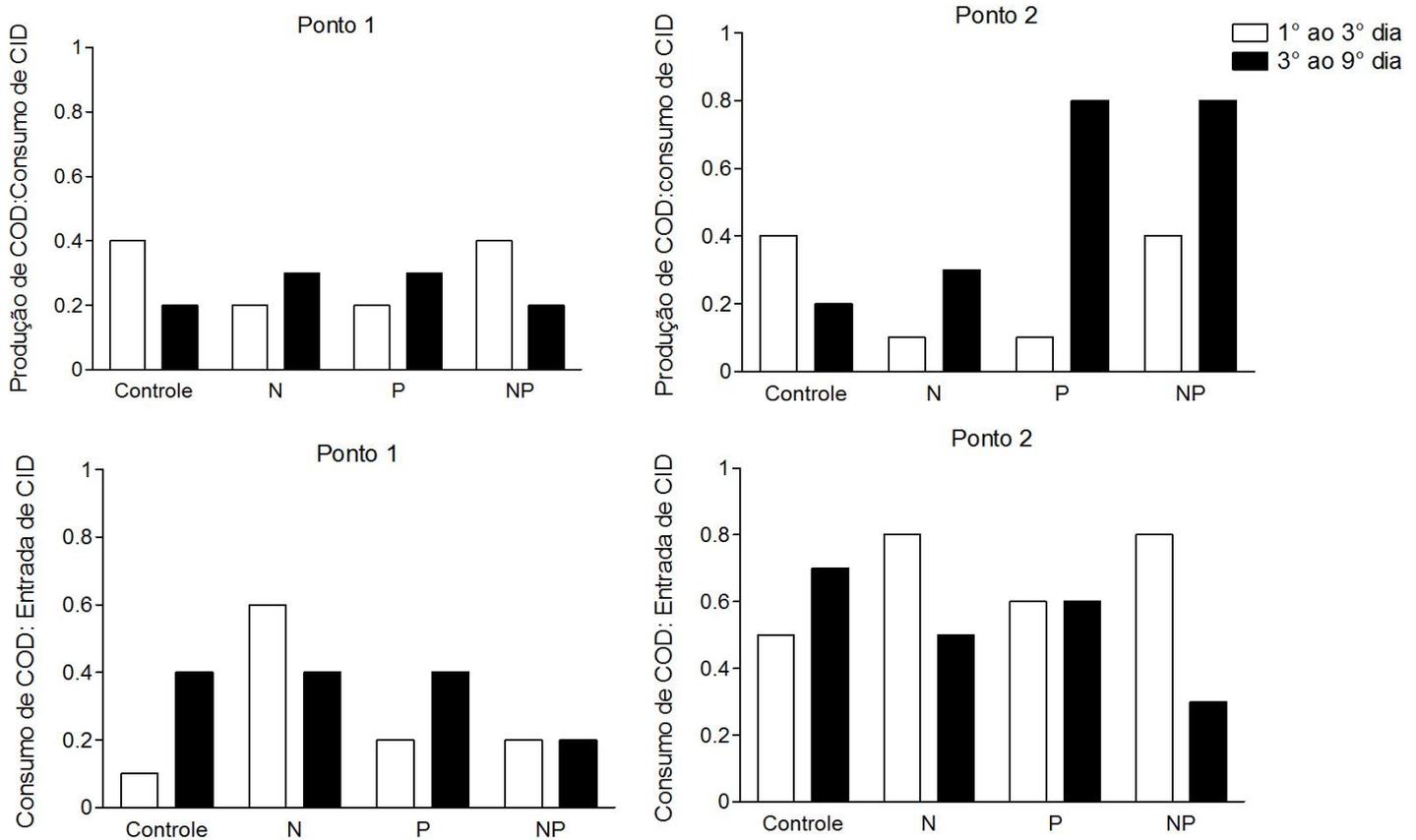


Figura 2.17. Valores obtidos a partir da razão produção COD: consumo de CID, e razão consumo de COD: entrada de CID nos dois pontos experimentais em cada tratamento entre o 1° e 3° dia e entre o 3° e 9° dia.

Com relação à razão consumo de COD: entrada de CID, no Ponto 1, os maiores valores ocorreram entre o 3° e 9° dia, com exceção do controle, período de menor atividade metabólica. No Ponto 2 o tratamento NP apresentou o menor valor entre o 3° e 9° dia. A maior biomassa e atividade metabólica no tratamento NP podem estar associadas ao menor valor obtido pela razão, predominando processos de produção de COD e fotossíntese (Figura 2.9). Neste ponto é possível destacar também o alto valor obtido a partir da razão consumo de COD: entrada de CID para o controle entre 3° e 9° dia. A menor biomassa e maior diminuição no número de indivíduos observados entre o 4° e 10° dia no controle em relação aos demais tratamentos podem ter contribuído para o maior consumo de COD em relação à entrada de CID. Provavelmente, esse processo pode ter ocorrido devido à predominância de processos de mineralização do COD pelo bacterioplâncton em relação a processos de entrada de CID.

As maiores taxas de produção e consumo que ocorreram no tratamento NP (Figuras 2.11, 2.12) podem ser resultados da maior produtividade observada a partir dos valores de OD e pH, refletindo na maior produção de COD pelo fitoplâncton, excretando COD durante a fotossíntese, bem como no maior consumo, o que reforça a possível incorporação de COD na biomassa bacteriana e processos de mineralização (Figuras 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12).

2.5.6. Razão PPB:R

A razão PPB:R é usada como um índice para determinação da contribuição alóctone, por meio de matéria orgânica de origem terrestre, ou contribuição autóctone, a partir de fixação de energia pelos produtores primários. De acordo com essa razão, o suprimento de energia do ecossistema é suportado por produção autóctone a partir da produção primária dos organismos fitoplanctônicos, macrófitas aquáticas e algas bentônicas, quando a razão PPB:R for >1 , o que sugere a ocorrência de metabolismo autotrófico. Quando a razão for <1 , a respiração é maior do que a PPB, dependendo desse modo, da matéria orgânica externa, com predominância do metabolismo heterotrófico (Allan & Castillo, 2007).

No Ponto 1 os resultados obtidos a partir da razão PPB:R pelo método de incubação em garrafas apresentou o tratamento NP até o 3º dia, e todos os tratamentos do 3º ao 9º dia com valores >1 . Este valor sugere a predominância do metabolismo autotrófico, com fluxo de carbono exterior-água (Figura 2.18). Esses resultados convergem com os obtidos a partir do programa pCO₂sys. Os valores obtidos a partir da razão PPB:R pelo método AL¹³C apresentaram algumas diferenças dos resultados obtidos pelo método de incubação em garrafas. Neste caso, do 3º ao 9º dia os tratamentos P e NP apresentaram metabolismo heterotrófico, como observado em relação ao balanço metabólico (Figuras, 2.16 e 2.18). No Ponto 2, do 1º ao 3º dia de experimento, pelo método incubação em garrafas, os resultados apresentaram valores da PPB:R <1 . Os valores obtidos para respiração nesse ponto foram na maior parte negativos, o que pode estar associado a problemas operacionais com o oxímetro durante as medições nesse período. Nesse ponto, os valores obtidos através da razão PPB:R pelo método AL¹³C apresentaram apenas o tratamento NP no período do 1º ao 3º dia com metabolismo autotrófico. Nos demais tratamentos deste ponto o metabolismo heterotrófico e o fluxo água-atmosfera predominaram (Figura 2.18).

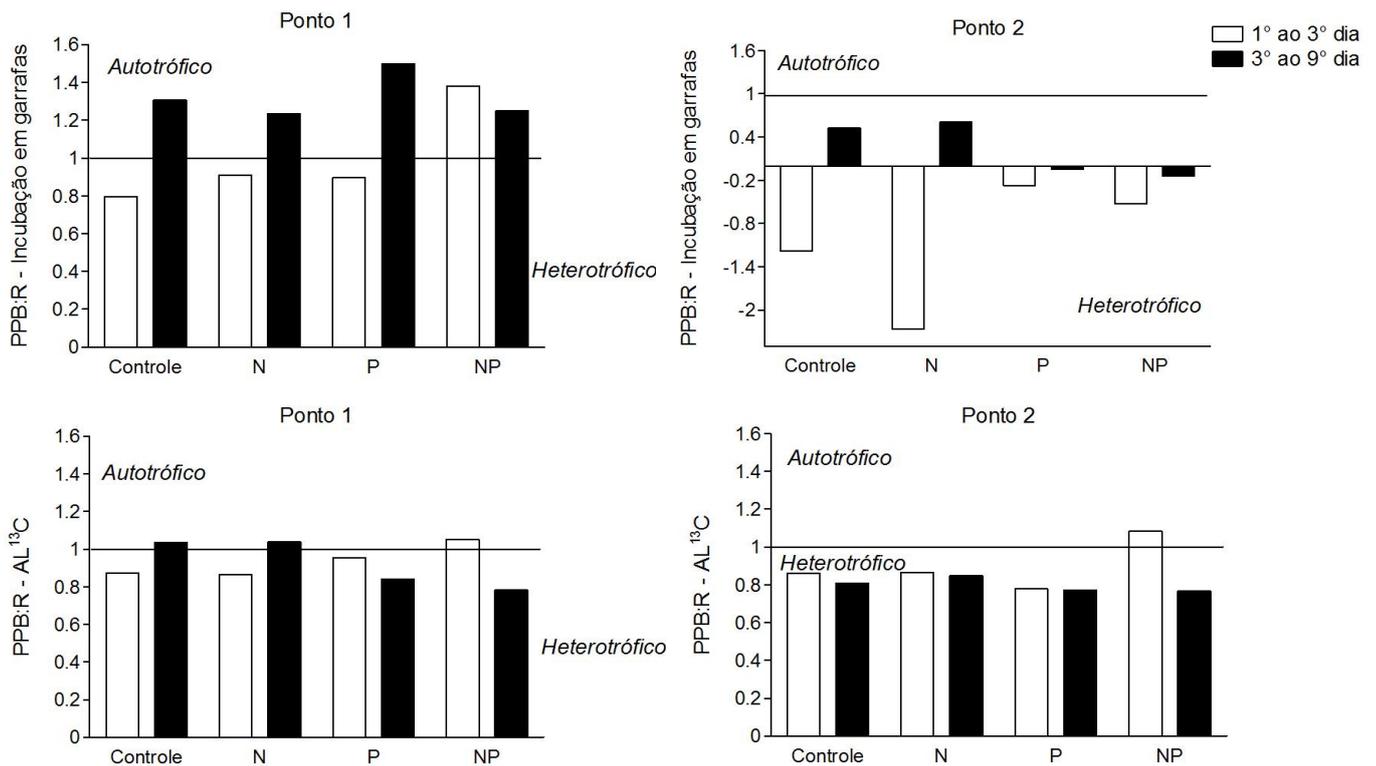


Figura 2.18. Valores da razão PPB:R (mM mM) obtidos nos dois pontos experimentais pelos métodos AL¹³C e incubação em garrafas. Valores >1 indicam a ocorrência de metabolismo autotrófico enquanto valores <1 a ocorrência de metabolismo heterotrófico.

Embora a maior parte dos resultados referentes aos fluxos de carbono entre a água e o exterior não tenham coincidido com os resultados obtidos a partir do programa pCO₂sys, os resultados obtidos a partir da razão PPB:R convergem em 100% com o balanço metabólico obtidos pelos métodos AL¹³C e incubação em garrafas (com exceção do Ponto 2, provavelmente devido a problemas operacionais). A adição de nutrientes estimulou a ocorrência de metabolismo autotrófico. Contudo, por ambos os métodos, essa resposta foi mais clara no tratamento com adição combinada dos nutrientes. A presença de colimitação nutricional pode ter controlado a comunidade fitoplanctônica refletindo na ocorrência do metabolismo aquático predominantemente heterotrófico (Figura 2.18).

Ambientes aquáticos que apresentam baixa biomassa algal ou baixa taxa de produção primária tendem a apresentar a R mais alta do que a PP. Del Giorgio & Peters (1994) sugerem que a razão PPB:R é <1 quando a concentração de clorofila-a for menor do que 17 µg L⁻¹, predominando a ocorrência do metabolismo heterotrófico. A lagoa de Iquiparí apresenta como característica alta produtividade primária e biomassa

algal. Com o decorrer dos dias dos experimentos, a biomassa fitoplanctônica diminuiu. Contudo, apenas no Ponto 2, no 8° e 10° dias de experimento, no controle e tratamento P, as concentrações de clorofila-*a* foram inferiores a $17 \mu\text{g L}^{-1}$. Considerando o proposto por del Giorgio & Peters (1994), estas elevadas concentrações de clorofila-*a* sugerem a predominância de metabolismo autotrófico durante os experimentos. Apesar disso, os resultados do balanço metabólico através dos três métodos (Figura 2.16) apresentaram em alguns casos a ocorrência de metabolismo heterotrófico. Este fato evidencia que a avaliação somente da biomassa fitoplanctônica pode levar a conclusões errôneas. A senescência da comunidade fitoplanctônica observada nos dois pontos a partir da diminuição na biomassa e número de indivíduos pode ser um indicativo da ocorrência do metabolismo heterotrófico, observado também a partir da razão PPB:R (Figura 2.18). Soma-se a isso a diminuição das taxas de fotossíntese do 3° para o 9° dia que também pode ter contribuído. As diferenças metodológicas empregadas em cada método, como por exemplo, a utilização de garrafas nas incubações, avaliação de OD ou CID, tamanho e escala dos experimentos, troca com o exterior, entre outras, podem também ter influenciado nos resultados (para maiores detalhes ver item 4.5.8). Outra questão que deve ser considerada são as modificações na composição da comunidade. Para assumir qual é o tipo predominante do metabolismo no ecossistema aquático é preciso cautela. Quando possível, deve ser levada em consideração a utilização de mais de um método para determinação do metabolismo aquático.

2.5.7. Transferências água-exterior e exterior-água

A comunidade perifítica apresenta geralmente produtividade alta em ecossistemas aquáticos lacustres rasos, podendo exibir entre 1 a 92% (média de 43%) da produção nesses ambientes (Vadeboncoeur & Steinman, 2003). No presente estudo, as concentrações médias de clorofila-*a* perifítica nos Pontos 1 e 2 variaram de $0,01$ a $0,08 \mu\text{g cm}^{-2}$ e de $0,4$ a $4,6 \mu\text{g cm}^{-2}$, respectivamente. Essas concentrações são características de ambiente aquático oligotrófico (concentrações inferiores a $200 \mu\text{g cm}^{-2}$) (Dodds *et al.*, 1998). Os baixos valores de biomassa perifítica podem estar relacionados ao curto tempo de apenas dez dias para colonização da comunidade perifítica nos substratos. Além disso, há a possibilidade de ter ocorrido sombreamento

do fundo dos mesocosmos pela biomassa algal presente dentro dos mesocosmos, o que dificultaria o estabelecimento dessa comunidade.

As diferenças de transferência de carbono obtidas entre o método $AL^{13}C$, com transferência de carbono no sentido água-exterior, e a pCO_2 , com transferência líquida no sentido exterior-água podem ser provavelmente devido ao metabolismo da comunidade perifítica - não utilizada nos cálculos para o método $AL^{13}C$ devido a questões operacionais. Além do curto período, o desenho experimental proposto tornou inviável a coleta do filme plástico para posterior análise da comunidade perifítica ao longo dos dias de experimento. Caso a comunidade perifítica tenha apresentado alta participação no metabolismo, o que pode ter ocorrido mesmo apresentando baixa concentração de clorofila-a, os resultados de transferência poderiam ser modificados, com um fluxo água-exterior maior. Embora os resultados tenham apresentado essas discrepâncias, a comunidade perifítica pode ser incluída nos cálculos utilizados no método $AL^{13}C$ em outros tipos de desenhos experimentais. Caso isso ocorra, os resultados de transferência gerados podem ser mais próximos dos obtidos pelo programa pCO_2 sys.

2.5.8. Comparações entre os métodos na determinação do metabolismo aquático

No presente estudo, embora em muitos casos os métodos para a determinação do metabolismo aquático tenham apresentado forte correlação, os valores de fotossíntese, PPB e R sempre superiores nos resultados obtidos através do método $AL^{13}C$ (Figuras 2.9, 2.10 e 2.15) podem estar associados a diferentes questões como as descritas a seguir.

2.5.8.1. Respiração na luz e no escuro

Os diferentes métodos que determinam o metabolismo aquático, com exceção do método que utiliza isótopos, determinam a respiração apenas no escuro. Nesse caso, para ser assumida a produção, o efeito da respiração pode ser eliminado a partir de experimentos paralelos no escuro no qual somente a respiração é medida. Contudo, isso só pode ser estimado se não houver crescimento durante o experimento o que dificilmente ocorreria. Em adição, problemas metodológicos surgem quando é assumida que a respiração na luz é igual à respiração no escuro. Existem evidências

de que a respiração na luz pode ser mais elevada do que a respiração no escuro, não podendo ser ignorada esta diferença. Quando isso ocorre, há uma subestimação da PPB e da R (Ferris & Christian, 1991; del Giorgio *et al.*, 1997; Pringault *et al.*, 2007). A não determinação da respiração na luz pelos métodos de incubação em garrafas e “Água Livre” (Kana, 1990) pode ter subestimando os resultados obtidos por estes métodos no presente estudo. Este fato pôde ser observado a partir da utilização de um método que avalia a respiração na luz, o método AL ^{13}C .

2.5.8.2. Diferença na utilização fisiológica do carbono e oxigênio pela comunidade fitoplanctônica

O método de incubação em garrafas, que utiliza variações nas concentrações de OD para determinação do metabolismo aquático é um método padrão em estudos que abordam o metabolismo. Entretanto, não há certeza que essas medições sejam válidas para o carbono, principalmente que as medições da respiração no escuro sejam válidas para comparar taxas obtidas no claro (Ryther, 1956; Ferris & Christian, 1991; Markager *et al.*, 1992; Pace & Prairie, 2005; Pringault *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2011). As variações entre as taxas de respiração na luz e no escuro podem ocorrer devido à diferença na fisiologia do fitoplâncton (Wieland & Kuhl, 2000; Ostrom *et al.*, 2005; Williams & del Giorgio, 2005; Pringault *et al.*, 2007; Carvalho & Eyre, 2012). A liberação de carbono na respiração é inibida na luz, devido principalmente ao carbono recém-fixado que será prontamente utilizado na respiração; e o consumo de oxigênio é mais elevado na luz do que no escuro, pois as atividades metabólicas tendem a ser mais elevadas em presença de luz (Carvalho, 2013). Pringault *et al.* (2007) observaram que a média da respiração na luz foi 350% maior do que a respiração no escuro, subestimando a PPB em mais de 100%. Esses valores podem ainda ser maiores em ambientes heterotróficos. Mesmo sabendo que há diferença entre a respiração na luz e no escuro, grande parte dos estudos sobre respiração tem ignorado essa diferença. Outras possíveis explicações para que a respiração na luz seja mais alta do que a respiração no escuro consiste na maior necessidade de energia para a realização da fotossíntese do que para a respiração. Isso ocorre devido também a processos de oxidação do fotossintato produzido na incubação em frascos claros, aumento da respiração mitocondrial na presença de luz e fotorespiração que pode ocorrer durante os experimentos (Bender *et al.*, 1987).

2.5.8.3. Problemas operacionais e desvantagens da técnica de incubação em garrafas

As baixas concentrações de OD medidas pelo método de incubações em garrafas e “Água Livre”, principalmente no Ponto 2, podem ter subestimado os resultados obtidos por ambos os métodos. Algumas medições realizadas pelo método de incubação em garrafas, principalmente nas garrafas escuras apresentaram valores iguais a zero, o que demonstra que a respiração já tinha exaurido o OD antes das medições. Embora o método da “Água Livre” evite problemas oriundos da incubação, um dos principais problemas enfrentados por este método são a mistura e troca ar-água que são difíceis de serem quantificadas (Luz & Barkan 2009; Duarte *et al.*, 2013).

O método da “Água Livre” permite a regeneração do CO₂ na água e do O₂ que vem do ar de forma que os organismos não estão limitados por estes fatores. Fato este que não ocorre pelo método de incubação em garrafas que pode ser limitado por CO₂ ou O₂ (Staehr *et al.*, 2012)

Dentre os diferentes fatores que comprometem os resultados do método de incubação em garrafas podem ser destacados a possível ocorrência de atenuação da luz a partir do material de que é feita a garrafa (no caso do presente estudo o vidro), que reduz a radiação UV e as taxas de fotossíntese. A incubação em garrafas pode também alterar a temperatura da garrafa em relação ao ambiente. Caso haja aumento da temperatura, as taxas de respiração podem ser superestimadas. O inverso ocorre quando há diminuição da temperatura em relação ao ambiente, causando subestimação dos resultados. Quando a incubação dura períodos acima de 5 horas é possível observar modificações na comunidade bacteriana e também nas características físico-químicas, modificação no hidrodinamismo e depleção ou enriquecimento por nutrientes. Quando isso ocorre, a água presente nas garrafas torna-se diferente da água presente no ambiente natural e no caso do presente estudo, diferente da água presente nos mesocosmos. Caso isso ocorra, pode gerar resultados diferentes do que seria esperado, causando dificuldades para comparar os resultados com o ambiente de estudo (Dodds & Brock, 1998; Grace & Imberger, 2006) e também com outros métodos. No presente estudo as incubações duraram 12 horas e há a possibilidade de ter ocorrido depleção dos nutrientes os quais apresentavam baixas concentrações já no 3º dia de experimento. Este fato pode ter aumentado às diferenças observadas entre os métodos. Para a determinação das concentrações de OD por este método, a água presente na garrafa teve que ser cuidadosamente transferida para um

béquer (a fim de evitar perdas de OD para atmosfera) porque devido a problemas operacionais o eletrodo do oxímetro não entrava na garrafa. Contudo, as concentrações de OD obtidas por este método foram superiores as concentrações de OD obtidas pelo método “Água Livre”, o que representa que as perdas de OD para a atmosfera durante a transferência da água presente na garrafa para o béquer foram mínimas.

2.6. Conclusões

- Utilizando o método AL¹³C foi possível obter sempre valores positivos de respiração, enquanto que com o método incubação em garrafas obtiveram-se algumas vezes valores negativos.
- Os fluxos fotossintéticos e respiratórios foram superiores pelos resultados obtidos no método AL¹³C do que nos resultados obtidos pelo método de incubação em garrafas.
- Em relação à PPL, os métodos baseados nas medições de OD apresentaram valores superiores aos obtidos pelo método AL¹³C.
- Durante o estudo observou-se a subestimação dos resultados de respiração obtidos pelo método de incubação em garrafas. O principal fator que pode ter contribuído para a discrepância dos valores de respiração, fotossíntese e PPL foi a não avaliação da respiração na luz por este método.
- A subestimação da respiração pelos métodos que utilizam as concentrações de OD para determinação do metabolismo aquático pode ter contribuído para a ocorrência de maior PPL nos resultados obtidos por estes métodos do que no método AL¹³C que apresentou menor PPL.
- O tratamento NP apresentou maior PPL do que os demais tratamentos. A ocorrência de maior atividade metabólica observada nesse tratamento resultou da ação sinérgica dos nutrientes N e P adicionados.

- Embora os métodos tenham apresentado diferentes balanços metabólicos, até o 3º dia o tratamento NP apresentou balanço metabólico autotrófico pelos três métodos avaliados. A adição combinada de nutrientes no tratamento NP evitou a colimitação nutricional que foi observada nos tratamentos com adição individualizada dos nutrientes, contribuindo para a ocorrência de maior produção primária nesse tratamento.

- A não subestimação da respiração pelo método AL¹³C favoreceu a ocorrência de maiores valores de respiração com a predominância do metabolismo heterotrófico ao longo dos dias avaliados.

- Devido à possibilidade de elevada participação da comunidade periférica, em estudos futuros seria importante à inclusão dessa comunidade como um componente separado do sistema, com determinação da sua biomassa e $\delta^{13}\text{C}$, nos cálculos utilizados pelo método AL¹³C.

- O presente trabalho foi pioneiro na determinação das transferências entre COP e COD e também na determinação do metabolismo aquático utilizando isótopos de carbono em sistemas abertos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em ecossistemas aquáticos a matéria orgânica pode ser classificada como particulada ($COP > 0,45 \mu M$) ou dissolvida ($COD < 0,45 \mu M$). O COP contribui com uma pequena fração (10 - 20%) da matéria orgânica enquanto o COD representa a maior parte e causa maior efeito sobre a produtividade primária (Wetzel, 1984). Nesse sentido, a importância em avaliar as concentrações de COD concerne principalmente na sua relevância ecológica exercendo influência sobre o metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Dentre as consequências que as concentrações de COD podem causar sobre o metabolismo aquático destacam-se a capacidade de limitar a produção primária a partir da regulação do crescimento dos produtores primários e das bactérias (Praire, 2008). As concentrações de COD podem ainda causar modificações nas taxas de respiração e biodisponibilidade de metais (Bade *et al.*, 2007). Considerando essas características, as concentrações de COD devem ser incluídas na determinação da PPL dos ecossistemas aquáticos, o que foi realizado de maneira pioneira no presente estudo. Embora as taxas de fotossíntese e respiração tenham sido superiores no método $AL^{13}C$ do que no método de incubação em garrafas, os valores de PPL pelos métodos de incubação em garrafas e “Água Livre” (determinados a partir das variações nas concentrações de OD) foram superiores aos resultados obtidos pelo método $AL^{13}C$. A utilização de dados sobre a produção e consumo de COD juntamente com as concentrações de COP permitiram calcular a PPL (método $AL^{13}C$) com dados diretos dos produtores primários a partir das variações das diferentes formas de C o que representa uma das vantagens do novo método.

A realização de experimentos com o uso de mesocosmos para estudar a comunidade planctônica em ecossistemas aquáticos é uma ferramenta amplamente utilizada há décadas (Watts & Grant, 2001). Geralmente, esses estudos avaliam os efeitos de mudanças propositalmente e controladas dos parâmetros físico-químicos e biológicos por meio de experimentos. Dentre esses fatores, o enriquecimento por nutrientes é o mais comumente utilizado (Hecky & Kilham, 1988; Watts & Grant, 2001). Os objetivos desses estudos na maioria das vezes são a determinação da produção primária e do ciclo do C (Oviatt *et al.*, 1986; Tcherkez *et al.*, 2010), decomposição (Shao *et al.*, 2013; Boros *et al.*, 2015), herbivoria (Sommer *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2013), limitação por luz e nutrientes, sedimentação, sucessão de espécies (Hecky & Kilham, 1988; Cloern, 1999; Joint *et al.*, 2002; Crossetti e Bicudo, 2005; Trochine *et al.*,

2014), poluição e eutrofização (Xu *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Na década de 1990 iniciou um aumento no número de estudos que utilizam isótopos estáveis o que favoreceu a realização de experimentos *in situ* e *ex situ*, proporcionando resultados mais realistas (Carvalho, 2013).

A existência de diferentes composições isotópicas permite avaliar, por exemplo, as fontes de C, autóctone ou alóctone, para os ecossistemas aquáticos e também permite quantificar o fluxo de C. Além disso, a utilização de isótopos estáveis pode elucidar teias alimentares e avaliar a eutrofização (Carvalho, 2008; Fry, 2008; Oczkowski *et al.*, 2014). Com relação à determinação do metabolismo aquático e a utilização de isótopos estáveis, os métodos desenvolvidos até o momento para sistemas abertos utilizam apenas isótopos estáveis de oxigênio (Carvalho, 2013). Em sistemas fechados, a utilização de isótopos estáveis de C foi realizada apenas uma vez (Carvalho & Eyre, 2012). Assim, o presente estudo é um trabalho pioneiro na realização de experimentos em sistemas abertos (mesocosmos) utilizando isótopos estáveis de C para a determinação do metabolismo aquático. Soma-se a isso, a determinação da produção e do consumo de COD que somente foram possíveis devido à utilização de isótopos estáveis de C.

Apesar dos mesocosmos não terem integrado os sedimentos, a realização de experimentos em sistemas abertos permitiu gerar resultados de respiração e fotossíntese superiores aos resultados obtidos pelo método de incubação em garrafas. Em relação ao método de incubação em garrafas, já é conhecido que ele subestima a respiração, principalmente pelo fato de que a respiração é mais alta na luz do que no escuro (Bender *et al.*, 1987). Em geral, por este método, a contribuição do zooplâncton de maior tamanho não é avaliada devido a maior capacidade de fuga desses organismos (Marra 2012; Duarte *et al.*, 2013) o que pode ter aumentado ainda mais a discrepância dos resultados de respiração entre os métodos.

Diferentes estudos observaram que grande parte dos ecossistemas aquáticos apresenta maior fluxo CO₂ do lago para a atmosfera. Nesse caso a respiração da matéria orgânica alóctone apresenta maior contribuição para os valores de respiração, predominando a ocorrência do metabolismo heterotrófico (Marcarelli *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2013; Hoellein *et al.*, 2013). No presente estudo o metabolismo heterotrófico ocorreu na maior parte dos dias e tratamentos avaliados pelo método AL¹³C o que não foi observado nos demais métodos, que apresentaram predominância do metabolismo autotrófico. Estes resultados sugerem que o método AL¹³C foi mais

sensível na detecção da respiração do que o método de incubação em garrafas contribuindo para os menores valores de PPL.

A produção primária tende a ser maior em ecossistemas aquáticos tropicais do que em ambientes localizados em regiões temperadas devido à ocorrência de temperatura constante ao longo do ano e maiores concentrações de nutrientes (Feresin *et al.*, 2010). Os baixos valores de PPL observados no presente estudo podem estar relacionados a diferentes fatores como: (1) as elevadas concentrações de COD podem ter estimulado o crescimento bacteriano nos mesocosmos, aumentando sua vantagem competitiva e incrementado a respiração heterotrófica (Carpenter *et al.*, 1998; Allgaier *et al.*, 2008). Conseqüentemente essas vantagens podem ter causado diminuição da biomassa dos organismos autótrofos e baixos valores de produção primária (Stets & Cotner, 2008; Hitchcock *et al.*, 2010; Hoellein *et al.*, 2013); (2) os baixos valores de PPL e os valores inferiores a 1 obtidos a partir da razão PPB:R demonstram que a matéria orgânica produzida na fotossíntese foi rapidamente respirada pelo plâncton presente nos mesocosmos (Staehr *et al.*, 2010); (3) a depleção das concentrações dos nutrientes adicionados logo nos dias iniciais contribuiu para a ocorrência de limitação nutricional refletindo em baixos valores de PPL; e (4) a herbivoria pode ter controlado a biomassa e produção dos produtores primários (Carpenter *et al.*, 1998; Stets & Cotner, 2008). Dentre eles, a limitação nutricional quantificada no presente estudo foi o principal fator limitante para a comunidade fitoplanctônica e produção primária, claramente observada entre os tratamentos com adição individualizada (que apresentaram colimitação nutricional) em relação ao tratamento com adição combinada dos nutrientes.

Quando considerada a comunidade fitoplanctônica, o COD pode ser produzido durante a fotossíntese ou ser liberado após a morte das algas (Kim *et al.*, 2000). A partir da diminuição observada na biomassa e no número de indivíduos da comunidade fitoplanctônica, a produção de COD no presente estudo pode estar mais associada à lise celular do que a liberação de COD durante a fotossíntese. Além disso, foram observados valores de respiração superiores aos de fotossíntese pelo método AL¹³C. Ao longo do presente estudo as concentrações de COD diminuíram do 1º ao 9º dia de experimento nos dois pontos amostrais. O maior consumo de COD, produção de COD (somente no Ponto 1) e também os maiores valores de fotossíntese e respiração ocorreram até o 3º dia de experimento. Esse período foi caracterizado por apresentar maior atividade biológica, com maior número de indivíduos, biomassa, OD e pH do que

os dias finais dos experimentos. Assim, a diminuição das concentrações de COD ao longo dos dias pode estar associada a processos de degradação da matéria orgânica e fotodegradação.

Apesar de o método AL¹³C apresentar inúmeras vantagens, podem ser destacadas algumas desvantagens da técnica, como por exemplo, a utilização de químicos perigosos, elevados custos com equipamentos e reagentes, a necessidade de pessoas treinadas para manusear os equipamentos, o que dificulta sua ampla utilização e as taxas de sedimentação da comunidade fitoplanctônica que não foram avaliadas no presente estudo (contudo em estudos futuros pode ser considerada).

No Brasil, embora haja alguns estudos sobre produção primária, poucos foram realizados no próprio ambiente aquático (Feresin *et al.*, 2010). A realização de experimentos *in situ* e os resultados obtidos a partir do método AL¹³C geraram importantes fontes de informações que podem ser utilizadas na predição de eventos que podem causar algum tipo de degradação no ecossistema de estudo. Assim, o controle da entrada dos nutrientes N e P, principalmente se for em conjunto, são as principais medidas para o manejo e conservação da lagoa de Iquiparí, que apresenta como características águas eutróficas e dominância de organismos pertencentes à classe Cyanophyceae.

CONCLUSÃO

Através dos experimentos de adição de nutrientes realizados foi possível verificar alterações na estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica além de variações nos parâmetros físico-químicos. Durante os dias de estudo e entre os tratamentos ocorreram variações em relação ao nutriente limitante ao crescimento algal. Em resposta às variações físico-químicas a comunidade fitoplanctônica apresentou modificações em sua composição, principalmente no Ponto 2. Inicialmente, o Ponto 2 apresentava dominância de organismos pertencentes a classe Cyanophyceae, grupo esse com espécies adaptadas a ambientes eutróficos e a elevado pH. No entanto, já no 4º dia de experimento, a classe Cryptophyceae apresentou maior dominância, enquanto a classe Cyanophyceae retomou novamente a dominância no 10º dia. A diferença na hidroquímica da água da lagoa entre os pontos foi o principal fator para que a dominância da classe Cryptophyceae tenha ocorrido no Ponto 2, o que não foi observado no Ponto 1. A classe Cryptophyceae apresenta organismos capazes de realizar a mixotrofia com vantagens e preferência por ambientes ricos em substâncias húmicas, características presentes no Ponto 2.

A primeira hipótese do estudo foi refutada. A densidade, biomassa e composição da comunidade fitoplanctônica não apresentaram relação clara com a adição dos nutrientes. Embora o incremento de nutrientes inicialmente possa aumentar a biomassa dos produtores primários, no presente estudo, a biomassa e também a densidade apresentaram tendência de queda ao longo dos dias de experimento em ambos os pontos amostrais o que pode estar associado à ocorrência de herbivoria e/ou sedimentação dos organismos. As modificações na físico-química da água, principalmente a depleção das concentrações dos nutrientes, contribuíram para as diminuições na biomassa e densidade. A segunda hipótese do estudo que está relacionada à ocorrência de maior biomassa no tratamento com adição combinada dos nutrientes devido à ação sinérgica dos nutrientes foi confirmada. O tratamento NP apresentou maior biomassa do que os tratamentos com adição individualizada que apresentaram colimitação nutricional. Contudo, embora o tratamento NP tenha apresentado maior biomassa, esse tratamento apresentou menor número de indivíduos do que o tratamento N (com exceção do Ponto 2 no 10º dia), o que pode estar relacionado ao conteúdo de clorofila-a e a diferente composição da comunidade fitoplanctônica nesses tratamentos.

A resposta do metabolismo aquático, com ocorrência do metabolismo autotrófico após a adição dos nutrientes não foi tão clara devido à colimitação nutricional nos tratamentos com adição individualizada, sendo a terceira hipótese refutada. Os resultados do presente estudo demonstraram o controle que os nutrientes N e P exerceram sobre os produtores primários e sobre o metabolismo aquático. Embora a eutrofização possa estimular a ocorrência do metabolismo autotrófico, como demonstrado em alguns estudos, aumentando a produção primária ($P > R$), outros fatores podem também influenciar no balanço metabólico. Dentre eles, como observado no presente estudo, a colimitação nutricional desenvolvida após a adição de apenas um nutriente limitante pode não estimular a produção primária, predominando a ocorrência do metabolismo heterotrófico ($R > P$). Após eventos de eutrofização, principalmente se mantida a fonte de nutriente para o ambiente aquático, o incremento da biomassa dos produtores pode desencadear aumento da matéria orgânica que eleva as taxas de decomposição, depleciona as concentrações de OD e conseqüentemente diminui a produção primária, estimulando a ocorrência do metabolismo heterotrófico, com fluxo CO_2 água-atmosfera.

Por se tratar da utilização de um novo método para a determinação do metabolismo aquático, a realização de novos estudos utilizando o novo método deve ser realizado para difundir e aperfeiçoar a nova metodologia. A fim de evitar a ocorrência de limitação nutricional e obter respostas mais claras em relação ao incremento de nutrientes e metabolismo aquático, sugere-se a realização de experimentos com adição combinada dos nutrientes em diferentes concentrações e proporções e/ou com contínua adição de nutrientes.

REFERÊNCIAS

- Allan, J. D. & Castillo, M. M. (2007) Stream Ecology, Structure and Function of Running Waters. Second Edition. Springer. 308 - 316p.
- Allgaier, M., Riebesell, U., Vogt, M., Thyraug, R. & Grossart, H-P. (2008) Coupling of heterotrophic bacteria to phytoplankton bloom development at different $p\text{CO}_2$ levels: a mesocosm study. *Biogeosciences*, 5: 1007–1022.
- Alvarez-Góngora, C. & Herrera-Silveira, J. A. (2006) Variations of phytoplankton community structure related to water quality trends in a tropical karstic coastal zone. *Marine Pollution Bulletin*, 52(1):48–60.
- Amado, A.M., Farjalla, V. F., Esteves, F. A. & Bozelli, R.L. (2003) DOC photo-oxidation in clear water Amazonian aquatic ecosystems. *Amazoniana*, 17:513-523.
- Andrade, C. F. F, Niencheski, L. F. H., Attisano, K. K., Milani, M. R., Santos, I. R. & Milani, I. C. (2012) Fluxos de nutrientes associados às descargas de água subterrânea para a Lagoa Mangueira (Rio Grande do Sul, Brasil). *Química Nova*, 35 (1): 5-10.
- Arocena, R., Prat, N. & Rodrigues, A. (2003) Design and evaluation of benthic mesocosms for coastal lagoons. *Limnetica*, 22(3-4): 117-128.
- Arreghini, S., de Cabo, L., Seoane, R., Tomazin, N., Serafíni, R. & de Iorio, A. F. (2005) Influence of rainfall on the discharge, nutrient concentrations and loads of a stream of the “Pampa Ondulada” (Buenos Aires, Argentina). *Limnetica*, 24(3-4): 225-236.
- Bade, D. L., Carpenter, S. R., Cole, J. J., Pace, M. L., Kritzberg, E. Bogert, M. C. V., Cory, R. M. & McKnight, D. M. (2007) Sources and fates of dissolved organic carbon in lakes as determined by whole-lake carbon isotope additions. *Biogeochemistry*, 84 (2):115–129.
- Barnes, R. S. K. (1980) Coastal lagoons: The natural history of a neglected habitat. Cambridge: Cambridge University Press, 106 p.
- Bender, M., Grande, K., Johnson, K., Marra, J., Williams, P. J. L., Sieburth, J., Pilon, M., Langdon, C., Hitchcock, G., Orchard, J., Blunt, C., Donaghay, P. & Heinemann, K. (1987) A comparison of four methods for determining planktonic community production. *Limnology and Oceanography*, 32(5): 1085-1098.
- Bennett, E. M., Carpenter, S. R. & Caraco, N. F. (2001) Human Impact on Erodeable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective. *BioScience*, 51 (3): 227-234.
- Bertilsson S. & Jones J. B. (2003). Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. In: Findlay S.E.G., Sinsabaugh R.L. (eds). Aquatic

Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter. Academic Press, San Diego, pp. 3–24.

Bertilsson, S. & Tranvik, L.J. (2000) Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnology and Oceanography*, 45(4):753-762.

Boros, G., Takács, P & Vanni, M. J. (2015) The fate of phosphorus in decomposing fish carcasses: a mesocosm experiment. *Freshwater Biology*, 60(3): 479–489.

Bower, P., M., Kelly, C. A., Fee, E. J., Shearer, J. A., DeClercq, D. R. & Schindler, D. W. (1987) Simultaneous measurement of primary production by whole-lake and bottle radiocarbon additions. *Limnology and Oceanography*, 32(2): 299-312.

Branco, C. C., Kozlowsky-Suzuki, B., Esteves, F. A. & Aguiaro, T. (2008) Zooplankton distribution and community structure in a Brazilian Coastal Lagoon. *Vie et milieu - life and environment*, 58(1): 1-9.

Brookes, J. D. & Carey, C. C. (2011) Resilience to blooms. *Science*, 334: 46–47.

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

Carlsson, P., Granéli, E., Granéli, W., Rodriguez, E. G., de Carvalho, WF., Brutemark, A. & Lindehoff, E. (2012) Bacterial and phytoplankton nutrient limitation in tropical marine waters, and a coastal lake in Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 418–419: 37–45.

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

Carneiro, L. S., Caliman, A., Guariento, R. D., Rocha, A. M., Quesado, L.B., Fonte, E.S., Santangelo, J. M., Leal, J. J. F., Lopes, P. M., Meirelles-Pereira, F., Esteves, F. A. & Bozelli, R.L. (2013) Effects of food web structure and resource subsidies on the patterns and mechanisms of temporal coherence in a tropical coastal lagoon: an experimental mesocosm approach. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(3): 315-325.

Carpenter, S. R., Cole, J. J., Kitchell, J. F. & Pace, M. L. (1998) Impact of dissolved organic carbon, phosphorus, and grazing on phytoplankton biomass and production in experimental lakes. *Limnology and Oceanography*, 43(1): 73-80.

Carpenter, S. (2008) Phosphorus control is critical to mitigating Eutrophication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (32): 11039–11040.

Carvalho, L., Solimini, A. G., Phillips, G., Van den Berg, M., Pietilainen, O-P., Solheim, A. L., Poikane, P. & Mischke, U. (2008) Chlorophyll reference conditions for European lake types used for intercalibration of ecological status. *Aquatic Ecology*, 42(2):203–211.

Carvalho, M. C. (2008) Uso de isótopos estáveis de carbono, nitrogênio e enxofre em estudos de ecologia costeira. *Oecologia Brasiliensis*, 12(4):649 – 705.

Carvalho, M. C. & Eyre, B. D. (2011) Carbon stable isotope discrimination during respiration by three species of seaweed. *Marine Ecological Progress Series*, 437: 41-49.

Carvalho, M. C. & Eyre, B. D. (2012) Measurement of planktonic CO₂ respiration in the light. *Limnology and Oceanography Methods*, 10: 167–178.

Carvalho, M. C. (2013) Isótopos estáveis aplicados à medição da produção primária em ecossistemas aquáticos. *Oecologia Australis*, 17(2): 195-204.

Chen, C. C., Petersen, J. E. & Kemp, W. M. (2000) Nutrient-uptake in experimental estuarine ecosystems: scaling and partitioning rates. *Marine Ecology Progress Series*, 200: 103-116.

Chopra, G., Tyor, A. K. & Aggarwal, N. (2013) Biodiversity and community composition of phytoplankton in three lentic water bodies of different human use. *International Journal of Environmental Sciences*, 3(5): 1678-1688.

Cloern, J. E. (1999) The relative importance of light and nutrient limitation of phytoplankton growth: a simple index of coastal ecosystem sensitivity to nutrient enrichment. *Aquatic Ecology*, 33(1): 3-15.

Cloern, J. E. (2001) Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series*, 210: 223-253.

Cole, J. J., Pace, M. L., Carpenter, S. R. & Kitchell, J. F. (2000) Persistence of net heterotrophy in lakes during nutrient addition and food web manipulations. *Limnology and Oceanography*, 45(8): 1718–1730.

Cooke, G. D., Welch, E. B., Peterson, S. & Nichols, S. A. (2005) Restoration and management of lakes and reservoirs, 3rd ed. CRC Press.

Crossetti, L. O. & Bicudo, C. E. M. (2005) Effects of nutrient impoverishment on phytoplankton biomass: a mesocosms experimental approach in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, southeast Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 28 (1): 95-108.

Cuvin-Aralar, M. L., Focken, U., Becker, K. & Aralar, E. V. (2004) Effects of low nitrogen-phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquatic Ecology*, 38(3): 387–401.

Das, D. & Panda, T. (2010) Water Quality and Phytoplankton Population in Sewage Fed River of Mahanadi, Orissa, India. *Journal of Life Science*, 2(2): 81-85.

del Giorgio & Peters (1994) Patterns in planktonic P :R ratios in lakes: Influence of lake trophity and dissolved organic C. *Limnology and Oceanography*, 39: 772–787.

del Giorgio, P. A., Cole, J. J. & Cimbleris, A. (1997) Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature*, 385(9): 148-151.

Dodds, W. K (2006) Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnology and Oceanography*, 51:(1) 671–680.

Dodds, W. K. & Brock, J. (1998) A portable flow chamber for in situ determination of benthic metabolism. *Freshwater Biology*, 39(1): 49-59.

Dodds, W. K., Jones, J. R. & Welch, E. B. (1998) Suggested classification of stream trophic state: distributions of temperate stream types by chlorophyll, total nitrogen, and phosphorus. *Water Research*, 32 (5): 1455-1462.

Dokulil, M. T. & Teubner, K (2000) Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1-3): 1–12.

Dortch, Q. & Whittedge, T. E. (1992) Does nitrogen or silicon limit phytoplankton production in the Mississippi River plume and nearby regions? *Continental Shelf Research*, 12(11): 1293–1309.

Duarte, C. M. & Prairie, Y. T. (2005) Prevalence of heterotrophy and atmospheric CO₂ emissions from aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 8(7): 862-870.

Duarte, C. M., Regaudie-de-Gioux, A., Arrieta, J. M., Delgado-Huertas, A. & Agusti, S. (2013) The oligotrophic ocean is heterotrophic. *Annual Review of Marine Science*, 5:551–69.

Edler, L. (Ed.). (1979) Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. *Baltic Marine Biologists*. WG- . BMB. Publ. 38p.

Edwards, K. F., Klausmeier, C. A. & Litchman, E. (2011) Evidence for a three-way trade-off between nitrogen and phosphorus competitive abilities and cell size in phytoplankton. *Ecology*, 92(11): 2085–2095.

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 enrichments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 47(7): 1468–1477.

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(12): 1135–1142.

Esteves, F. A. (1998) Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência, 2 edição.

Estrada, M., Berdalet, E., Vila, M. & Marrasé, C. (2003) Effects of pulsed nutrient enrichment on enclosed phytoplankton: ecophysiological and successional responses. *Aquatic Microbial Ecology*. 32: 61–71.

Falconer, I. R. (2005) Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: cylindrospermopsins and microcystins. Taylor & Francis Library, CRC Press.

Falkowski, P.G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A. , Schofield, O. & Taylor, F.J. R. (2004) The evolution of moderns eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682):354–360.

Farjalla, V. F., Amado, A. M., Suhett, A. L. & Meirelles-Pereira, F. (2009) DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems. *Environmental Science Pollution Research*, 16(5):531–538.

Feresin, E. G., Arcifa, M. S. Silva, L. H. S. & Esguícero, A. L. H. (2010) Primary productivity of the phytoplankton in a tropical Brazilian shallow lake: experiments in the lake and in mesocosms. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 22(4) 384-396.

Ferris, J. M. & Christian, R. (1991) Aquatic primary production in relation to microalgal responses to changing light: a review. *Aquatic Sciences*, 53(2-3): 187-217.

Fields, S. (2004) Global Nitrogen: Cycling out of Control. *Environmental Health Perspectives*, 112(10): A556–A563.

Fonte, E. S., Carneiro, L. S., Caliman, A., Bozelli, R. L., Esteves, F. A. & Farjalla, V. F. (2012) Effects of resources and food web structure on bacterioplankton production in a tropical humic lagoon. *Journal of Plankton Research*, 33 (10): 1596-1604.

Fonseca, A.; Braga, E. S. & Eichler, B. B. (2002) Distribuição espacial dos nutrientes inorgânicos dissolvidos e da biomassa fitoplanctônica no sistema pelágico da Lagoa da Conceição, Santa Catarina, Brasil (Setembro, 2000). *Atlântica*, 24(2): 69-83.

- Fonseca, A. (2006) Efeito da drenagem urbana nas características físico-químicas e biológicas da água superficial na Lagoa da Conceição (Florianópolis, SC, Brasil). *Biotemas*, 19(2): 7-16.
- Fouilland, E. & Mostajir, B. (2010) Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters FEMS. *Microbiology Ecology*, 73(3): 419–429.
- Fry, B. (2008) Stable Isotope Ecology. Springer, USA, Terceira Edição. Páginas: 45- 67.
- Gaarder, T. & Gran, H. H. (1927) Investigations of production of plankton in the Oslo Fjord. Rapp. Et Proe-Verb., *Cons. Internat. Explor. Mer.*, 42: 1-48.
- Goericke, R., Montoya, J. P. & Fry, B. (1994) Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria, p. 187-221. In K. Lajtha and R. H. Michener [eds.]. Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific Publications.
- Grace, M.R. & Imberger, S.J. (2006) Stream Metabolism: Performing & Interpreting Measurements. Water Studies Centre Monash University, Murray Darling Basin Commission and New South Wales Department of Environment and Climate Change, p. 1-205.
- Gran, G. (1952) Determination of equivalent point in potentiometric titration. *Analyst*, 77: 661-671.
- Grossart, H-P (2010) Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6): 706–714.
- Gruner, D. S., Jennifer, S. J. E, Seabloom, E. W., Sandin, S. A., Ngai, J. T., Hillebrand, H., Harpole, S. W., Elser, J. J., Cleland, E. E., Bracken, M. E. S., Borer, E. T. & Bolker, B. M. (2008) A cross-system synthesis of consumer and nutrient resource control on producer biomass. *Ecology Letters*, 11(7): 740-755.
- Guariento, R. D., Carneiro, L. S., Caliman, A., Bozelli, R. L., Leal, J. J. F. & Esteves, F. A. (2010) Interactive effects of omnivorous fish and nutrient loading on net productivity regulation of phytoplankton and periphyton. *Aquatic Biology*, 10(3): 273–282.
- Gu, B., Schelske, C. L. & Coveney, M. F. (2011) Low carbon dioxide partial pressure in a productive subtropical lake. *Aquatic Sciences*, 73(3): 317–330.
- Guo, Q., Keming M. Yang, L., Cai, Q. & He, K. (2010) A comparative study of the impact of species composition on a freshwater phytoplankton community using two contrasting biotic indices. *Ecological Indicators*, 10(2): 296–302.

- Hanson, P. C., Bade, D. L., Carpenter, S. R. & Kratz, T. K. (2006) Lake metabolism: Relationships with dissolved organic carbon and phosphorus *Limnology and Oceanography*, 48(3), 1112–1119.
- Healey & Hendzel, L. L. (1980). Physiological indicators of nutrient deficiency in lake phytoplankton. *Canadian Journal Fisheries Aquatic Science*, 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. *Limnology and Oceanography*, 33(3): 796–822.
- Hecky, R. E., Campbell, P. & Hendzel, L. L. (1993) The stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in particulate matter of lakes and oceans. *Limnology and Oceanography*, 38(4): 709-724.
- Hennemann, M. C. & Petrucio, M. M. (2010) Seasonal phytoplankton response to increased temperature and phosphorus inputs in a freshwater coastal lagoon, Southern Brazil: a microcosm bioassay. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 22(3): 295-305.
- Hitchcock, J. N., Mitrovic, S. M., Kobayashi, T. & Westhorpe, D. P. (2010) Responses of Estuarine Bacterioplankton, Phytoplankton and Zooplankton to Dissolved Organic Carbon (DOC) and Inorganic Nutrient Additions. *Estuaries and Coasts*, 33(1):78–91.
- Hoellein, T. J. Bruesewitz, D. A. & Richardson, D. C. (2013) Revisiting Odum (1956): A synthesis of aquatic ecosystem metabolism. *Limnology and Oceanography*, 58(6), 2089–2100 .
- Hongve, D. (1994) Nutrient metabolism (C, N, P, and Si) in the trophogenic zone of a meromictic lake. *Hydrobiologia*, 277(1): 17-39.
- Hu, R., Han, B. & Hu, L. N-S. (2013) Comparing biological classifications of freshwater phytoplankton: a case study from South China. *Hydrobiologia*, 701:219–233.
- Ishaq, F. & Khan, A. (2013) Aquatic Biodiversity as an Ecological Indicators for Water Quality Criteria of River Yamuna in Doon Valley, Uttarakhand, India. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(3): 322-334.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167, p. 191-194.
- Joint, I., Henriksen, P., Fonnes, G. A., Bourne, D., Thingstad, T. F. & Riemann, B. (2002) Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquatic Microbial Ecology*, 29(2): 145–159.

Joiris, C. (1977) On the role of heterotrophic bacteria in marina ecosystems: Some problems. *Helgolander wis. Meeresunters*, 30: 611-621.

Kana, T. M. (1990) Light-dependent oxygen cycling measured by an oxygen-18 isotope dilution technique. *Marine Ecology Progress Series*, 64: 293-400.

Kankal, N. C. & Warudkar, S. (2012) Biodiversity of phytoplankton, zooplankton and zoobenthos in east coast, bay of Bengal near Nellore, Andhra Pradesh (India). *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 1(2):2.

Katsiapi, M., Mazaris, A. D., Charalampous, E. & Moustaka-Gouni, M. (2012) Watershed land use types as drivers of freshwater phytoplankton structure. *Hydrobiologia*, 698:121–131.

Katsiapi, M., Moustaka, M., Michaloudi, E. & Kormas, A. K. (2011) Phytoplankton and water quality in a Mediterranean drinking-water reservoir (Marathonas Reservoir, Greece). *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 563–575.

Kemp, W.M., Testa, J.M., Conley, D.J., Gilbert, D. & Hagy, J.D. (2009) Temporal responses of coastal hypoxia to nutrient loading and physical controls. *Biogeosciences*, 6: 2985–3008.

Kim, B. M, Choi, M. K., Kim, C. M., Leem, U-H. & im, Y-H (2000) Effects of the summer monsoon on the distribution and loading of organic carbon in a deep reservoir, Lake Soyang, Korea. *Water Research*, 34(14): 3495-3504.

Kim, H-S., Hwang, S-J., Shin, J-K., An, K. G. & Yoon, C. G. (2007) Effects of limiting nutrients and N:P ratios on the phytoplankton growth in a shallow hypertrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 581:255–267.

Knoppers, B. A. (1994) Aquatic primary production in coastal lagoons. (Ed.). *Coastal lagoon Processes*. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.243-286.

Kozlowsky-Suzuki, B. & Bozelli, R. L. (2002) Experimental evidence of the effect of nutrient enrichment on the zooplankton in a Brazilian coastal lagoon. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4): 835-846.

Kohler, J. (1998) Measurement of photosynthetic oxygen production. *Rostocker Meeresbiologische Beitrage*, 6:17-21.

Lagus, A., Suomela, J., Helminen, H. & Sipura, J. (2007) Impacts of nutrient enrichment sediments in phytoplankton community structure in the northern Baltic Sea. *Hydrobiologia*, v. 579, p. 351-368.

Lamego, A. R. (1955) Geologia das quadrículas de Campos, São Tomé, Lagoa Feia e Xexé. Rio de Janeiro, Boletim da Divisão de Geologia e Mineralogia do Departamento Nacional de Produção Mineral.

Lin, Y. J., He, Z. L., Yang, Y. G., Stoffella, P. J., Philips, E. J. & Charles, A. P. (2008) Nitrogen versus phosphorus limitation of phytoplankton growth in Ten Mile Creek, Florida, USA. *Hydrobiologia*, 605: 247–258.

Litchman, E., Pinto, P. T., Klausmeier, C. A., Thomas, M. K. & Yoshiyama, K. (2010) Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia*, 653:15–28.

Lund, J.W. G. Kipling, C. & Le Cren, D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*. 11:143-170.

Luz, B. & Barkan, E. (2009) Net and gross oxygen production from O₂/Ar, ¹⁷O/¹⁶O and ¹⁸O/¹⁶O ratios. *Aquatic Microbial Ecology*, 56:133–45.

Mahapatro, D., Panigrahy, R. C. & Panda, S. (2013) Coastal Lagoon: Present Status and Future Challenges. *International Journal of Marine Science*, 3(23): 178-186.

Marcarelli, A.M., Baxter, C. V., Mineau, M. M. & Hall, R. O. (2011) Quantity and quality: unifying food web and ecosystem perspectives on the role of resource subsidies in freshwaters. *Ecology*, 92(6): 1215–1225.

Margalef, R. (1983). *Limnologia*. Barcelona, Omega, 1010p.

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.

Marra, J. (2009) Net and gross productivity: weighing in with ¹⁴C. *Aquatic Microbial Ecology*, 56: 123–131.

Marra, J. (2012) Comment on “Measuring primary production rates in the ocean: enigmatic results between incubation and non-incubation methods at Station ALOHA” by P. D. Quay et al. *Global Biogeochemical Cycles*, 26(2):GB2031.

Markager, S., Jespersen, A. M., Madsen, T. V., Berdalet, E. & Weisburd, R. (1992) Diel changes in dark respiration in a plankton community. *Hydrobiologia*, 238: 119-130.

Marotta, H. (2006) Os fatores reguladores do metabolismo aquático e sua influência sobre o fluxo de dióxido de carbono entre os lagos e a atmosfera. *Oecologia Brasiliensis*, 10(2): 177-185.

- Marotta, H., Duarte, C. M., Meirelles-Pereira, F., Bento, L., Esteves, F. A., & Enrich-Prast, A. (2010) Long-Term CO₂ Variability in Two Shallow Tropical Lakes Experiencing Episodic Eutrophication and Acidification Events. *Ecosystems*, 13(3): 382-392.
- Marotta, H., Duarte, C. M., Guimarães-Souza, B. A. & Enrich-Prast, A. (2012) Synergistic control of CO₂ emissions by fish and nutrients in a humic tropical lake. *Oecologia*, 168(3): 839-847.
- Mette, E. M., Vanni, M. J., Newell, J. M. & González, M. J. (2011) Phytoplankton communities and stoichiometry are interactively affected by light, nutrients, and fish. *Limnology and Oceanography*, 56(6): 1959–1975.
- Mintrop, L., Perez, F. F., Gonzalez-Davila, M., Santana-Casiano, J.M. & Körtzinger, A. (2000) Alkalinity determination by potentiometry: intercalibration using three different methods. *Ciencias Marinas*, 26(1): 23-37.
- Muhid, P., Davis, T. W., Bunn, S. E. & Burford, M. A. (2013) Effects of inorganic nutrients in recycled water on freshwater phytoplankton biomass and composition. *Water Research*, 47: 384-394.
- Ndebele-Murisa, M., Musil, C. F. & Raitt, L. (2010) A review of phytoplankton dynamics in tropical African lakes. *South African Journal of Science*, 106 (1/2): 64-71.
- Nixon, S. W. (2009) Eutrophication and the macroscope. *Hydrobiologia*, 629:5–19.
- Nõges, P., Mischke, U., Laugaste, R. & Solimini, A. G. (2010) Analysis of changes over 44 years in the phytoplankton of Lake Võrtsjarv (Estonia): the effect of nutrients, climate and the investigator on phytoplankton-based water quality indices. *Hydrobiologia*, 646:33–48.
- Oczkowski, A., Markham, E., Hanson, A. & Wigand, C. (2014) Carbon stable isotopes as indicators of coastal eutrophication. *Ecological Applications*, 24(3):457-66.
- Olsen, S., Chan, F., Li, W., Zhao, S., Søndergaard, M. & Jeppesen, E. (2015) Strong impact of nitrogen loading on submerged macrophytes and algae: a long-term mesocosm experiment in a shallow Chinese lake. *Freshwater Biology*, Early View (Online Version of Record published before inclusion in an issue).
- O’Neil, J.M., Davis, T. W., Burford, M. A. & Gobler, C. J. (2012) The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14: 313–334.

Ogbuagu, D. H & Ayoade, A. A. (2012) Phytoplankton Assemblage along Gradients of the Imo River in Etche Local Government Area, Nigeria. *Annals of Biological Research*, 3 (4):1852-1862.

Ostrom, N. E., Carrick, H. J., Twiss, M. R. & Piwinski, L. (2005) Evaluation of primary production in Lake Erie by multiple proxies. *Oecologia*, 144: 115–124.

Oviatt, A., Rudnick, D. T., Keller, A. A., Sampou, P. A. & Almquist, G. T. (1986) A comparison of system (O_2 , and CO_2) and C-14 measurements of metabolism in estuarine mesocosms Candace. *Marine Ecology Progress Series*, 28: 57-67.

Pace, M. L. & Prairie, Y. T. (2005) Respiration in lakes. In: del Giorgio PA, Williams PJB, editors. Respiration in aquatic ecosystems. New York (NY): Oxford. p. 103-121.

Pacheco, J. P, Iglesias, C., Meerhoff, M., Fosalba, C, Goyenola, G, Teixeira-de Mello, F., Garcia, S., Gelós, M. & García-Rodríguez, F. G. (2010) Phytoplankton community structure in five subtropical shallow lakes with different trophic status (Uruguay): a morphology-based approach. *Hydrobiologia*, 646:187–197.

Paerl, H. W., Xu, H., McCarthy, M. J., Zhu, G., Qin, B., Li, Y. & Gardner, W. S. (2011) Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu, China): The need for a dual nutrient (N & P) management strategy. *Water Research*, 45 (5): 1973–1983.

Palleyi, S.; Kar, R. N. & Panda, C. R. (2011) Influence of Water quality on the biodiversity of phytoplankton in Dhamra River Estuary of Odisha Coast, Bay of Bengal. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 15 (1): 69 – 74.

Parsons, T. R., Takahashi, M. & Hargrave, B. (1984) Biological Oceanographic Process. 3. ed. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1984. 330 e 344 p.

Peixoto, R. B., Marotta, H. & Enrich-Prast, A. (2013) Experimental evidence of nitrogen control on pCO_2 in phosphorus-enriched humic and clear coastal lagoon waters. *Frontiers in Microbiology*, 4 (11): 1-6.

Peterson, B. J. & Fry, B. (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 293-320.

Philps, E. J., Badylak, S., Christman, M. C. & Lasi, M. A. (2010) Climatic Trends and Temporal Patterns of Phytoplankton Composition, Abundance, and Succession in the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Estuaries and Coasts*, 33:498–512.

Pierrot, D. E., Lewis, D. W. & Wallace, R. (2006) MS Excel Program Developed for CO₂ System Calculations. ORNL/CDIAC-105a. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee.

Pringault, O., Tassas, V. & Rochelle-Newall, E. (2007) Consequences of respiration in the light on the determination of production in pelagic systems. *Biogeosciences*, 4:105–114.

Qin B., Gao, G., Zhu, G., Zhang, Y., Song, Y., Tang, X., Xu, H. & Deng M. (2013) Lake eutrophication and its ecosystem response. *Chinese Science Bulletin*, 58:9: 961-970.

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

Reynolds, C. S. (1996) Phosphorus recycling in lakes: evidence from large limnetic enclosures for the importance of shallow sediments. *Freshwater Biology*, v. 35, p. 623-645.

Reynolds, C. S. (2006) *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge: 384 e 535.

Richardson, K. & Jørgensen, B.B. (1996) Eutrophication: definition, history and effects. *Eutrophication in coastal marine ecosystems*, 1-19.

Rigosi, A., Carey, C. C., Ibelings, B. W. & Brookes, J. D. (2014) The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. *Limnology and Oceanography*, 59(1): 99–114.

Rissik, D., Shon, E. H., Newell, B., Baird, M. E. & Suthers, I. M. (2009) Plankton dynamics due to rainfall, eutrophication, dilution, grazing and assimilation in an urbanized coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84: 99–107.

Romo, S. & Villena M-J. (2005) Phytoplankton strategies and diversity under different nutrient levels and planktivorous fish densities in a shallow Mediterranean lake. *Journal of Pankton Research*, 27 (12): 1273–1286.

Ross, O. N., Geider, R. J. & Piera, J. (2011) Modeling the effect of vertical mixing on bottle incubations for determining in situ phytoplankton dynamics. II. Primary production. *Marine Ecology Progress Series*, 435:33-45.

Ryther, J. (1956) The measurement of primary production. *Limnology and Oceanography*, 1(2): 74-82.

Sabater S., Armengol J., Sabater F., Comas E., Urrutia I. & Urrizalqui, I. (2000) Algal biomass in a disturbed Atlantic river: water quality relationships and environmental implications. *Science of Total Environment*, 263:185–195

Santos, A. M. (2004) Produtividade primária de macrófitas aquáticas. Sociedade Brasileira de Limnologia. LIMNOTemas, número 4.

Scheffer, M. & Jeppesen, E. (1998) Alternative stable states. In The structuring role of submerged macrophytes in lakes (ed. E. Jeppesen, M. Sondergaard, M. Sondergaard & K. Christoffersen), pp. 397–406. Ecological Studies, vol. 131. New York: Springer.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32):11254–11258.

Shao, K., Gao, G., Chi, K., Qin B., Tang, X., Yao, Y. & Daí, J. (2013) Decomposition of *Microcystis* blooms: Implications for the structure of the sediment bacterial community, as assessed by a mesocosm experiment in Lake Taihu, China. *Journal of Basic Microbiology*, 53 (6): 549-554.

Stets, E. G. & Cotner, J. B. (2008) The influence of dissolved organic carbon on bacterial phosphorus uptake and bacteria–phytoplankton dynamics in two Minnesota lakes. *Limnology and Oceanography*, 53(1): 137–147.

Smith, V H. (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10 (2): 126-139.

Smith, V H., Joye, S. B. & Robert, W. (2006) Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 51(1, parte 2): 351–355.

Smith, V. W., & Schindler, D. W. (2009) Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, 24: (4) 201-207.

Soares, M. C. S., Huszar, V. L. M., Miranda, M. N., Mello, M. M., Roland, F. & Lurling M. (2012) Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*, 717:1–12.

Sommer, U., Sommer, F., Santer, B., Jamieson, C., Boersma, M., Becker C. & Hansen, T. (2001) Complementary impact of copepods and cladocerans on phytoplankton. *Ecology Letters*, 4(6):545-550.

Souchu, P., Bec B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos, Y. & Vaquer, A. (2010) Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an

anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 67: 743-753.

Souza, J. A. & Davide, A. C. (2001) Deposição de serapilheira e nutrientes em uma mata não minerada e em plantações de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e de eucalipto (*Eucalyptus saligna*) em áreas de mineração de bauxita. *Cerne*, 7(1): 101-113.

Souza, M. F. L., Kjerfve, B., Knoppers, B., Souza, W. F. L. & Damasceno, R. N. (2003) Nutrient budgets and trophic state in a hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57: 843-858.

Staehr, P. A. & Sand-Jensen, K. (2007) Temporal dynamics and regulation of lake metabolism. *Limnology and Oceanography*, 52(1): 108–120.

Staehr, P. A., Bade, D., Van de Bogert, M. C. Koch, G. R. Williamson, C., Hanson, P. Cole, J. J. & Kratz, T. (2010) Lake metabolism and the diel oxygen technique: State of the science. *Limnology and Oceanography Methods*, 8: 628–644.

Staehr, P. A., Sand-Jensen, K. Raun, A. L., Nilsson, B., & Kidmosec, J. (2010) Drivers of metabolism and net heterotrophy in contrasting lakes. *Limnology and Oceanography*, 55(2): 817–830.

Staehr, P. A., Testa, J. M., Kemp, W. M., Cole, J. J., Sand-Jensen, K. & Smith, S. V. (2012) The metabolism of aquatic ecosystems: history, applications, and future challenges. *Aquatic Sciences*, 74:15–29.

Struijk, L. F. & Kroeze, C. (2010) Future trends in nutrient export to the coastal waters of South America: Implications for occurrence of eutrophication. *Global Biogeochemical Cycles*, 24: 1-14.

Suhett, A. L., Amado, A. M., Bozelli, R. L., Esteves, F. A. & Farjalla, V. F. (2006) O papel da foto-degradação do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 10(2): 186-204.

Suzuki, M. S., Ovalle, A. R. C. & Pereira, E. A. (1998) Effects of sand bar openings on some limnological variables in a hypertrophic tropical coastal lagoon of Brazil. *Hydrobiologia*, 368: 111–122.

Suzuki, M. S., Figueiredo, R. O., Castro, S. C., Silva, C. F., Pereira, E. A., Silva, J. A. & Aragon, G. T. (2002) Sand bar opening in a coastal lagoon (Iquipari) in the northern region of Rio de Janeiro state: hydrological and hydrochemical changes. *Brazilian Journal of Biology*, 62(1): 51-62.

- Tank, J. L., Rosi-Marshall, E. J., Griffiths, N. A., Entekin, S. A. & Stephen, M. L. (2010) A review of allochthonous organic matter dynamics and metabolism in streams. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1):118–146.
- Tao, X. (2011) Phytoplankton biodiversity survey and environmental evaluation in Jia Lize in Kunming City. *Procedia Environmental Sciences*, 10(Part C): 2336 – 2341.
- Tcherkez, G., Schäufele, R., Nogués, S., PIEL, C., Boom, A., Lanigan, G., Barbaroux, C., Mata, A., Elhani, S., Hemming, D., Maguas, C., Franzw, D. Y., Griffiths, H., Schnyder, H. & Ghashghaie, J. (2010) On the ¹³C/¹²C isotopic signal of day and night respiration at the mesocosm level. *Plant, Cell and Environment*, 33: 900–913.
- Trochine, C., Guerrieri, M. E., Liboriussen, L., Lauridsen, T. L. & Jeppesen, E. (2014) Effects of nutrient loading, temperature regime and grazing pressure on nutrient limitation of periphyton in experimental ponds. *Freshwater Biology*, 59(5): 905-917.
- Tundisi, J. G. (2008) Water resources in the future: problems and solutions. *Estudos Avançados*, 22(63): 7-16.
- Tuttle, C. L., Zhang, L. & Mitsch, W. J. (2008) Aquatic metabolism as an indicator of the ecological effects of hydrologic pulsing in flow-through wetlands. *Ecological Indicators*, 8 (6): 795.
- Uehlinger, V. (1964). Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences Soc. De Phys. Et d'Hist. nat. de Genève*, 17(2): 121-123.
- UNESCO (1991) Manual on marine experimental ecosystems. Paris: UNESCO Technical papers in marine science. 61 e 178 pp.
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton metodik. *Mitt Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlu*, 9: 1-38.
- Vadeboncoeur, Y. & Steinman, A. D. (2002) Periphyton Function in Lake Ecosystems. Review Article. *The Scientific World Journal*, 2: 1449–1468.
- Vadeboncoeur, Y., Jeppesen, E., Vander Zanden, M.J., Schierup, H.-H., Christoffersen, K. & Lodge, D.M. (2003) From Greenland to green lakes: Cultural eutrophication and the loss of benthic pathways in lakes. *Limnology and Oceanography*, 48: 1408-1418.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J. & Melillo, J. M. (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277: 494-499.
- Vollenweider, R. A. (1974) A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP, Handbook n° 12, 213 p.

Vollenweider, R. A. & Kerekes J. (1982) Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control. Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris. 156p.

Wang, Y. C. & Lu, K. H. (2004) Harmful and control developments of “water-bloom”. *Chinese Journal of Fisheries*, 17(1): 90–94.

Watts, M. C. & Grant, R. B (2001) Modelling and the monitoring of mesocosm experiments: two case studies. *Journal of Plankton Research*, 23 (10):1081-1093.

Westlake, D. F. (1963) Comparisons of plant productivity. *Biological Reviews*, 38(3): 385-425.

Wetzel, R. G. & Likens, G. E., (1979). Limnological analysis. Philadelphia. W. B. Saunders company, 357p.

Wetzel, R. G. (1984) Detrital dissolved and particulate organic carbon functions in aquatic ecosystems. *Bulletin of Marine Science*, 35(3): 503-509.

WHO (2002) Eutrophication and health. European Commission Eutrophication and health Luxembourg, p. 1 - 28. Office for Official Publications of the European Communities.

Wieland, A. & Kuhl, M. (2000) Irradiance and temperature regulation of oxygenic photosynthesis and O₂ consumption in a hypersaline cyanobacterial mat (Solar Lake, Egypt). *Marine Biology*, 137:71–85.

Williams, P. J. le B. & del Giorgio, P. A. (2005) Respiration in aquatic ecosystems: history and background, in: Respiration in aquatic ecosystems. Oxford University Press, New York, pp. 1–17.

Wilkinson, G. M., Pace, M. L. & Cole, J. J. (2013) Terrestrial dominance of organic matter in north temperate lakes. *Global Biogeochemical Cycles*, 27: 43–51.

Winder, M. & Cloern, J. E. (2010) The annual cycles of phytoplankton biomass. *Philosophical Transactions B. The Royal Society*, 365: 3215–3226.

Withers, P. J. A., Neal, C., Jarvie, H. P. & Doody, D. G. (2014) Agriculture and Eutrophication: Where Do We Go from Here? *Sustainability*, 6(9): 5853-5875.

Xu, H., Paerl, H. W., Qin, B., Zhu, G. & Gao, G. (2010) Nitrogen and phosphorus inputs control phytoplankton growth in eutrophic Lake Taihu, China. *Limnology and Oceanography*, 55(1): 420–432.

Xu, Z-H, Guo, Z-R, Xu, X., Huang, D-J., Sun, X-X, Jiang, L-M. & Yang, J-F. (2014) The impact of nutrient enrichment on the phytoplankton and bacterioplankton community during a mesocosm experiment in Nan'ao of Daya Bay. *Marine Biology Research*, 10 (4): 374-382.

Yacobi, Y. Z., Perel, N., Barkan, E. & Luz, B. (2007) Unexpected underestimation of primary productivity by O-18 and C-14 methods in a lake: Implications for slow diffusion of isotope tracers in and out of cells. *Limnology and Oceanography*, 52(1):329–337.

Zeebe, R. E. & Wolf-Gladrow, D. (2001) CO₂ in seawater: equilibrium, kinetics, isotopes. Elsevier.

Zhang, X., Mei, X., Gulati, R. D. & Liu, Z. (2015) Effects of N and P enrichment on competition between phytoplankton and benthic algae in shallow lakes: a mesocosm study. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6): 4418-4424.

Zhu, W., Wan, L. & Zhao, L. (2010) Effect of nutrient level on phytoplankton community structure in different water bodies. *Journal of Environmental Sciences*, 22(1): 32–39.

Anexos

Anexo 1. Biovolume das principais espécies no 4° e 10° dias de experimento e na água da lagoa, Ct0 no Ponto 1.

Classe	Ponto 1	1° dia	4° dia				10° dia			
	Biovolume (μm^3)	Ct0	Controle	N	P	NP	Controle	N	P	NP
Cyanophyceae	<i>Limnothrix sp.</i>	16.399,3	29.686,1	44.979,0	42.890,4	67.712,1	4.938,9	29.944,8	9.410,5	18.758,9
Cyanophyceae	<i>Anabaenopsis elenkini f. circularis</i>	6.552,9	10.143,7	11.665,5						
Cyanophyceae	<i>Synechocystis aquatilis</i>	429,2	211,0	923,3	134,9		775,0	777,1	1.105,1	2.391,6
Cyanophyceae	<i>Merismopedia punctata</i>					427,0				
Cyanophyceae	<i>Epigloeosphaera brasílica</i>					249,8	7.897,4	1.809,2		1.018,2
Cyanophyceae	<i>Aphanocapsa sp.</i>	226,2								
Cyanophyceae	<i>Oscillatoria limosa</i>						2.602,8		1.893,7	
Cyanophyceae	<i>Microcystis aeruginosa</i>							16.941,2	4.595,6	589,7
Cryptophyceae	<i>Cryptomonas marssonii</i>			3.893,8		1.187,1			2.743,6	345,1
Bacillariophyceae	<i>Melosira varians</i>			228,9			1.864,7	2.149,8		
Bacillariophyceae	Bacillariophyceae sp. 1		29,3		320,2		134,0	2,0		
Bacillariophyceae	Bacillariophyceae sp. 2	1.042,3								
Bacillariophyceae	Bacillariophyceae sp. 3		1.124,9	988,9	281,4		651,5	344,7	207,5	
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros sp.</i>				595,2	805,8				
Chlorophyceae	<i>Chlorella sp.</i>				92,0	249,9				

Anexo 3. Concentração média dos nutrientes dissolvidos e particulados em μM , no Ponto 1.

<i>Ponto 1</i>	N-amoniacal	Nitrato	Nitrito	Ortofosfato	P-total dissolvido	Sílica	C-particulado	N-particulado	P-particulado
Controle - 1° dia	0,3	0,9	0,0	1,2	1,7	57	903	128	*
N - 1° dia	55	1,4	0,0	1,2	1,7	57	903	128	*
P - 1° dia	0,3	0,9	0,0	3,7	4,7	57	903	128	*
NP -1° dia	55	1,4	0,0	3,7	4,7	57	903	128	*
Controle - 2° dia	0,7	0,9	0,0	1,3	1,8	36	1181	152	3,3
N - 2° dia	10	38	0,2	0,9	1,8	37	1612	202	2,5
P - 2° dia	0,4	1,8	0,2	1,4	1,4	23	1045	143	3,4
NP - 2° dia	0,8	28	0,2	1,7	1,9	26	1319	151	3,6
Controle - 4° dia	1,0	4,1	0,0	1,1	1,2	38	3773	87	3,1
N - 4° dia	6,6	37	0,4	1,2	1,3	32	1169	161	1,9
P - 4° dia	0,5	10	0,4	0,8	1,7	24	1684	212	5,5
NP - 4° dia	0,6	23	0,3	1,3	1,6	34	1002	134	3,8
Controle - 6° dia	1,3	3,2	0,2	0,9	0,9	17	1068	120	2,8
N - 6° dia	4,9	26	0,5	1,1	1,3	15	7185	120	2,1
P - 6° dia	0,6	2,1	0,2	0,7	1,1	14	1238	162	2,2
NP - 6° dia	2,2	8,4	0,4	0,7	1,1	21	918	112	3,4
Controle - 8° dia	2,1	1,4	0,2	0,8	1,0	7	984	139	2,5
N -8° dia	2,3	27	0,7	0,5	0,9	4	1141	134	4,6
P - 8° dia	0,7	1,2	0,0	0,8	1,5	5	7104	120	3,5
NP -8° dia	1,1	7,7	1,0	1,4	1,4	28	1289	186	4,0
Controle - 10° dia	2,8	1,8	0,2	0,5	0,6	1	1395	182	3,0
N -10° dia	1,5	14	0,8	0,7	1,3	1	1693	218	1,7
P - 10° dia	0,5	2,0	0,0	0,5	1,8	2	1676	196	3,0
NP -10° dia	2,0	16	1,1	0,8	1,4	14	6905	116	2,9

Legenda: * = não realizada a análise devido a problemas operacionais.

Anexo 4. Concentração média dos nutrientes dissolvidos e particulados em μM , no Ponto 2. *Legenda: * = não realizada a análise devido a problemas operacionais.*

<i>Ponto 2</i>	N-amoniacoal	Nitrato	Nitrito	Ortofosfato	P-total dissolvido	Sílica	C-particulado	N-particulado	P- particulado
Controle - 1° dia	12	2,9	0,4	2,3	2,2	108	190	16	*
N - 1° dia	137	20	0,4	2,3	2,2	108	190	16	*
P - 1° dia	12	2,9	0,4	29	30	108	190	16	*
NP - 1° dia	137	20	0,4	29	30	108	190	16	*
Controle - 2° dia	0,6	1,4	0,2	1,6	1,8	99	240	23	1,5
N - 2° dia	36	58	0,3	1,7	1,8	113	250	19	1,6
P - 2° dia	0,7	3,5	0,3	13	29	112	174	17	2,1
NP - 2° dia	21	90	0,3	14	28	122	125	14	3,5
Controle - 4° dia	0,7	4,0	0,2	1,7	1,8	59	85	10	1,6
N - 4° dia	5,7	28	0,3	1,2	1,3	65	306	39	1,2
P - 4° dia	0,8	2,7	0,3	11	22	65	196	22	0,9
NP - 4° dia	2,3	28	0,4	11	23	91	269	38	3,0
Controle - 6° dia	0,1	1,3	0,0	1,1	1,0	75	272	32	1,1
N - 6° dia	1,8	55	0,3	1,0	1,0	83	170	21	1,3
P - 6° dia	0,2	2,5	0,2	11	19	83	267	21	1,9
NP - 6° dia	1,0	36	0,6	9	17	77	311	22	2,8
Controle - 8° dia	0,3	0,9	0,2	0,9	0,6	68	159	16	2,0
N - 8° dia	1,1	20	0,3	0,8	0,5	61	134	12	0,8
P - 8° dia	0,1	0,7	0,2	10	17	66	61	8	1,3
NP - 8° dia	0,2	4,4	0,4	4,4	3,6	41	278	34	1,5
Controle - 10° dia	0,7	1,1	0,2	0,7	1,3	55	634	84	1,7
N - 10° dia	1,6	30	0,3	0,5	1,2	44	439	57	0,7
P - 10° dia	0,7	1,0	0,2	9,5	19	72	327	43	0,9
NP - 10° dia	0,3	1,9	0,2	2,8	3,5	14	143	20	0,8

