

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

Especificidade em associações alga/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados por três espécies fitoplanctônicas de um reservatório tropical eutrófico do estado de São Paulo (Barra Bonita).

DANILO GIROLDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Campo de pesquisa: Fisiologia e Bioquímica dos Microorganismos).

SÃO CARLOS - SP

2003

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

G526ea

Giroldo, Danilo.

Especificidade em associações alga/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados por três espécies fitoplanctônicas de um reservatório tropical eutrófico do estado de São Paulo / Danilo Giroldo . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

152 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Fitoplâncton. 2. Carboidratos. 3. Bactéria. 4.

Polissacarídeo excretados. I. Título.

CDD: 589.4 (20ª)

Orientador: Armando Augusto Henriques Vieira

Tente outra vez
(Raul Seixas, Paulo Coelho e M. Motta)

Veja,
E não diga que a canção está perdida,
Tenha fé em Deus, tenha fé na vida,
Tente outra vez,
Beba,
Pois a água viva ainda está na fonte,
Você tem dois pés para cruzar a ponte,
Nada acabou,
Tente,
Levante a sua mão sedenta e recomece a andar,
não pense que a cabeça agüenta se você parar,
Há uma voz que canta, há uma voz dança, há uma voz que
gira,
Bailando no ar,
Queira,
Basta ser sincero e desejar profundo,
Você será capaz de sacudir o mundo,
Tente outra vez,
Tente,
E não diga que a vitória está perdida,
Se é de batalhas que se vive a vida,
Tente outra vez.

Uma das grandes mensagens deixadas pelo nosso Raul Seixas.

Dedico esta tese a toda a minha família, desde os de maior convivência, até os que, mesmo à distância, sempre incentivaram, contribuíram e moldaram a minha formação, em especial, Ana (minha mãe), Olympio (meu pai), Samantha (minha esposa) e meus irmãos, Silvia e Ramiro.

AGRADECIMENTOS

- ✧ Ao Prof. Dr. Armando Vieira, pela orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho, além dos inúmeros ensinamentos em Ficologia durante estes 10 anos de convivência,
- ✧ À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN), pelo apoio e formação acadêmica, crítica, cultural, social e política,
- ✧ Ao pessoal da secretaria do PPG-ERN, em especial João, Du, Roseli, Renata e Graça, pela amizade e facilidades nos momentos mais críticos,
- ✧ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na realização deste projeto, esperando delas mais pressão sobre os governos para garantir a formação de pesquisadores de qualidade no Brasil,
- ✧ Aos companheiros de laboratório: Luis, Sandra, Vanessa, Zezé, Sebastião, Mic, Caverna, Ghandi, Thaís, Cristina, Ana Lombardi, Mariana e Maria, pelo apoio, amizade e convivência durante todos estes anos,
- ✧ Ao Pedro, pelo imprescindível apoio no desgastante experimento de cultivo conjunto alga/bactéria, e por proporcionar minha primeira experiência indireta em orientação,
- ✧ Ao Rafael e Rogério, pela amizade e pelas análises no TOC,
- ✧ Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini e à Marcela pelo auxílio com as equações matemáticas e pelas produtivas discussões,
- ✧ À Profa. Dra. Berit S. Paulsen, pelos inúmeros ensinamentos e pela oportunidade de realização do estágio na Noruega, proporcionando um inesquecível e agradável período da minha vida,
- ✧ Aos meus companheiros do Laboratório de Farmacognosia do Instituto de Farmácia, Universidade de Oslo, Noruega: Cecilie, Sanya, Kari, Tuva, Torun, Ellen, Hilde, Anne Berit, Karl, Jen, e outros que contribuíram demais para minha formação científica e cultural,
- ✧ Ao Finn, Instituto de Farmácia, Universidade de Oslo, Noruega, pelas análises e ensinamentos sobre espectrometria de massa de polissacarídeos.
- ✧ Ao Prof. Dr. Mozetto e ao Raul pela cessão da água Mili-Q durante grande parte do trabalho,

- ✧ À Profa. Dra. Mariângela Menezes, do Museu Nacional do Rio de Janeiro, e à Dra. Lezilda Torgan, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pelos valiosos trabalhos em colaboração e pela identificação, respectivamente, de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* e *Thalassiosira* sp, (prestes a ser confirmada como *Thalassiosira vierai*),
- ✧ Ao Gunther e a todo o pessoal do Laboratório de Processos Biológicos da USP/São Carlos, pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar as análises de DGGE,
- ✧ Ao Teó, Nivaldo Nale e Denise de Freitas, pelo acompanhamento no difícil e enobecedor objetivo de transpor os conhecimentos ecológicos e ficológicos para o público em geral, elaborando os livros populares “Viajando pela Lagoa do Campo”,
- ✧ Ao pessoal do GAPG (Grupo Ambiental da Pós-Graduação), em especial ao Bixo, Samantha, Toppa e Andréia, pela oportunidade de atuação nos problemas ambientais da UFSCar, mesmo que contra a vontade da administração, muitas vezes cega às atitudes mais óbvias,
- ✧ À Associação dos Pós-Graduandos da UFSCar, em especial ao Túlio, Robson, Vidal e Samantha, que aceitaram o desafio de representar esta heterogênea categoria universitária, os pós-graduandos, e proporcionaram a mim um inestimável aprendizado político,
- ✧ Aos meus grandes amigos de São Carlos, de agora e do passado, presentes nas festas, bares, torneios, esportes, congressos, reuniões, no dia-a-dia e que fizeram desta cidade um lugar muito especial para mim, e tenho certeza, para todos nós,
- ✧ À Edenir, pelo cuidado, dedicação e esforço imprescindíveis no dia-a-dia,
- ✧ Aos meus bichinhos: Trotsky, Carvão, Shiva, Sapeca, Bacco e Lenin, pela amizade carinhosa e companheirismo,
- ✧ Aos meus pais, meus irmãos e toda a minha família: primos, primas, tios, tias, avôs e avós pelo apoio, confiança e incentivo durante toda a minha vida,
- ✧ Um agradecimento especial à Samantha por toda a dedicação, amor, companhia e compreensão que sempre houve e sempre vai haver entre nós.

SUMÁRIO

A) LISTA DE FIGURAS	10
B) LISTA DE TABELAS	16
C) RESUMO	20
D) ABSTRACT	21
1) INTRODUÇÃO	22
2) OBJETIVOS	26
3) METODOLOGIA	28
3.1) Área de estudo	28
3.2) Organismos	28
3.3) Cultivo das espécies fitoplanctônicas	31
3.4) Experimento I Caracterização dos carboidratos extracelulares e determinação dos parâmetros de crescimento das espécies fitoplanctônicas	32
3.4.1) Caracterização dos carboidratos extracelulares por HPLC-PAD	33
3.4.2) Caracterização dos exopolissacarídeos	35
3.4.2.1) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose	35
3.4.2.2) Determinação da composição monomérica das subfrações	36
3.4.2.3) Determinação das ligações glicosídicas	36
3.5) Experimento II: Cultivos conjuntos alga/bactéria	37
3.5.1) Análise dos padrões de diversidade bacteriana pertencente ao Domínio <u>Bactéria</u>	39
3.5.1.1) Protocolo de extração de DNA	40
3.5.1.2) Reação de Amplificação	40
3.5.1.3) "Primers" do Domínio Bacteria usados no PCR	41
3.5.1.4) Programa usado no PCR para os "primers" (Domínio <u>Bactéria</u>)	42
3.5.1.5) Método do DGGE	42
3.5.1.6) Análise dos Géis do DGGE	42
3.6) Experimento III: Testes de especificidade	43
3.6.1) Meio de cultura elaborado com excretados de baixa massa molecular	43
3.6.2) Meio de cultura elaborado com exopolissacarídeos	43
3.6.3) Obtenção dos excretados de baixa massa molecular	43
3.6.4) Obtenção dos exopolissacarídeos	44
3.6.5) Experimentação	44

3.6.6) Parametrização matemática da degradação dos polissacarídeos	46
3.6.6.1) Reação monomolecular irreversível de primeira ordem	46
4) RESULTADOS	47
4.1) Experimento I	47
4.1.1) Crescimento das espécies fitoplanctônicas	47
4.1.2) Excreção de carboidratos	50
4.1.2.1) Carboidratos extracelulares totais	50
4.1.2.2) Cromatografia em coluna de gel P-10	52
4.1.2.3) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados	54
4.1.2.4) Caracterização dos polissacarídeos	60
4.1.2.4.1) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose	60
4.1.2.4.2) Análise da composição das frações dos polissacarídeos	61
4.1.2.4.3) Análise das ligações glicosídicas	63
4.2) Experimento II	70
4.2.1) Cultivos conjuntos alga/bactéria	70
4.2.1.1) Crescimento das espécies fitoplanctônicas	70
4.2.1.2) Excreção de carboidratos	76
4.2.1.3) Crescimento das populações de bactérias	90
4.3) Experimento III	98
4.3.1) Testes de especificidade	98
4.3.1.1) Degradação dos polissacarídeos	98
4.3.1.1.1) Cromatografia em coluna de gel	98
4.3.1.1.2) Análise por HPLC-PAD	105
4.3.1.1.2.1) <i>Cryptomonas tetrapyrenoidosa</i>	105
4.3.1.1.2.2) <i>Staurastrum orbiculare</i>	115
4.3.1.1.2.3) <i>Thalassiosira</i> sp.	125
4.4) Análise dos padrões de diversidade bacteriana	134
4.4.1) Amplificação do DNA da comunidade pertencente ao Domínio <i>Bacteria</i>	134
4.4.2) Análise dos padrões de diversidade bacteriana entre os diferentes substratos	134
5) DISCUSSÃO	140
6) CONCLUSÕES	147
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

A) LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da área de estudo de onde foram coletadas as espécies fitoplanctônicas e a comunidade bacteriana. Fonte (Calijuri 1999). 29

Figura 2: Algas fitoplanctônicas, oriundas do Reservatório de Barra Bonita, envolvidas neste trabalho. (A) *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, aumento de 1000 X, (B) *C. tetrapyrenoidosa*, aumento de 1000 X, foto em preto e branco com filtro verde, (C) e (D) *C. tetrapyrenoidosa*, micrografias em microscopia eletrônica de transmissão, as barras correspondem respectivamente a 3 e 1 μ m (foto: Dra. Mariângela Menezes), (E) *Staurastrum orbiculare*, aumento de 1000 X, (F) *Thalassiosira* sp, aumento de 1000 X, (G) e (H) *Thalassiosira* sp, micrografias em microscopia eletrônica de varredura, as barras correspondem respectivamente a 5 e 1 μ m (foto: Dra. Lezilda Torgan) (Cl) Cloroplasto, (Ml) Camada mucilaginosa, (Nm) Nucleomorfo, (Pe) Periplasto, (Pl) Plasmalema, (Py) Pirenóide. 30

Figura 3: Sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do Reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo da comunidade microbiana. O sistema é lavado com HCl 10% e autoclavado. A entrada de água permanece tampada e é manuseada apenas dentro da represa para evitar contaminação por bactérias aéreas. A água entra na garrafa quando se abre a saída de ar em cada uma das profundidades-alvo. Um filtro feito com algodão na mangueira de ar evita a queda de partículas aéreas no interior da garrafa. 31

Figura 4: Esquematização do experimento I. Caracterização dos parâmetros de crescimento e dos carboidratos extracelulares produzidos em condições axênicas por *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp. 33

Figura 5: Esquematização do experimento II. Cultivos conjuntos alga/bactéria de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp. 39

Figura 6: Esquematização do experimento III. Testes de especificidade em função do tipo de substrato oferecido às populações bacterianas específicas, selecionadas no experimento anterior. 46

Figura 7: Densidade celular de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira* sp (C) em função do tempo de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão. 49

Figura 8: Concentração de clorofila-a de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira* sp (C) em função do tempo de cultivo. 50

Figura 9: Taxa diária de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira* sp (C) em função do tempo de cultivo. 51

Figura 10: Cromatografia por filtração em coluna de gel Bio Rad[®] P-10 dos carboidratos liberados por *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B) e *Thalassiosira* sp (C). (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento. As setas representam os dextrans utilizados como calibração da coluna: 2×10^6 D e 10^4 D. 53

Figura 11: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *C. tetrapyrenoidosa* nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de massa molecular intermediária e (C) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento. 55

Figura 12: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *S. orbiculare* nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento. 57

Figura 13: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *Thalassiosira* sp nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de massa molecular intermediária e (C) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento. 59

Figura 14: Cromatografia em coluna de gel DEAE-Sepharose “Fast Flow” Pharmacia[®] dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp, eluídos com NaCl a 0,5 e 1,0 M. O fluxo foi de 1 mL por 3 minutos em uma coluna de 100 mL. 62

Figura 15: Curva de crescimento de duas culturas de *C. tetrapyrenoidosa*: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão (n=6). A seta indica o momento da contaminação. 71

Figura 16: Curva de crescimento de duas culturas de *S. orbiculare*: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão (n=6). A seta indica o momento da contaminação. 71

Figura 17: Curva de crescimento de duas culturas de *Thalassiosira* sp: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão n=6. A seta indica o momento da contaminação. 73

Figura 18: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de cultivo. 74

Figura 19: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*, em função do tempo de cultivo. 75

Figura 20: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo. 75

Figura 21: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 79

Figura 22: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *S. orbiculare*. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 80

Figura 23: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *Thalassiosira* sp. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 80

Figura 24: Variação da concentração, após a contaminação, dos carboidratos totais do grupo T₁ (fucose + ramnose + galactose) de *Thalassiosira* sp axênica e contaminada em relação ao tempo. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 83

Figura 25: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos totais do grupo T₂ (glicose + man/xil) de *Thalassiosira* sp axênica e contaminada em relação ao tempo. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 84

Figura 26: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 85

Figura 27: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *S. orbiculare* em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 87

Figura 28: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *Thalassiosira* sp em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias. 88

Figura 29: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres excretados por *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda aos carboidratos totais. 93

Figura 30: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres excretados por *Staurastrum orbiculare*, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda aos carboidratos totais. 95

Figura 31: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda refere-se aos carboidratos totais. 97

Figura 32: Variação da densidade bacteriana (escala da esquerda) em relação ao consumo dos carboidratos totais tipo 1 (fucose, ramnose e galactose) e 2 (glicose e manose/xilose), mostrados na escala da direita, de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo. 98

Figura 33: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 100

Figura 34: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 101

Figura 35: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 102

Figura 36: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 103

Figura 37: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 104

Figura 38: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min. 105

- Figura 39:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida pelo gel CL6B. 109
- Figura 40:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel CL6B. 110
- Figura 41:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15. 113
- Figura 42:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15. 114
- Figura 43:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “C” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15. 115
- Figura 44:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel CL6B. 119
- Figura 45:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel CL6B. 120
- Figura 46:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel A-15. 123
- Figura 47:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel A-15. 124
- Figura 48:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel CL6B. 128
- Figura 49:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel CL6B. 129
- Figura 50:** Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel A-15. 132

Figura 51: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel A-15. 133

Figura 52: Imagem negativa do gel de agarose 1% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio *Bactéria*. As setas mostram o tamanho do fragmento de DNA amplificado pelos “primers” utilizados (400 pares de bases). **1:** bacterioplâncton da represa de Barra Bonita (inóculo); **2; 3 e 4:** bactérias desenvolvidas respectivamente na cultura de *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp; **5:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **6:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **7:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **8:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **9:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **10:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **11:** amostra 8 diluída 1:10 vezes; **12:** amostra 9 diluída 1:10 vezes; **13:** amostra 10 diluída 1:10 vezes; **14:** Água destilada; **15:** Controle positivo *Burkeria* sp; **16, 17 e 18:** Controles negativos *Sarcina* sp. 137

Figura 53: Imagem negativa do gel de agarose 1% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio *Bactéria*. **1:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **2:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **3:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **4:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado **5:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado; **6:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado; **7:** Controle positivo - *Burkeria* sp. 138

Figura 54: Imagem negativa mostrando o padrão de bandas obtido por meio do DGGE para os produtos amplificados pelo PCR. **1:** inóculo de Barra Bonita; **2; 3 e 4:** bactérias desenvolvidas respectivamente nas culturas de *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp; **5:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **6:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **7:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **8:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **9:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **10:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos. **Setas 1:** Bactérias específicas a algum dos substratos. **Setas 2:** Bactérias capazes de degradar diferentes tipos de substrato. **Setas 3:** Bactérias que se desenvolveram melhor com a presença das algas. **Setas 4:** Bactérias que se desenvolveram melhor sem a presença das algas. 139

B) LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração final dos reagentes utilizados para execução do PCR do Domínio *Bacteria*. 41

Tabela 2: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A), de massa molecular intermediária (B) e dos monossacarídeos livres (C) excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em diferentes fases de crescimento. 56

Tabela 3: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A) e dos monossacarídeos livres (B) excretados por *S. orbiculare* em diferentes fases de crescimento. 58

Tabela 4: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A), de massa molecular intermediária (B) e dos monossacarídeos livres (C) excretados por *Thalassiosira* sp em diferentes fases de crescimento. 60

Tabela 5: Composição das frações separadas pela cromatografia de troca iônica após metanólise e análise em cromatografia gasosa. **C** – *C. tetrapyrenoidosa*, **S** – *S. orbiculare* e **T** – *Thalassiosira* sp. **0,5M** – Fração eluída com NaCl a 0,5 M e **1,0M** – Fração eluída com NaCl a 1,0 M. 63

Tabela 6: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS das frações eluídas com NaCl a 0,5 (C 0,5M) e 1,0 M (C 1,0M) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (% M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração (% T). 65

Tabela 7: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS da fração eluídas com NaCl a 0,5 (S 0,5M) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (%M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração. 67

Tabela 8: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS das frações eluídas com NaCl a 0,5 (T 0,5M) e 1,0 M (T 1,0M) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (%M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração (%T). 69

Tabela 9: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *C. tetrapyrenoidosa*: axênica e contaminada. 72

Tabela 10: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *S. orbiculare*: axênica e contaminada. 72

Tabela 11: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *Thalassiosira* sp: axênica e contaminada. 73

Tabela 12: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 76

Tabela 13: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 77

Tabela 14: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 77

Tabela 15: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 78

Tabela 16: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 78

Tabela 17: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 79

Tabela 18: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 81

Tabela 19: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 81

Tabela 20: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 82

Tabela 21: Variação, após o quinto dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 85

Tabela 22: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 86

Tabela 23: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão. 86

Tabela 24: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 87

Tabela 25: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 87

Tabela 26: Comparação estatística entre as concentrações de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão. 88

Tabela 27: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 89

Tabela 28: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 89

Tabela 29: Comparação estatística entre as concentrações de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão. 89

Tabela 30: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, em relação ao tempo de cultivo. 90

Tabela 31: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Staurastrum orbiculare*, em relação ao tempo de cultivo. 90

Tabela 32: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Thalassiosira* sp, em relação ao tempo de cultivo. 90

Tabela 33: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em mg/L. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 107

Tabela 34: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 108

Tabela 35: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A”, “B” e “C” dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 111

Tabela 36: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A”, “B” e “C” do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 112

Tabela 37: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* em mg/L. O erro corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 117

Tabela 38: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 118

Tabela 39: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 121

Tabela 40: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 122

Tabela 41: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp em mg/L. O erro corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 126

Tabela 42: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 127

Tabela 43: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3). 130

Tabela 44: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). 131

C) RESUMO

A excreção de carboidratos pelo fitoplâncton é um processo já bastante estudado, cujo interesse principal se deve à importância ecológica destes compostos. As bactérias planctônicas destacam-se entre os organismos heterotróficos beneficiados por este processo, e sua capacidade de utilização dos carboidratos extracelulares fitoplanctônicos já foi demonstrada por diversos trabalhos. Esta tese teve como objetivo principal a identificação de associações específicas entre algas e bactérias do plâncton de um reservatório eutrofizado do Rio Tietê (Barra Bonita, SP), vinculadas aos carboidratos excretados pelas algas, bem como estudar os padrões de utilização destes compostos pelas bactérias. Para isso foram utilizadas três espécies fitoplanctônicas isoladas deste reservatório: *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae), *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae) e *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). Culturas axênicas das três algas foram realizadas para a determinação de suas características de crescimento, bem como a caracterização dos carboidratos extracelulares por elas produzidos. Cultivos conjuntos alga/bactéria, nos quais inoculou-se a comunidade microbiana do reservatório de Barra Bonita nas culturas axênicas das algas, foram realizados para observar o padrão de utilização dos carboidratos extracelulares produzidos pelas algas, assim como o padrão de crescimento fitoplanctônico em condições axênicas e contaminadas. A partir dos cultivos conjuntos, obteve-se os inóculos microbianos específicos de cada alga e os mesmos foram utilizados nos experimentos de degradação dos polissacarídeos e dos excretados de baixa massa molecular de cada espécie. Os padrões de diversidade bacteriana da represa de Barra Bonita foram comparados aos padrões encontrados tanto nos cultivos conjuntos, como nos meios contendo os excretados de alta e baixa massa molecular, utilizando a técnica do DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”). Os resultados mostraram que a taxa de excreção de carboidratos pelas algas nas culturas axênicas aumentou exponencialmente na fase estacionária de crescimento. Já nos cultivos conjuntos, os carboidratos extracelulares produzidos pelas algas foram importantes substratos para as populações bacterianas, pois mesmo em concentrações inferiores a 1 mg/L, estes compostos sustentaram densas populações bacterianas. A utilização dos polissacarídeos foi bastante distinta entre as algas em estudo, e os resultados evidenciaram também que a degradação dos polissacarídeos não ocorreu de forma homogênea, pois determinados monossacarídeos foram degradados mais rapidamente, enquanto outros tiveram um padrão de degradação mais lento. Ficou também comprovado pelos resultados que a diversidade bacteriana associada às três algas foi distinta, com populações bacterianas de ocorrência específica a determinadas algas e outras de ocorrência bastante abrangente, desenvolvendo-se nos diversos substratos oferecidos pelas diferentes algas em estudo.

Palavras chaves: Fitoplâncton, associação, carboidrato, bactéria, polissacarídeo e especificidade.

D) ABSTRACT

The release of carbohydrates by phytoplankton has been extensively studied because of its ecological significance. Bacterioplankton is a group of organisms that is able to use extracellular phytoplanktonic carbohydrates, as many authors have demonstrated. The aim of this thesis was to identify specific associations algae/bacteria in the planktonic environment of a eutrophicated reservoir (Tiete river, Barra Bonita, SP), based on the carbohydrates released by the phytoplankton. The utilization pattern of such compounds was also studied. For this purpose, three phytoplanktonic species from Barra Bonita reservoir were used: *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae), *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae) e *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). The growth characteristics of these species in axenic conditions were determined and the extracellular carbohydrates produced by each one were characterized. Algae/bacteria cultivation experiments were performed inoculating the microbial community from Barra Bonita in axenic cultures of each algae. The phytoplanktonic growth pattern and the carbohydrate release were compared in axenic and contaminated cultures. From these algae/bacteria cultures, the specific bacteria community from each algae were isolated and they were re-inoculated in two kinds of culture media: composed by polysaccharides and low molecular weight released material. The bacterial diversity from the Barra Bonita reservoir was compared to the one observed in the algae/bacteria cultures and also in the two kinds of culture media, employing the DGGE method (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). The extracellular carbohydrate production was exponentially increased at the stationary growth phase in the axenic cultures. The results showed clearly that the extracellular carbohydrates released by the phytoplanktonic species were used as an important carbon source to the bacterial populations, even when they occurred in very low concentrations (less than 1 mg/L). The polysaccharide utilization was remarkably distinct among the species under study. The results also showed that the polysaccharide degradations were not homogenous, but specific regions of them were degraded firstly. The results proved that the bacterial diversity patterns found in the Barra Bonita reservoir and in the different substrates were different. Specific bacterial populations were found as well as populations adapted to different classis of substrates.

Key words: Phytoplankton, association, carbohydrate, bacteria, polysaccharide and specificity.

1) INTRODUÇÃO.

Os organismos fitoplanctônicos podem liberar para o meio circundante, sob a forma de matéria orgânica dissolvida (MOD), importantes quantidades de carbono orgânico derivado da fotossíntese (Lewin 1956; Guillard & Wangersky 1958, Jensen 1983; Mykkestad 1995). Compõe essa MOD uma grande variedade de compostos, mas os mais importantes, sob o aspecto quantitativo, incluem ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos e, principalmente, carboidratos (Hellebust 1974). A utilização de alguns destes compostos como substrato por populações bacterianas já é bem documentada (Coveney 1982; Larsson & Hagström 1979; Fallowfield & Daft 1988), como no caso dos ácidos orgânicos (Merret & Lord 1973 e Wright & Shah 1975), aminoácidos (Fallowfield & Daft 1988; Jørgensen 1990; Riemann *et al.* 1990) e monossacarídeos (Gocke *et al.* 1981; Jørgensen 1990; Jørgensen & Jensen 1994), enquanto a utilização de polissacarídeos extracelulares produzidos por microalgas como substrato para bactérias do plâncton é ainda muito pouco estudada (Freire-Nordi & Vieira 1996).

A diversidade na composição da MOD liberada pelas algas implica, teoricamente, na seleção de bactérias que poderiam associar-se especificamente aos produtos de determinadas espécies algais. De fato, indícios de especificidade alga/bactéria vinculada à MOD excretada foram já obtidos no fitoplâncton marinho, principalmente em diatomáceas (Bell & Mitchell 1972; Bell & Sakshaug 1980) e cianofíceas de água doce (Fallowfield & Daft 1988); mas não foram feitos estudos posteriores para verificar quão ampla é essa especificidade em relação a outros taxa de microalgas, principalmente de água doce. Além disso, nestes casos não ficou definitivamente comprovado se a especificidade seria apenas passiva, ou seja, se a população bacteriana simplesmente seria selecionada pela composição da MOD liberada pelas espécies algais e, em consequência, estas não obteriam uma ação

recíproca nutricional, ou de qualquer outra natureza, advinda das bactérias. Contudo, se tal ação ocorrer, os mecanismos pelos quais o fitoplâncton seria beneficiado nessa associação não estão ainda bem esclarecidos, se é que realmente pode ocorrer algum benefício generalizado para todos os taxa de microalgas. Também não está esclarecido se uma associação alga/bactéria seria restrita a uma determinada fase do ciclo biológico da alga ou se diferentes populações de bactérias se sucederiam nessa associação nas diferentes fases do ciclo, como fase exponencial, estacionária e de senescência do desenvolvimento de população algal.

Um exemplo de uma associação mais estreita, na qual ambos os organismos tiram proveito, é o caso de bactérias que se fixam a heterocistos de espécies de *Anabaena* e utilizam substâncias ricas em compostos nitrogenados excretadas pela alga. O metabolismo das bactérias, em reciprocidade, provoca redução localizada de oxigênio, o que incrementa a função da nitrogenase nos heterocistos, capacitando a cianofíceas a fixar nitrogênio atmosférico, mesmo em ambientes com altas concentrações de oxigênio (Paerl 1978).

A excreção de MOD pelo fitoplâncton promove a abertura de novos nichos para microorganismos heterótrofos, criando uma zona influenciada pela liberação desses compostos denominada “ficosfera” (Bell & Mitchell 1972). Essa região poderia facilitar a associação de microorganismos que utilizariam a MOD excretada e incrementaria as relações interespecíficas na comunidade planctônica, de modo semelhante às relações entre plantas leguminosas e bactérias fixadoras da “rizosfera” terrestre. Mas o mais interessante, sob o ponto de vista da biodiversidade funcional, é a possibilidade da ocorrência de uma relação interespecífica alga/bactéria, vinculada à composição do excretado da alga. Ou seja, o metabolismo dessas bactérias seria direcionado para os excretados de uma determinada espécie de alga do plâncton, ou grupo de espécies e, por

outro lado, a alga obteria algum proveito dessa associação. Isso abre interessantes discussões teóricas: Wood & Van Valen (1990) propuseram teoricamente que, na coluna fótica marinha, quando as células fitoplanctônicas estão sob limitação nutricional e temporariamente expostas a altas intensidades de luz, sua excreção aumentaria, principalmente em carboidratos, o que suportaria a manutenção de uma população bacteriana. Os autores consideram que este comportamento seria um importante fator na coevolução de algas autotróficas, bactérias e fitoflagelados bacterívoros por “patch selection” no ambiente marinho. Ou seja, um mecanismo baseado, teoricamente, na excreção de carboidratos.

Os carboidratos são os compostos que, de um modo geral, predominam nos excretados algais, considerados ubíquos nesses organismos (Boney 1981). De fato, os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos, são compostos liberados por quase todas as microalgas, planctônicas ou não (Paulsen & Vieira 1994). Eles formam as bainhas e cápsulas, as quais podem ser bem delineadas, rígidas e bem estáveis, ou amorfas que vão continuamente se dissolvendo durante o desenvolvimento da célula. Frequentemente, observa-se a presença de bactérias nessas cápsulas e bainhas, ou associadas a “pedaços” de polissacarídeos liberados por essas estruturas para o ambiente. Essas bactérias poderiam utilizar, como substrato, os excretados algais de baixa e alta massa molecular, incluindo os carboidratos, simples ou complexos. Os carboidratos componentes dessas estruturas teriam importante papel não só como fonte de carbono para as bactérias, mas também como suporte mecânico, no caso de polímeros extracelulares envolvendo as células algais, para uma estreita relação alga/bactéria, formando assim um outro tipo de “ficosfera”. Esses polímeros, apesar de serem razoavelmente refratários ao ataque biológico, podem ser degradados e utilizados

como substrato por populações bacterianas, como foi mostrado por Freire-Nordi & Vieira (1996, 1998).

A hipótese central deste trabalho é que em uma associação específica alga/bactéria vinculada aos carboidratos excretados pela alga, incluindo os exopolissacarídeos como suporte mecânico e/ou fonte de carbono, as relações mutualistas do tipo heterocisto/bactéria anteriormente citada, devem ser mais freqüentes, não excluindo aquele tipo de especificidade nas quais as bactérias seriam apenas comensais selecionadas pela MOD excretada por uma determinada espécie, sem haver a necessidade de uma interação. Um dos mecanismos plausíveis é a possibilidade dos excretados, cuja concentração relativa aumenta em condições desfavoráveis ao crescimento celular das algas, proporcionarem o crescimento e manutenção de uma população bacteriana específica. Essa população bacteriana seria o agente de decomposição da matéria orgânica particulada proveniente da morte (ou até mesmo antes dela) de uma determinada espécie do fitoplâncton e com isso, por remineralização, distribuiriam para um número menor de células fitoplanctônicas os nutrientes minerais imobilizados nas células em degeneração. Um fato que facilitaria esse tipo de associação é que a excreção aumenta com os fatores que inibem a estruturação celular e, conseqüentemente, a divisão celular. Assim, em uma população algal exposta a condições nas quais os nutrientes são limitantes, ou com a população na fase de senescência, mas com o aparelho fotossintético ainda ativo (Vieira & Mykkestad 1986; Vieira *et al.* 1994), a excreção/célula aumenta por não ocorrer divisão celular. Isso pode incrementar a atividade das bactérias que remineralizariam mais rapidamente os nutrientes presos nas células mais velhas. A hipótese de que nesse tipo de associação a alga poderia receber nutrientes inorgânicos, advindos da remineralização de matéria orgânica pelas populações de bactérias associadas, necessita ser abordada com extremo

cuidado se, em um ambiente eutrofizado e, portanto, com ausência de limitação de nutriente como o reservatório em questão, ocorrerem tais tipos de associações. Por outro lado, com relação aos nutrientes inorgânicos, mesmo em um ambiente eutrofizado sem aparente limitação de nutrientes, determinadas espécies podem, em uma competição interespecífica numa comunidade estável, sofrer limitação de algum tipo de nutriente (Reynolds 1984). Além disso, uma determinada associação pode ter mecanismos diferenciados em condições distintas. Não é pretensão deste estudo explicar definitivamente as funções extracelulares dos carboidratos produzidos pelo fitoplâncton, uma vez que as hipóteses acima discutidas não excluem outros possíveis mecanismos pelos quais as algas poderiam obter contrapartida em tal associação, como o exemplo bactérias/heterocistos anteriormente citado. As funções extracelulares dos carboidratos algais devem ser tão diversificadas quanto suas próprias composições e a evolução dessas funções provavelmente seguiu padrões específicos para as diferentes espécies em ambientes com características também específicas (Girollo & Vieira 2002).

2) OBJETIVOS.

O objetivo central desta tese de doutoramento foi testar a hipótese de que no plâncton os carboidratos extracelulares produzidos pelo fitoplâncton podem ser o vínculo de associações específicas alga/bactéria. Para isso, foram efetuados diversos experimentos com três espécies fitoplanctônicas isoladas do mesmo habitat e pertencentes a grupos taxonômicos distintos: *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae), *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae) e *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae).

A abordagem deste estudo iniciou-se pela caracterização dos carboidratos extracelulares produzidos por cada uma das espécies em questão, bem como de seus

parâmetros de crescimento em culturas axênicas. Em seguida foram realizados experimentos de cultivo conjunto, após contaminação de culturas algais axênicas com populações bacterianas coletadas no mesmo habitat das algas. Objetivou-se com isso selecionar as populações bacterianas que se desenvolveram associadas a cada alga, além de observar alterações no padrão de crescimento das algas em função do crescimento simultâneo de populações microbianas. O passo seguinte foi testar a especificidade em termos de classes de substratos, cultivando as populações selecionadas para cada alga em meios contendo, separadamente, os respectivos excretados de baixa massa molecular e exopolissacarídeos de cada espécie em questão. Neste sentido, este estudo teve os seguintes objetivos secundários:

- Caracterizar os carboidratos extracelulares e os parâmetros de crescimento de cada uma das algas em questão crescendo em condições axênicas;

- Elaborar cultivos conjuntos alga/bactéria visando selecionar comunidades bacterianas específicas a cada uma das algas em estudo, bem como comparar os padrões de crescimento das algas em conjunto com as bactérias e em condições axênicas;

- Comparar as concentrações de carboidratos extracelulares produzidos pelas algas em conjunto com as bactérias e em condições axênicas para comprovar a utilização destes compostos pela comunidade microbiana;

- Testar a especificidade das associações alga/bactéria em termos de classes de substratos, repicando as comunidades bacterianas específicas de cada alga nos respectivos excretados de alta e baixa massa molecular da própria alga.

3) METODOLOGIA.

3.1) ÁREA DE ESTUDO.

A coleta das algas e das bactérias foi realizada no reservatório de Barra Bonita, localizado no oeste do estado de São Paulo a 22° 29' S e 48° 34' W em uma altitude de 430 m (Figura 1). A área superficial é de 32484 ha e a profundidade máxima é de aproximadamente 30 m, correspondendo a um volume máximo de $3.6 \times 10^6 \text{ m}^3$. (Tundisi & Matsumura-Tundisi 1990). É considerado um reservatório eutrófico (Rietzler 1995), e as águas dessa represa estão num processo de eutrofização cultural decorrente das altas concentrações de nutrientes advindos de áreas urbanas (efluentes domésticos e industriais) e atividades agroindustriais na bacia hidrográfica (Calijuri 1999).

3.2) ORGANISMOS.

As espécies fitoplanctônicas utilizadas neste trabalho foram *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* Skuja, (Cryptophyceae), *Staurastrum orbiculare* Ehrenberg Ralfs var. *orbiculare* P. *orbiculare* (Zygnematophyceae) e *Thalassiosira* sp. (Bacillariohyceae), que podem ser visualizadas na Figura 2. As espécies estão sendo mantidas em cultivos axênicos na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos.

Os inóculos de bactérias foram constituídos a partir da água do Reservatório de Barra Bonita provenientes de quatro profundidades, integradas, da coluna fótica (100, 50, 25 e 1% da luz incidente à superfície), coletadas com um sistema para amostragem em condições assépticas, mostrado na Figura 3. A água foi filtrada em filtros de fibra de vidro AP-20 (pré-filtros Millipore) calcinados e autoclavados, para retirar algas, zooplanctones e protozoários, já que os poros deste filtro não retêm bactérias.

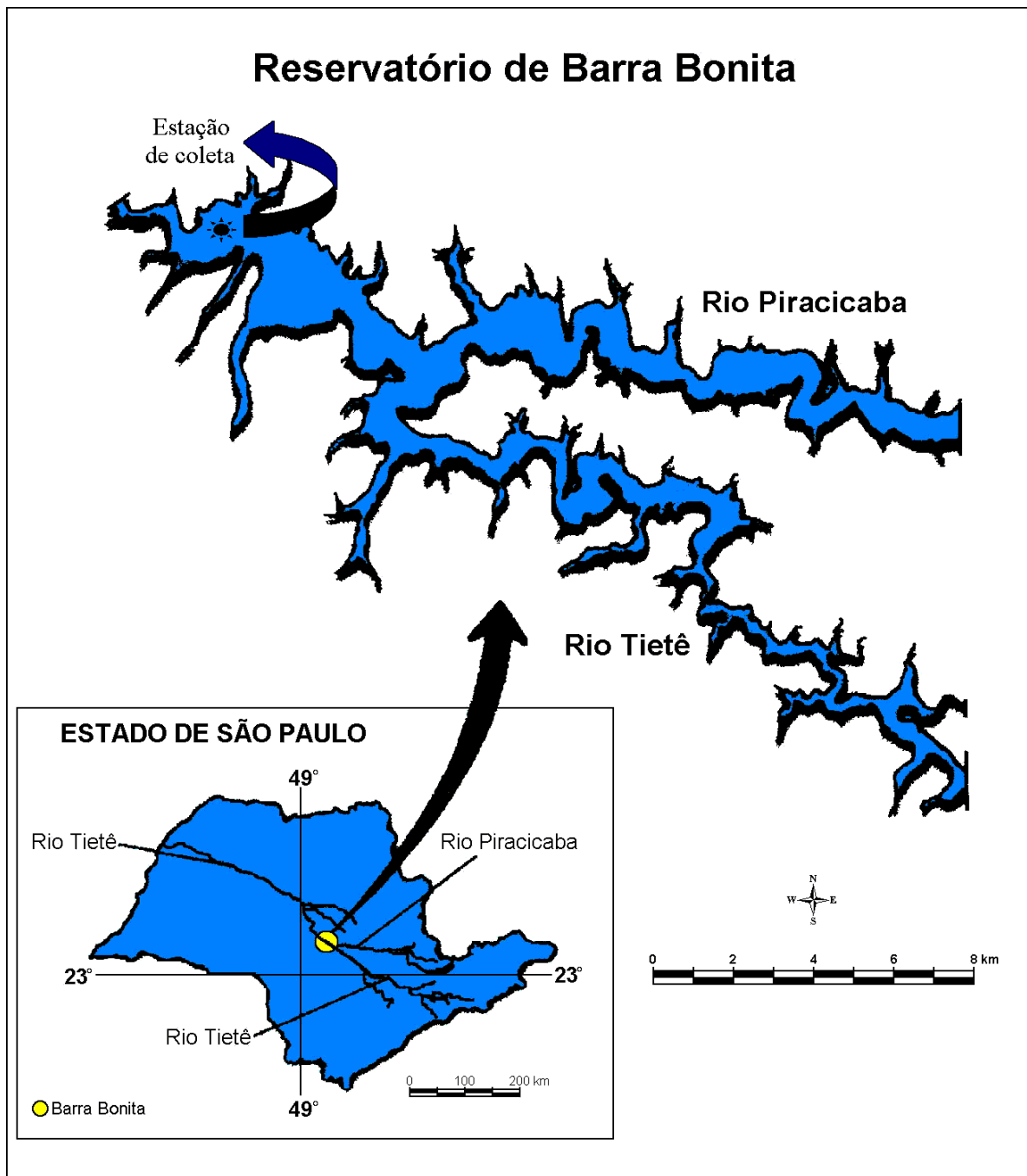


Figura 1: Localização da área de estudo de onde foram coletadas as espécies fitoplanctônicas e a comunidade bacteriana. Fonte (Calijuri 1999).

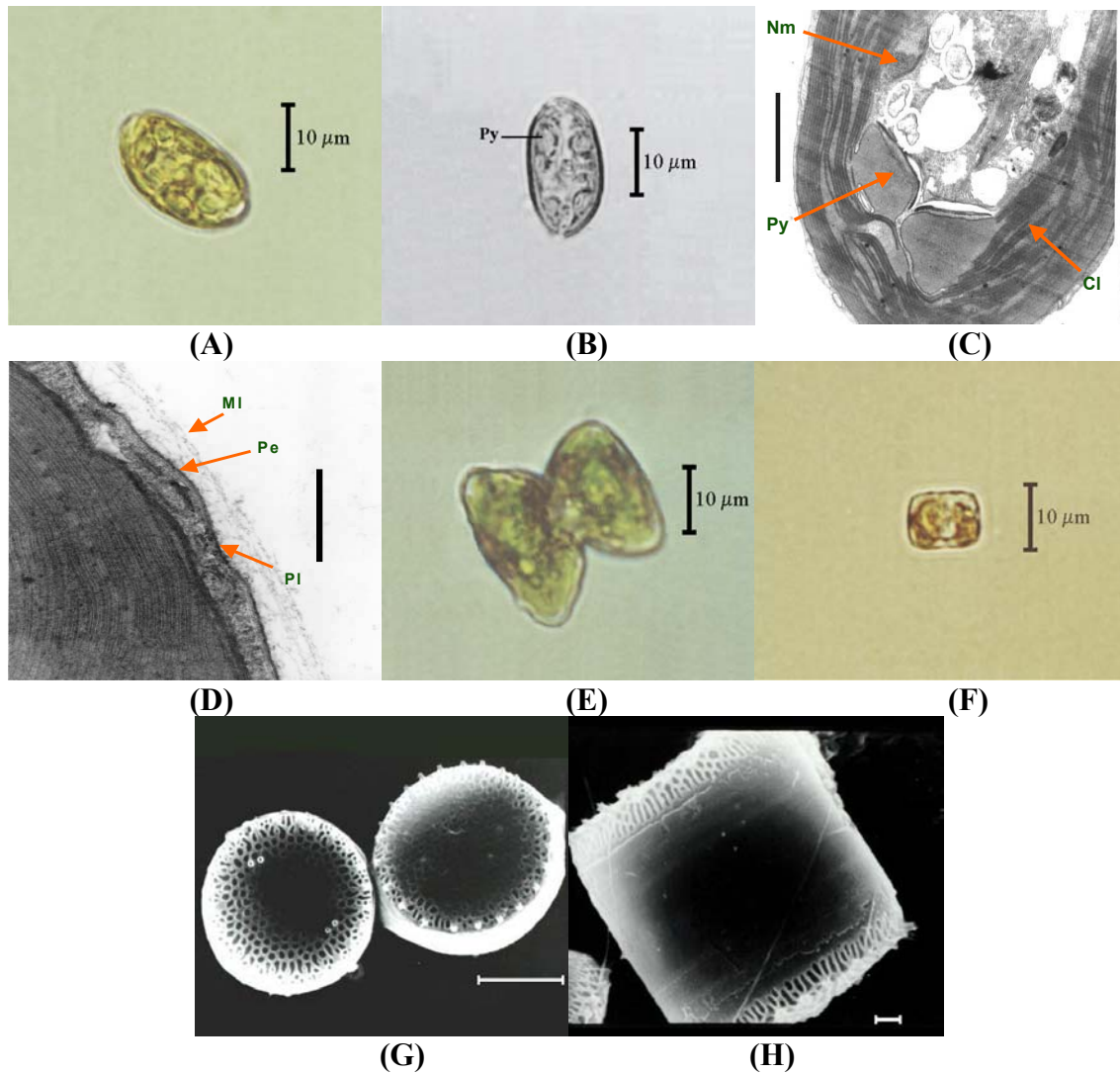


Figura 2: Algas fitoplanctônicas, oriundas do Reservatório de Barra Bonita, envolvidas neste trabalho. (A) *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, aumento de 1000 X, (B) *C. tetrapyrenoidosa*, aumento de 1000 X, foto em preto e branco com filtro verde, (C) e (D) *C. tetrapyrenoidosa*, micrografias em microscopia eletrônica de transmissão, as barras correspondem respectivamente a 3 e 1 μm (foto: Dra. Mariângela Menezes), (E) *Staurastrum orbiculare*, aumento de 1000 X, (F) *Thalassiosira* sp, aumento de 1000 X, (G) e (H) *Thalassiosira* sp, micrografias em microscopia eletrônica de varredura, as barras correspondem respectivamente a 5 e 1 μm (foto: Dra. Lezilda Torgan) (Cl) Cloroplasto, (MI) Camada mucilaginosa, (Nm) Nucleomorfo, (Pe) Periplasto, (Pl) Plasmalema, (Py) Pirenóide.

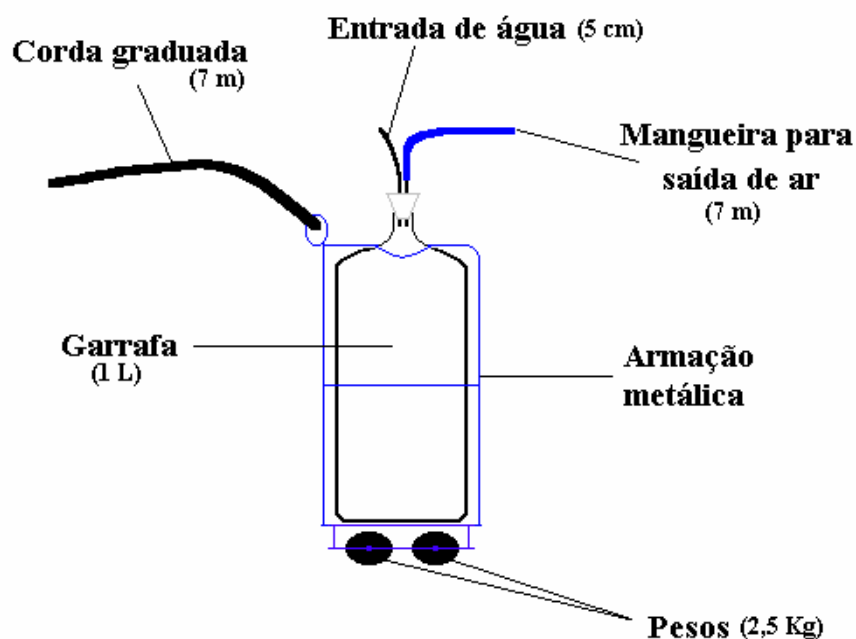


Figura 3: Sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do Reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo da comunidade microbiana. O sistema é lavado com HCl 10% e autoclavado. A entrada de água permanece tampada e é manuseada apenas dentro da represa para evitar contaminação por bactérias aéreas. A água entra na garrafa quando se abre a saída de ar em cada uma das profundidades-alvo. Um filtro feito com algodão na mangueira de ar evita a queda de partículas aéreas no interior da garrafa.

3.3) CULTIVO DAS ESPÉCIES FITOPLANCTÔNICAS.

Os cultivos experimentais dos organismos foram efetuados em meio WC (Guillard & Lorenzen 1972). As culturas axênicas de *S. orbiculare* e *C. tetrapyrenoidosa* foram obtidas por meio de sucessivas lavagens ao microscópio, usando meio WC enriquecido com peptona e glicose (250 mg/L cada). *Thalassiosira* sp foi purificada com adição de Solução de Dákin[®] 1% com repicagens a cada 30 segundos até 5 minutos, também usando meio WC P + G (Vieira 1983).

3.4) EXPERIMENTO I: CARACTERIZAÇÃO DOS CARBOIDRATOS EXTRACELULARES E DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DAS ESPÉCIES FITOPLANCTÔNICAS.

Para a determinação das características de crescimento de cada espécie, bem como para a caracterização dos carboidratos extracelulares por ela produzidos, foram montadas culturas axênicas utilizando garrações Pirex[®] de 9 litros de capacidade, com 7 litros de meio de cultura WC. As culturas foram inoculadas com um inóculo axênico de 300 mL com cerca de 9×10^4 células por mL na fase exponencial de crescimento. Dessas culturas foram retiradas amostras diárias de 20 mL nos primeiros 7 dias e a cada 48 h no período restante até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento, dos quais 5 mL foram fixados com lugol forte e utilizados para a contagem dos organismos ao microscópio. Para as contagens das células utilizou-se um hemocítmetro de Fuchs-Rosenthal para *C. tetrapyrenoidosa* e *Thalassiosira* sp e a câmara de Palmer-Maloney para *S. orbiculare*. O restante foi filtrado em membrana de acetato de celulose (Millipore[®]), com poros de 0,45 μm , para a determinação das concentrações de carboidrato total dissolvido que foram obtidas pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Os carboidratos foram, também, analisados semanalmente por cromatografia líquida de alta performance acoplada a um detector por pulsos amperométricos (HPLC-PAD), para monitoramento qualitativo após fracionamento por cromatografia por permeação em coluna de gel P10 Bio-Rad[®], cuja técnica será detalhada mais adiante juntamente com a metodologia para caracterização dos exopolissacarídeos. Os filtros com as células retidas foram utilizados para as determinações das concentrações de clorofila-a pelo método de Talling & Driver (1963), com as extrações efetuadas a -5 °C com acetona 90 % alcalinizada com MgCO_3 . A Figura 4 resume os experimentos para a caracterização dos carboidratos

extracelulares e dos parâmetros de crescimento das espécies fitoplancônicas em estudo, bem como as análises realizadas nos mesmos.

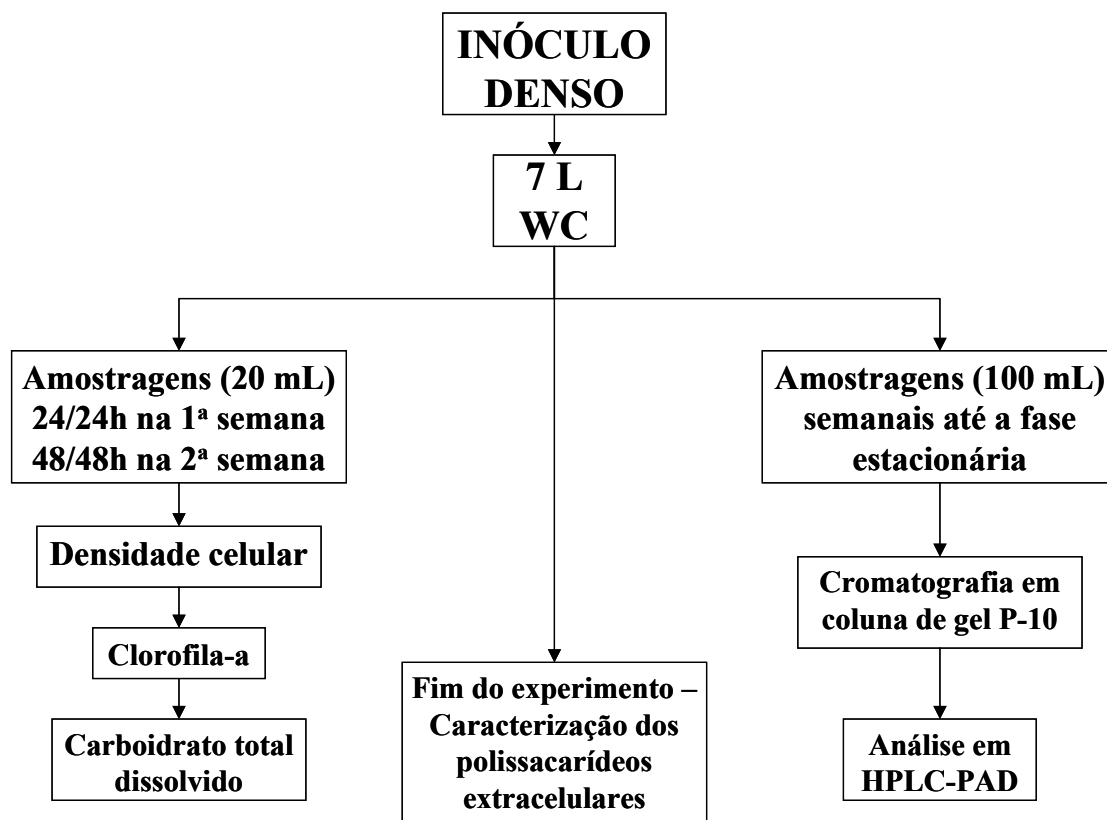


Figura 4: Esquematização do experimento I. Caracterização dos parâmetros de crescimento e dos carboidratos extracelulares produzidos em condições axênicas por *Cryptomonas tetrapyreoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp.

3.4.1) Caracterização dos carboidratos extracelulares por HPLC-PAD.

As amostras retiradas semanalmente (100 mL) foram concentradas 4 vezes em rotaevaporador a 40°C e em seguida, injetadas em uma coluna de 120 mL preenchida com gel P10 Bio-Rad® com limite mínimo de exclusão de 1500 D e máximo ajustado com "blue dextran" (2 x 10⁶ D), acoplada a um conjunto fracionador regulado com fluxo de 1mL/7min. O eluente utilizado foi água destilada e butanol 2%. Foi testada a presença de carboidratos em cada uma das frações pelo método de Dubois *et al.* (1956), e foram armazenadas aquelas cujo teste detectou presença de carboidratos. Os

carboidratos detectados no início e no meio dos cromatogramas (poliméricos) foram hidrolizados com 350 µl de HCl 8M para cada 10 ml de amostra, a 100 °C por 12 horas (Gremm & Kaplan 1997). Tanto os carboidratos poliméricos (após hidrólise), como os açúcares livres foram dessalinizados em colunas de troca iônica AG50W e AG2X8 Bio-Rad[®]. As amostras devidamente dessalinizadas foram analisadas em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de carboidratos por pulsos amperométricos (HPLC-PAD) Dionex[®], modelo DX-500, equipado com uma bomba GP-40 e um detector ED-40. Em resumo, a metodologia de identificação e quantificação por HPLC-PAD, descrita por Wicks *et al.* (1991) e Mopper *et al.* (1992) com modificações de Jørgensen & Jensen (1994) e de Gremm & Kaplan (1997), é a seguinte: monossacarídeos livres, dissacarídeos e alguns oligossacarídeos são separados como ânions em uma solução alcalina (NaOH) por HPLC e posteriormente detectados em uma célula amperométrica equipada com um eletrodo de referência Ag/AgCl e um eletrodo detector de ouro, no qual os carboidratos-ânions são oxidados. O eletrodo de ouro é exposto a um pulso amperométrico positivo/negativo para a remoção dos produtos oxidados de maneira que o eletrodo detector fica livre em curtíssimo intervalo de tempo para a detecção de outros ânions que estão chegando, depois de serem separados na coluna. Com o emprego de padrões apropriados pode-se identificar os monossacarídeos, dissacarídeos e até pequenos oligossacarídeos e polissacarídeos. Na impossibilidade de contar com padrões para carboidratos poliméricos, estes podem ser hidrolizados e seus monossacarídeos constituintes identificados e quantificados. O eluente para a separação dos monossacarídeos foi NaOH 18 mM e para a recuperação da coluna foi NaOH 200 mM em um fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi a PA-10, cujas características são específicas para uma melhor separação de monossacarídeos, embora a detecção de dissacarídeos sem hidrólise seja também possível. As amostras foram analisadas em

triplicata e quantificadas por meio de curvas de calibrações com 8 concentrações próximas ao "range" observado nas mesmas.

3.4.2) Caracterização dos exopolissacarídeos.

Ao final dos experimentos as células foram filtradas através de cartuchos de fibra oca com poros de 0,65 µm em um filtrador tangencial (A/G Technology®). O meio filtrado foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C até o volume aproximado de 350 mL. Esse volume foi dializado em membranas que retêm moléculas com massas moleculares superiores a 10-12 kD, deixando-se 24 horas na água corrente de torneira, e 48 horas na água destilada, que foi trocada a cada 12 horas. Para evitar a contaminação durante este processo, foram adicionadas algumas gotas de tolueno. A amostra dializada foi então congelada em nitrogênio líquido, liofilizada e posteriormente armazenada hermeticamente a -5 °C.

A caracterização dos exopolissacarídeos se deu em três fases: identificação de subfrações por cromatografia de troca iônica, determinação da composição monomérica das subfrações por cromatografia gasosa e determinação das ligações glicosídicas por espectrometria de massa.

3.4.2.1) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose.

Para a identificação das ligações glicosídicas é necessário o entendimento prévio das diferentes frações que compõe cada polissacarídeo em questão, bem como eliminar possíveis contaminantes como amido e glicogênio provenientes de células mortas e que não estão diretamente relacionados com os polissacarídeos extracelulares em estudo. Para isso montou-se uma coluna com 100 mL de volume, preenchida com o gel DEAE Sepharose "Fast flow" (Pharmacia®), acoplada a um conjunto fracionador ajustado a um fluxo de 1 mL/3 min. As amostras foram diluídas em água destilada (1 g/L) e injetou-se um volume de 40 mL. No caso de cromatografia de troca iônica não é necessário

respeitar o limite máximo de 5 % do volume total da coluna, uma vez que a separação não é em função da massa molecular, mas sim em função da afinidade da amostra com o gel. Neste tipo de cromatografia o limite máximo de amostra a ser injetada seria em termos de massa, tomando-se cuidado para que não seja injetada uma massa de amostra suficiente para saturar a coluna. As amostras foram eluídas pelo método “batch separation” (Pharmacia 1991), pelo qual não é necessária a aplicação de gradiente salino. Inicialmente a fração neutra foi eluída com água destilada e as frações ácidas foram eluídas em duas diferentes concentrações salinas: NaCl a 0,5 e 1,0 M. Posteriormente a coluna foi regenerada com NaCl a 2,0 M e lavada com água destilada antes de injetar uma nova amostra.

3.4.2.2) Determinação da composição monomérica das subfrações.

Para a determinação da composição monomérica das diferentes frações, as mesmas foram submetidas à metanólise (Reinhold 1972 e Barsett *et al.* 1992), a qual submete à análise por cromatografia gasosa os derivativos tri-metil-silil dos metil-glicosídeos. A metodologia para esta caracterização está bem detalhada em Paulsen *et al.* (1992) e aqui será apresentada em resumo: os polissacarídeos foram metanolizados com 4 M HCl/Metanol anidro a 80 °C por 24 h para quebra das ligações glicosídicas e concomitante geração de metil glicosídeos, que em seguida são tratados com TMS (tri-metil-silil) para a formação de O-trimetilsilil derivados (Sweeley *et al.* 1963, Reinhold 1972). Os O-trimetilsilil derivados foram identificados e quantificados por cromatografia de gás (HP 5890) equipado com uma coluna J & W de 25 m X 0,25 cm de diâmetro e detetor FID. O manitol foi usado como padrão interno.

3.4.2.3) Determinação das ligações glicosídicas.

Nas frações dos polissacarídeos nas quais observou-se uma porcentagem de ácidos urônicos superior a 5 %, realizou-se a redução carboxílica destes componentes

ácidos (Sims & Bacic 1995). A redução do carbono 6 se faz necessária para distinguir estes compostos das demais hexoses neutras, e a mesma é realizada basicamente pela adição de borodeuterídeo de sódio em solução bastante concentrada (100 mg/L) antes da metilação. A metilação é um dos mais importantes métodos na análise estrutural dos polissacarídeos (Lindberg 1972). O método utilizado foi descrito por Kim e Carpita (1992) e envolve a metilação de todos os grupos hidroxil presentes nos polissacarídeos, subsequente hidrólise, redução do carbono 1 e acetilação dos alditóis parcialmente metilados (Barsett *et al.* 1992 e Samuelson *et al.* 1995). Os açúcares parcialmente metilados foram então analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS). O espectro de massa foi obtido por meio de impacto de elétrons usando um “Hewlett-Packard selective detector 5970” com um Hewlett-Packard 5890 GC.

3.5) EXPERIMENTO II: CULTIVOS CONJUNTOS ALGA/BACTÉRIA.

Foram preparadas culturas axênicas (2 L, 2×10^3 cel/mL) das três microalgas estudadas, utilizando meio WC modificado pela redução à metade das concentrações de nitrogênio (NaNO_3) e fósforo (K_2HPO_4) e 200 mL de inóculo axênico na fase exponencial de crescimento. Após a entrada das culturas na fase exponencial de crescimento (5 dias), cada uma delas foi dividida em duas frações de 1 L. Uma foi contaminada com 50 mL de amostra integral (filtrada em pré-filtro AP-20) de água de Barra Bonita, nas condições anteriormente descritas, e a outra foi mantida em condições axênicas, para servir como controle. A cada intervalo de 48 h, uma alíquota de 10 mL foi retirada tanto das culturas axênicas como das contaminadas para a contagem das células fitoplanctônicas, realizada como anteriormente descrito na câmara de Palmer-Malloney para *S. orbiculare* e na lâmina Fuchs-Rosenthal para *C. tetrapyrenoidosa* e *Thalassiosira* sp, após processo de fixação com lugol forte.

Para a contagem das bactérias, as amostras foram previamente filtradas em filtros AP-20, nas condições anteriormente descritas, e os filtrados contendo as bactérias foram fixados com formol 5 % (concentração final). A contagem das bactérias foi feita pelo método da epifluorescência, corando-se as bactérias com 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), conforme descrito por Porter & Feig (1980).

Para a análise de clorofila-*a* foram filtrados cerca de 15 mL de amostras integrais das culturas em membranas de acetato de celulose com poros de 0,45 µm. Os filtros foram armazenados a -5 °C e no escuro para posterior análise segundo o método descrito por Talling & Driver (1963). O filtrado foi utilizado para as análises de carboidratos totais dissolvidos nos meios de cultura. O filtrado foi concentrado (3 vezes) em rotaevaporador a 40 °C e analisado em HPLC-PAD em duas frações: carboidratos livres (amostra não-hidrolizada) e carboidratos totais (amostra hidrolizada), seguindo a metodologia anteriormente descrita.

Quando as culturas alcançaram o final do crescimento exponencial, as bactérias contaminantes de cada cultura foram congeladas em condições assépticas para a análise dos padrões de diversidade bacteriana encontrados em cada uma das culturas de algas, utilizando técnicas moleculares como PCR - "Polymerase Chain Reaction" e DGGE - "Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis" (Øvreas *et al.* 1997, Murray *et al.* 1998, Theron e Cloete 2000, Simek *et al.* 2001), descritas a seguir. A Figura 5 resume os experimentos de cultivos conjunto e as análises realizadas.

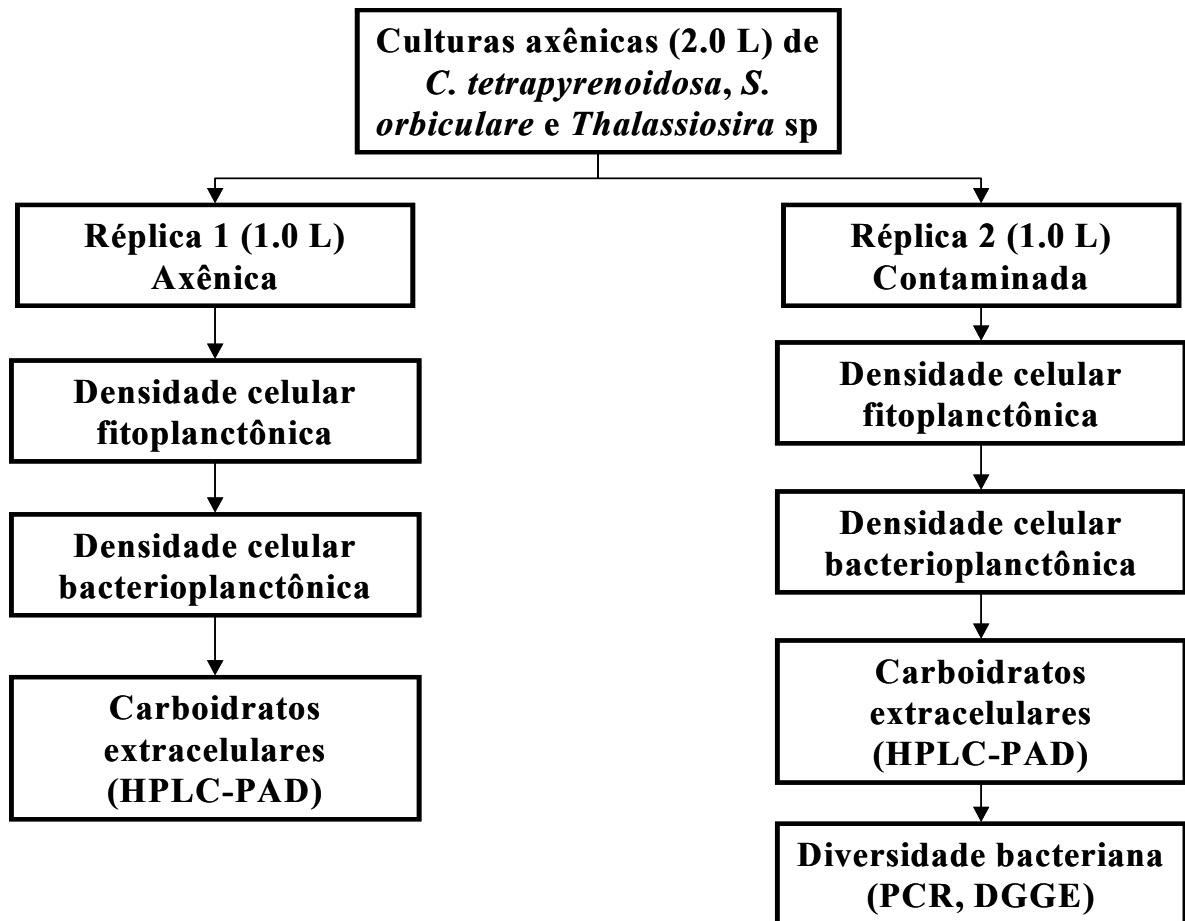


Figura 5: Esquemática do experimento II. Cultivos conjuntos alga/bactéria de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp.

3.5.1) Análise dos padrões de diversidade bacteriana pertencente ao Domínio

Bacteria:

Os procedimentos utilizados para análise da diversidade bacteriana do reservatório de Barra Bonita, em comparação com a diversidade observada nas culturas algais foram os seguintes:

- 1) Extraiu-se o DNA das comunidades bacterianas que se desenvolveram em cada uma das culturas de algas;

- 2) Procedeu-se o PCR (Polimerase Chain Reaction), para amplificação de fragmentos de 16S DNAr, usando "primers" específicos para o 16S DNAr do Domínio *Bacteria*;
- 3) O produto do PCR foi analisado pela técnica do DGGE, ou seja, uma eletroforese em gel com gradiente desnaturante;
- 4) A complexidade dos padrões de bandas obtidas no DGGE foi observada em um transiluminador UV e as bandas foram tomadas como uma medida da diversidade das comunidades.

3.5.1.1) Protocolo de extração de DNA.

A extração do DNA foi realizada seguindo a metodologia descrita na apostila técnica da Fundação André Tozello. Centrifugou-se um volume de 1,5 mL por 30 minutos a 10000 x g e os "pellets" contendo as bactérias foram ressuspensos em 100 µL de solução de lise (50 ng/µL de proteinase K em tampão TE Tris+ EDTA pH 8.0). As amostras foram deixadas em banho-maria por 15 minutos a 55 °C e depois mais 15 minutos a 80 °C. Centrifugou-se novamente por 7 minutos a 12000 x g e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo. Procedeu-se a reação de PCR com 10 µL e congelou-se o restante para reações futuras. O DNA não é estável por muito tempo sob a forma de lisado, pois não houve purificação e pode haver ação degradadora de nucleases.

3.5.1.2) Reação de Amplificação.

As amostras de DNA foram amplificadas usando "primers" para o 16S DNAr do Domínio *Bacteria* de acordo com o seguinte procedimento. Uma mistura de reação foi preparada com os componentes e suas concentrações finais descritas na Tabela 1.

Inicialmente foi preparada uma mistura de água e tampão. Em seguida foram acrescentados o dNTP e depois os "primers". Por último, acrescentou-se a enzima *Taq* polimerase e o DNA a ser amplificado. Para manipulação das soluções estoque de

"primers" foi necessário o uso de ponteiras com proteção para aerossóis, e as preparações foram feitas sob fluxo laminar.

Tabela 1: Concentração final dos reagentes para execução do PCR do Domínio *Bacteria*.

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume para reação de 50µL
*Solução tampão da Taq	10 X	1 X	5 µL
Primers 968f	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
Primer 1401r	20 µM	0,2 µM	0,5 µL
**DNTP's	25 Mm	200 µM	0,4 µL
Taq-polimerase	5 U/µL	2 U	0,4 µL
DNA	--	50-100 ng	--
H ₂ O	--	--	Qsp. 50 µL

*Solução tampão da Taq 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8,6), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1 % triton X-100). **Solução de nucleosídeos trifosfatos (A, T, C, G).

3.5.1.3) "Primers" do Domínio *Bacteria* usados no PCR.

F984 GC (posições 968-984) e R1378 (posições 1378-1401)

984 F com GC clamp: 5'gc. AAC GCG AAG AAC CTT AC

1378 R: 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG

A seqüência rica em G+C acoplada a extremidade 5' do "primer" serviu para impedir a completa desnaturação do fragmento de DNA durante a separação em gel de DGGE (Muyzer *et al.*, 1997).

3.5.1.4) Programa usado no PCR para os "primers" (Domínio *Bacteria*).

1 ciclo a 94° C por 5 minutos; 10 ciclos a 94° C por 1 minuto (temperatura de anelamento) e 66 °C por 30 segundos(-0,5 °C/ciclo) e 72 °C por 2 min; depois 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C e 30 segundos a 60 °C, e 2 minutos por 72 °C; 1 ciclo de 72 °C por 2 minutos e resfriamento a 4 °C.

As amplificações foram feitas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.). Foi confirmada a qualidade dos produtos do PCR em gel de agarose 1 %, antes de proceder ao DGGE.

3.5.1.5) Método do DGGE.

O resultado da amplificação do 16S DNAr da amostra de Barra Bonita utilizada como inóculo e dos cultivos conjuntos foi analisado utilizando a técnica do DGGE. Para isso, confeccionou-se um sanduíche de gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante paralelo de desnaturação de 45 a 65 %, no qual o gradiente é paralelo à direção do campo elétrico aplicado. Após a polimerização do gel, foi realizada a montagem da cuba do tampão superior no tanque de eletroforese contendo tampão TE a 60 °C. As amostras provenientes do PCR foram aplicadas nas canaletas com auxílio de ponteiros de seqüenciamento e aplicou-se eletroforese de 50 V por 14 horas. Em seguida o gel foi removido e sua coloração foi realizada com o corante SYBR Green.

3.5.1.6) Análise dos Géis do DGGE.

A complexidade dos padrões de bandas obtidos no DGGE foi tomada como uma medida da diversidade das comunidades. Por meio da análise dos diferentes padrões de migração das bandas, comparando as bandas da amostra de Barra Bonita com as amostras das culturas algais contaminadas, foi analisada a variação da diversidade do Domínio *Bacteria* em função dos diferentes substratos oferecidos.

3.6) EXPERIMENTO III: TESTES DE ESPECIFICIDADE.

As bactérias que se desenvolveram em cada uma das culturas algais foram obtidas por pré-filtração em filtros AP20, como anteriormente descrito, e repicadas em meios de cultura líquidos confeccionados com os respectivos excretados (polissacarídeos e excretados de baixa massa molecular) assim preparados:

3.6.1) Meio de cultura elaborado com excretados de baixa massa molecular.

Água do reservatório filtrada e esterilizada (0,5 litro) + nutrientes inorgânicos correspondentes à metade das concentrações do meio WC + 0,5 litro excretados algais de baixa massa molecular < 10 KD (específicos), esterilizados em membrana 0,22 µm.

3.6.2) Meio de cultura elaborado com exopolissacarídeos.

Água do reservatório filtrada e esterilizada (0,5 litro) + meio WC/2 (0,5 litros) + polissacarídeos específicos (100 mg/L).

3.6.3) Obtenção dos excretados de baixa massa molecular.

Neste trabalho são considerados *excretados de baixa massa molecular* os conjuntos totais de compostos orgânicos excretados, menos os polissacarídeos. Os excretados foram coletados no meio da fase de crescimento exponencial, para evitar a contaminação por compostos intracelulares provenientes de células mortas. As células foram retiradas dos meios de cultura por filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poros de 0,65 µm (nominal), sem pressão. Em seguida os meios de culturas foram ultrafiltrados em cartucho de fibra oca com poros de 10 kD (nominal) para a retirada de polissacarídeos. Posteriormente, os meios de cultura, sem os polissacarídeos, foram esterilizados por filtração em membranas de policarbonato com poros de 0,2 µm em ambiente asséptico.

3.6.4) Obtenção dos exopolissacarídeos.

Foram montadas diversas culturas axênicas, visando obter a maior quantidade possível de polissacarídeos para os experimentos de contaminação com bactérias e a própria caracterização dos mesmos. Esgotado o tempo de cultivo necessário para o início da fase estacionária de crescimento, determinado pela curva de crescimento, as células foram retiradas por filtração tangencial através de cartuchos de fibra oca com poros de 0,65 μm . O meio filtrado (7 L) foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C até o volume aproximado de 350 mL. Esse volume foi dializado em membranas que retêm moléculas com massas moleculares superiores a 10-12 kD, deixando-se 24 horas na água corrente de torneira, e 48 horas na água destilada, que foi trocada a cada 12 horas. A amostra dializada foi então congelada em nitrogênio líquido, liofilizada e posteriormente armazenada hermeticamente a -5 °C.

3.6.5) Experimentação.

Foram utilizados frascos erlenmeyers de 1000 mL contendo os meios de cultura anteriormente descritos, em duplicata, e os mesmos foram inoculados com 50 mL das bactérias que se desenvolveram em cada respectiva cultura. As culturas foram mantidas no escuro em uma temperatura de 25 °C e foi analisada a degradação dos polissacarídeos, por meio de cromatografia por filtração em coluna de gel. Durante 35 dias, foram retiradas semanalmente amostras de 100 mL, que posteriormente foram concentradas 5 vezes em rotaevaporador a 40 °C e injetadas em uma coluna de 120 mL, com um coletor de frações acoplado regulado a um fluxo de 1 mL/5 min e o eluente empregado foi água destilada + butanol 2 %. Foram utilizados dois tipos de gel: Pharmacia® Sepharose CL6B (10^4 a 10^6 D) e Bio Rad® A-15 (4×10^4 a 15×10^6 D) e as frações com carboidratos detectados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) foram armazenados para a caracterização e quantificação dos mesmos por meio da

análise em HPLC-PAD, após hidrólise já anteriormente descrita (item 3.4.1). A degradação dos polissacarídeos foi parametrizada matematicamente para uma melhor visualização dos padrões de degradação de cada um dos polissacarídeos e de cada subunidade dos mesmos, como será mostrado a seguir.

Ao final do experimento, foram congeladas assepticamente alíquotas de 1,5 mL de cada cultura, para a avaliação da diversidade bacteriana por meio das técnicas moleculares já anteriormente descritas. Assim, foi possível comparar a comunidade bacteriana adaptada ao excretado de baixa massa molecular, com a comunidade adaptada aos polissacarídeos, e se são diferentes da primeira contaminação, com a presença das algas. A Figura 6 mostra os experimentos de especificidade e as análises realizadas.

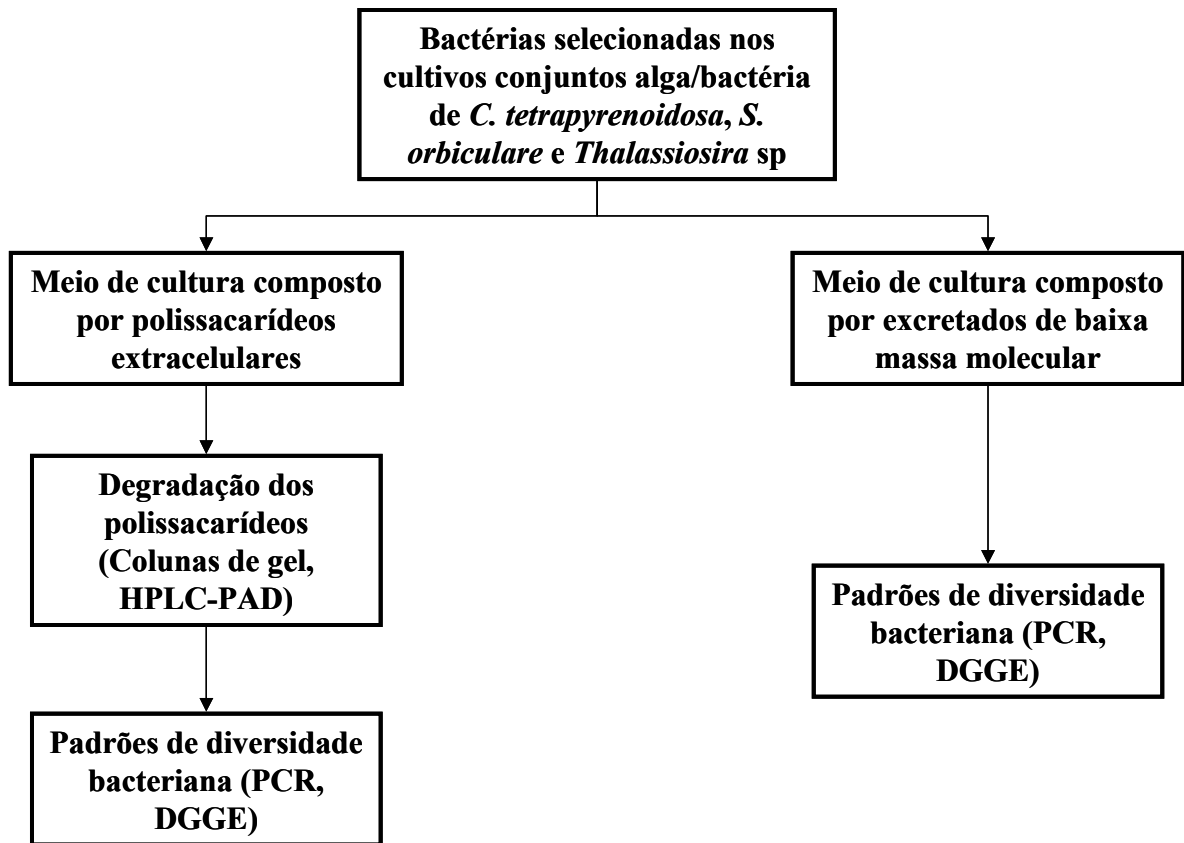
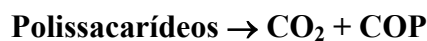


Figura 6: Esquematização do experimento III. Testes de especificidade em função do tipo de substrato oferecido às populações bacterianas específicas, selecionadas no experimento anterior.

3.6.6) Parametrização matemática da degradação dos polissacarídeos.

3.6.6.1) Reação monomolecular irreversível de primeira ordem.

Esse modelo matemático foi adotado para descrever as cinéticas de perda de massa durante a degradação dos polissacarídeos, conforme a seguinte reação:



Este modelo prevê que as taxas de reação são proporcionais às quantidades de reagentes e define uma constante de reação (k) cuja unidade é tempo⁻¹. A equação correspondente é apresentada a seguir:

$$A_t = A_0 e^{-kt} \dots\dots\dots \text{Eq. 1}$$

onde: A_t = concentração do reagente (quantidade de reagente remanescente); A_0 = concentração inicial do reagente; k = constante de reação; e = base do logaritmo natural; t = tempo.

Com a parametrização dessa equação, foi possível determinar os coeficientes de degradação dos polissacarídeos e do COD e utilizá-los como parâmetro de comparação entre as diferentes comunidades bacterianas e suas relações com os diferentes substratos. As variações temporais das concentrações de polissacarídeos e de COD foram utilizadas para as determinações dos coeficientes, durante a parametrização do modelo (Eq. 1); para tanto se utilizou um método de regressão não linear (algoritmo iterativo de Levenberg-Marquardt), de acordo com Press *et al.* (1993). Como o objetivo deste estudo não foi detalhar o processo de degradação dos polissacarídeos, foi escolhido um modelo relativamente simples, cuja única função foi comparar os padrões de degradação de cada componente de cada um dos polissacarídeos em questão.

4) RESULTADOS.

4.1) EXPERIMENTO I.

4.1.1) Crescimento das espécies fitoplanctônicas.

A Figura 7 mostra as curvas de crescimento obtidas para as três espécies fitoplanctônicas em questão. Em *C. tetrapyrenoidosa* (Figura 7a) observou-se uma fase *log* com aproximadamente 17 dias e um tempo de duplicação de 6,8 dias (Fogg 1975), um crescimento mais rápido do que o obtido para *S. orbiculare* (Figura 7b), que apresentou uma fase *log* mais longa (aproximadamente 45 dias) e um tempo de duplicação de 11,1 dias. *Thalassiosira* sp (Figura 7c) apresentou o crescimento mais acelerado entre as espécies estudadas, com um tempo de duplicação de 1,7 dias. A fase estacionária de crescimento foi atingida por *C. tetrapyrenoidosa* após aproximadamente

20 dias de cultivo e se manteve sem decréscimo drástico na densidade celular até aproximadamente 50 dias. Já para *S. orbiculare*, a fase estacionária foi atingida entre 46 e 50 dias e a cultura permaneceu sem decréscimo drástico na densidade celular até aproximadamente 70 dias. A fase estacionária da cultura de *Thalassiosira* sp foi alcançada com apenas 15 dias de cultivo, período em que ocorreu uma redução na taxa de crescimento de 1,7 para 24 dias para cada divisão, caracterizando uma fase de transição; e com 25 dias a fase senescente começou a ser evidenciada. Este resultado é importante uma vez que permite prever quando uma cultura de 7 litros, montada nas mesmas condições que a deste experimento, inicia e suporta a fase estacionária de crescimento sem aumento da morte celular que contaminaria com outros carboidratos intracelulares o meio extracelular.

A concentração de clorofila-a acompanhou o padrão geral de crescimento observado pela densidade celular em todas as espécies estudadas (Figura 8).

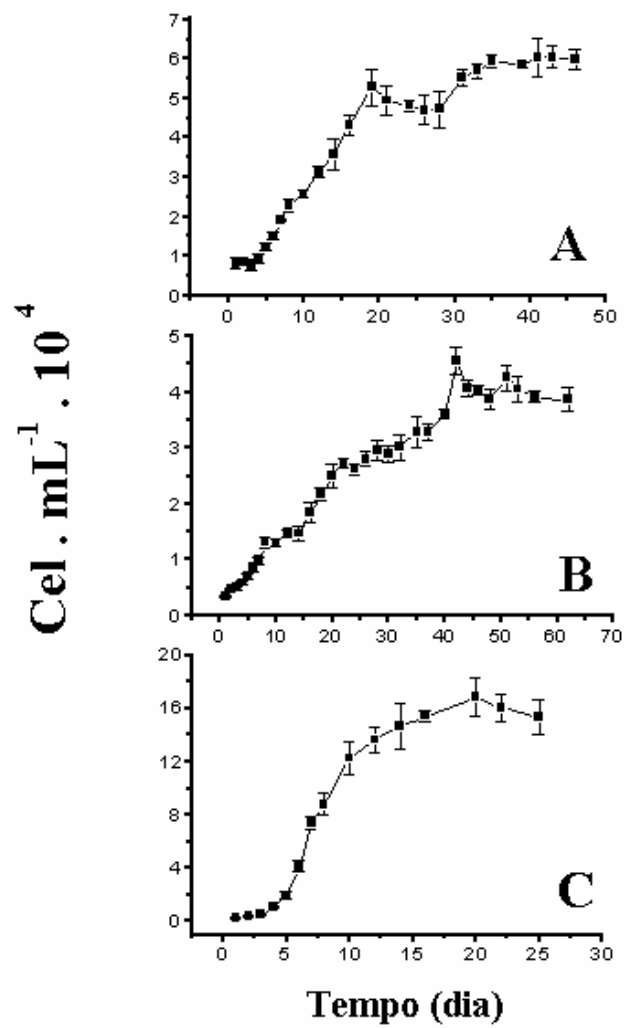


Figura 7: Densidade celular de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira* sp (C) em função do tempo de cultivo. As barras correspondem ao desvio padrão.

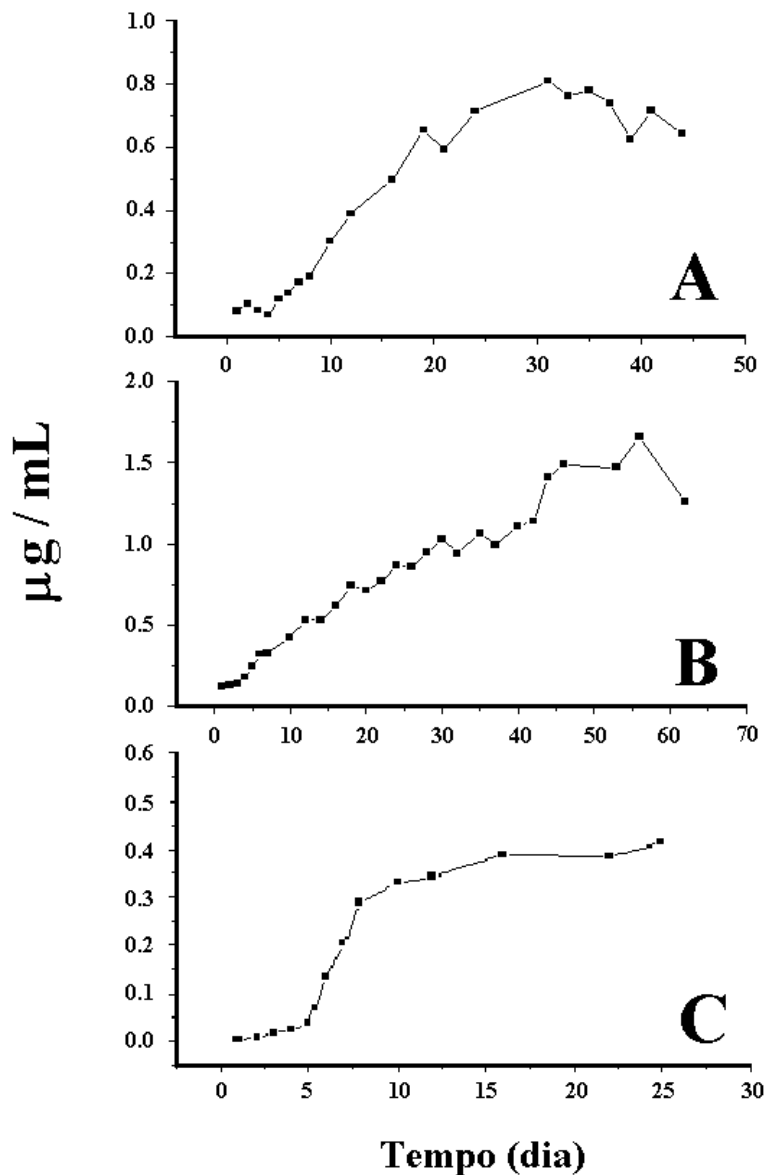


Figura 8: Concentração de clorofila-a de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira sp.* (C) em função do tempo de cultivo.

4.1.2) Excreção de carboidratos.

4.1.2.1) Carboidratos extracelulares totais.

A liberação de carboidratos também ocorreu de forma diferente entre as espécies estudadas (Figura 9). *S. orbiculare* produziu maiores quantidades de carboidratos extracelulares (Figura 9b), atingindo cerca de $6 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ em relação a $4 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ atingido por *C. tetrapyrenoidosa* (Figura 9a) e $0,5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cel}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$

atingido por *Thalassiosira* sp no final do experimento. A taxa de produção de carboidratos por célula aumentou exponencialmente após a entrada da cultura de todas as espécies na fase estacionária (Figura 9), evidenciando que a depleção nutricional ocasionada por esta fase de crescimento estimulou a excreção de carboidratos por todas as espécies estudadas.

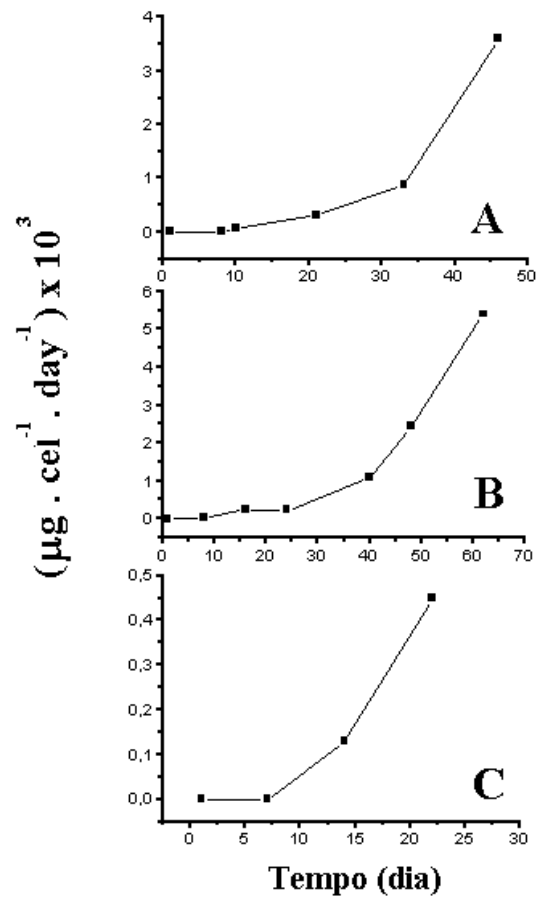


Figura 9: Taxa diária de produção de carboidratos extracelulares por célula em função do tempo de cultivo de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B), *Thalassiosira* sp (C) em função do tempo de cultivo.

4.1.2.2) Cromatografia em coluna de gel P-10.

A cromatografia por filtração em coluna de gel Bio-Rad[®] P-10 evidenciou uma maior liberação de carboidratos de alta massa molecular (polissacarídeos) em relação aos carboidratos de menores massas moleculares para todas as espécies estudadas. A Figura 10 mostra os cromatogramas obtidos em coluna de gel P-10 das amostras retiradas em diferentes fases do crescimento de cada espécie em questão. Em *C. tetrapyrenoidosa* observou-se pelo menos três grupos de carboidratos de diferentes massas moleculares (Figura 10a): AMM - alta massa molecular ($V_e/V_t = 0 - 0,3$), IMM - massa molecular intermediária ($V_e/V_t = 0,3$ a $0,7$) e BMM - baixa massa molecular ($V_e/V_t = 0,7$ a 1). Estes grupos, cujo aumento em função da idade da cultura só foi nítido no caso dos carboidratos poliméricos (AMM e IMM), foram isolados e posteriormente, identificados e quantificados por HPLC-PAD, como será detalhado no item seguinte. Em relação à *S. orbiculare* (Figura 10b), somente dois grupos de carboidratos de diferentes massas moleculares foram identificados: AMM ($V_e/V_t = 0$ a $0,45$) e BMM ($V_e/V_t = 0,45$ a 1) e ambos mostraram aumento significativo em função da idade da cultura. Da mesma forma estes grupos foram isolados e posteriormente, identificados e quantificados por HPLC-PAD. O resultado obtido para *Thalassiosira* sp. (Figura 10c) e evidencia pelo menos três grupos de carboidratos de diferentes massas moleculares, como em *C. tetrapyrenoidosa*: AMM ($V_e/V_t = 0 - 0,3$), IMM ($V_e/V_t = 0,3$ a $0,8$) e BMM ($V_e/V_t = 0,8$ a 1). Estes grupos, cujo aumento em função da idade da cultura foi significativo, foram isolados e posteriormente, identificados e quantificados em HPLC-PAD, como será detalhado no item seguinte. Vale a pena ressaltar que a detecção dos carboidratos nas frações cromatografadas foi realizada pelo método fenol-sulfúrico modificado apenas para detecção e não para quantificação como no caso dos carboidratos totais. Sendo assim, não seria confiável transformar os dados de

absorbância em $\mu\text{g/mL}$ e nem fazer quantificações precisas de variações entre as áreas dos picos. Este estudo mais refinado foi obtido com as análises por HPLC-PAD.

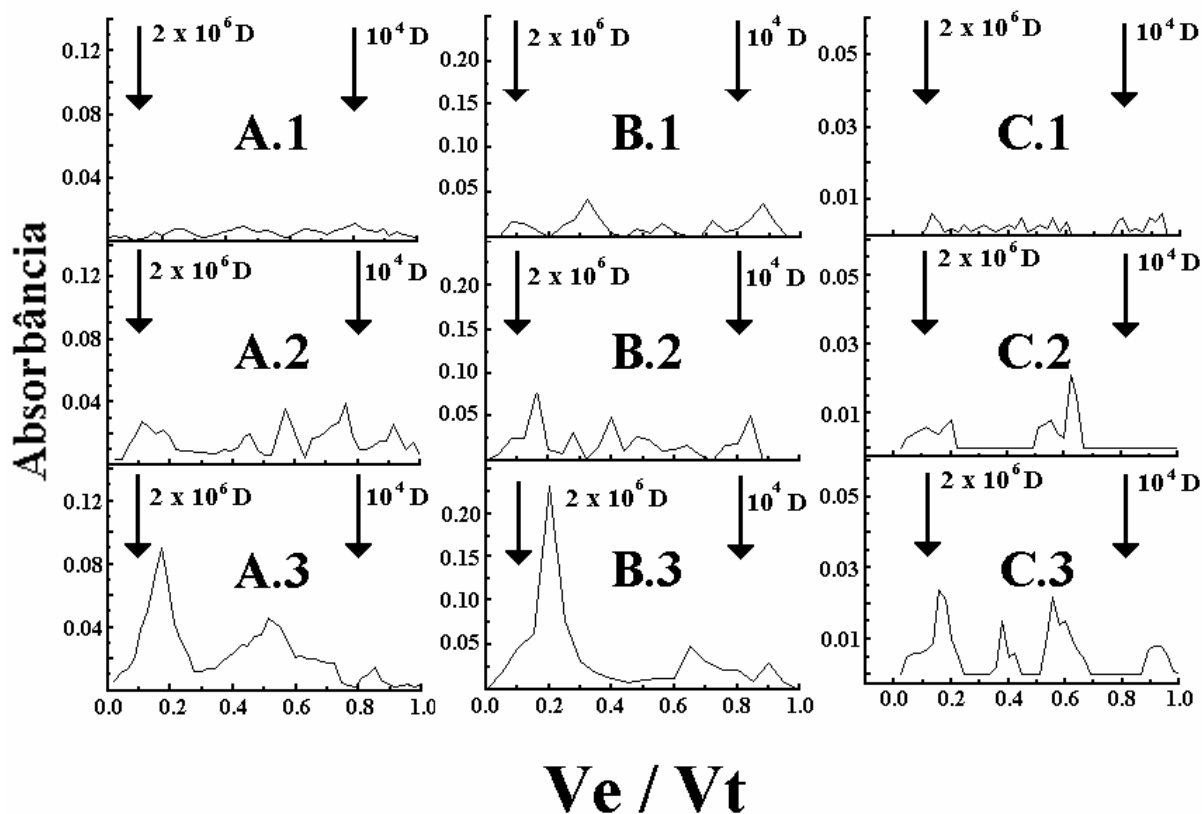


Figura 10: Cromatografia por filtração em coluna de gel Bio Rad[®] P-10 dos carboidratos liberados por *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (A), *Staurastrum orbiculare* (B) e *Thalassiosira* sp (C). (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento. As setas representam os dextrans utilizados como calibração da coluna: 2×10^6 D e 10^4 D.

4.1.2.3) Caracterização por HPLC-PAD dos carboidratos excretados.

Em *C. tetrapyrenoidosa* foram identificados os seguintes monossacarídeos, após a hidrólise da fração de alta massa molecular (AMM): fucose, ramnose, galactose, glicose, manose ou xilose (Figura 11a). Manose e xilose não foram separadas adequadamente porque as análises foram realizadas sem o sistema de adição de base após a coluna, que não estava disponível na época, e os açúcares aminados e ácidos também não foram detectados, pois estes componentes possuem cargas e foram retidos nas colunas de troca iônica. A análise destes componentes será mostrada mais adiante na caracterização dos polissacarídeos. A fração de massa molecular intermediária - IMM- (Figura 11b) apresentou basicamente a mesma composição monomérica da fração de alta massa molecular, e também apresentou um aumento significativo em função da idade da cultura, assim como a fração AMM (Tabela 2). A composição das frações AMM e IMM excretada após 44 dias de cultivo evidenciou uma composição semelhante, porém com proporções diferentes entre os monômeros, o que poderia ser resultado de um processo de quebra natural do polissacarídeo, ou polissacarídeos menores produzidos independentemente. A fração de baixa massa molecular somente foi detectada durante a primeira semana de cultivo (Figura 11c e Tabela 2). Nas idades celulares mais avançadas não se observou presença de qualquer tipo de açúcar livre, exceto daqueles detectados durante a primeira fase de crescimento, evidenciando a especialização desta espécie na excreção quase que exclusiva de carboidratos poliméricos.

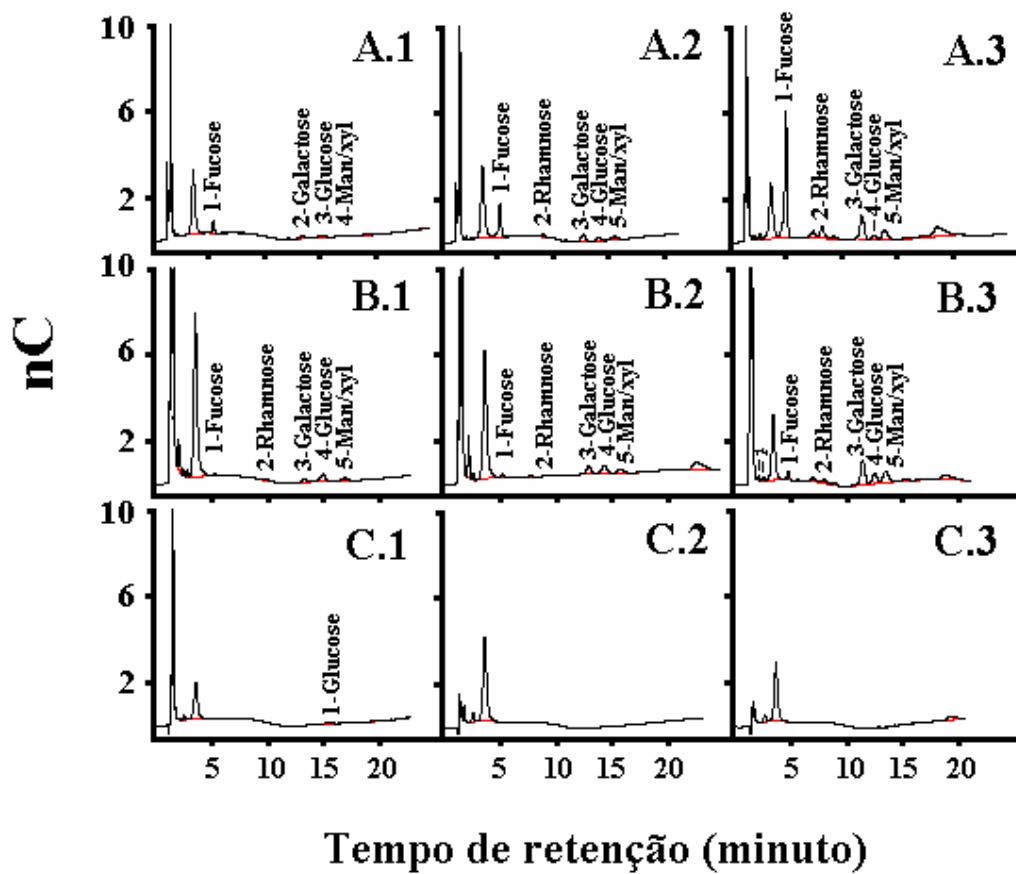


Figura 11: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *C. tetrapyrenoidosa* nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de massa molecular intermediária e (C) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento.

Tabela 2: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A), de massa molecular intermediária (B) e dos monossacarídeos livres (C) excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em diferentes fases de crescimento.

(A)

Tempo (dias)	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN /XIL	TOTAL
0	0,011	0	0,007	0,005	0,004	0,027
6	0,021	0	0,008	0,007	0,005	0,041
13	0,012	0	0,006	0,002	0,002	0,022
20	0,069	0,013	0,021	0,010	0,017	0,130
27	0,070	0,013	0,027	0,031	0,018	0,159
37	0,168	0,039	0,046	0,010	0,035	0,298
44	0,248	0,073	0,067	0,012	0,052	0,452

(B)

Tempo (dias)	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN /XIL	TOTAL
0	0,003	0	0,003	0,011	0,009	0,026
6	0,003	0,015	0,011	0,021	0,011	0,061
13	0,005	0	0,016	0,024	0,024	0,069
20	0,005	0,005	0,027	0,031	0,024	0,092
27	0,018	0,010	0,061	0,045	0,045	0,179
37	0,014	0,012	0,070	0,040	0,054	0,190
44	0,011	0,023	0,077	0,033	0,058	0,202

(C)

Tempo (dias)	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN /XIL	TOTAL
0	0	0	0	0,006	0	0,006
6	0	0	0	0,007	0	0,007
13	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0

Já em *S. orbiculare*, embora tenham sido identificados os mesmos monossacarídeos após a hidrólise da fração de alta massa molecular (Figura 12a), com exceção de arabinose, a proporção entre os monômeros é bastante diferente (Tabela 3). Enquanto *C. tetrapyrenoidosa* compôs a fração AMM com maiores proporções de fucose, ramnose, galactose e man/xil, *S. orbiculare* utilizou muito mais fucose que todos os demais monossacarídeos (Figura 12a, Tabela 3) para compor esta fração. A fração de baixa massa molecular esteve mais bem representada nas culturas de *S. orbiculare* do que nas de *C. tetrapyrenoidosa*. Como mostra a Tabela 3 e a Figura 12b, *S. orbiculare*

excretou maiores quantidades de polissacarídeos (fração AMM) e, paralelamente, excretou em menores quantidades os mesmos componentes dos polissacarídeos na forma de monossacarídeos livres, embora em diferentes proporções.

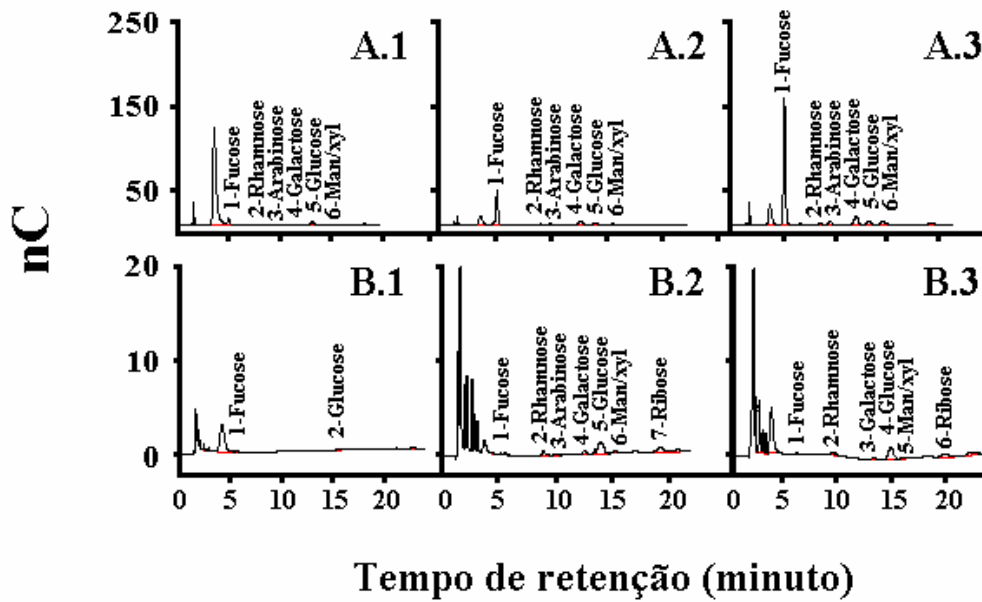


Figura 12: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *S. orbiculare* nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento.

Tabela 3: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A) e dos monossacarídeos livres (B) excretados por *S. orbiculare* em diferentes fases de crescimento.

(A)							
Tempo (dias)	FUC	RAM	ARA	GAL	GLI	MAN /XIL	TOTAL
0	0,492	0,026	0,021	0,077	0,158	0,067	0,84
3	0,254	0,019	0,012	0,048	0,127	0,054	0,51
10	0,414	0,039	0,021	0,085	0,118	0,052	0,73
16	0,712	0,059	0,042	0,130	0,143	0,101	1,19
22	1,137	0,089	0,075	0,193	0,200	0,134	1,83
28	0,625	0,020	0,017	0,060	0,232	0,078	1,03
36	1,85	0,195	0,117	0,241	0,257	0,164	2,82
42	1,86	0,255	0,178	0,427	0,285	0,215	3,22
49	2,62	0,180	0,177	0,363	0,244	0,211	3,79
58	9,63	0,770	0,649	1,275	0,540	0,752	13,6

(B)							
Tempo (dias)	FUC	RAM	ARA	GAL	GLI	MAN XIL	TOTAL
0	0,007	0	0	0	0,004	0	0,011
3	0,007	0	0	0	0,011	0	0,018
10	0,002	0	0	0	0,015	0	0,017
16	0	0,009	0	0,003	0,040	0	0,067
22	0,003	0,023	0	0,007	0,031	0	0,052
28	0,003	0,028	0	0,008	0,044	0	0,083
36	0,004	0,040	0	0,015	0,093	0	0,152
42	0,006	0,039	0	0,015	0,090	0,006	0,156
49	0,006	0,048	0,006	0,024	0,098	0,009	0,191
58	0,005	0,078	0,007	0,035	0,108	0,022	0,255

Thalassiosira sp também produziu maiores quantidades de polissacarídeos (fração AMM) em relação aos demais carboidratos (Tabela 4), e sua composição foi bastante diferente daqueles excretados por *S. orbiculare* e *C. tetrapyrenoidosa*. A análise por HPLC-PAD mostrou um expressivo aumento na excreção de carboidratos de todas as massas moleculares a partir da entrada da cultura na fase estacionária (Figuras 13 e Tabela 4). Os carboidratos de massa molecular intermediária possuíram uma composição muito semelhante aos de alta massa molecular, sendo possivelmente pedaços do polissacarídeo com massa molecular menor. Os carboidratos de baixa massa molecular também aumentaram com a entrada da cultura na fase estacionária, principalmente pela liberação de fucose e glicose (Figura 13 e Tabela 4).

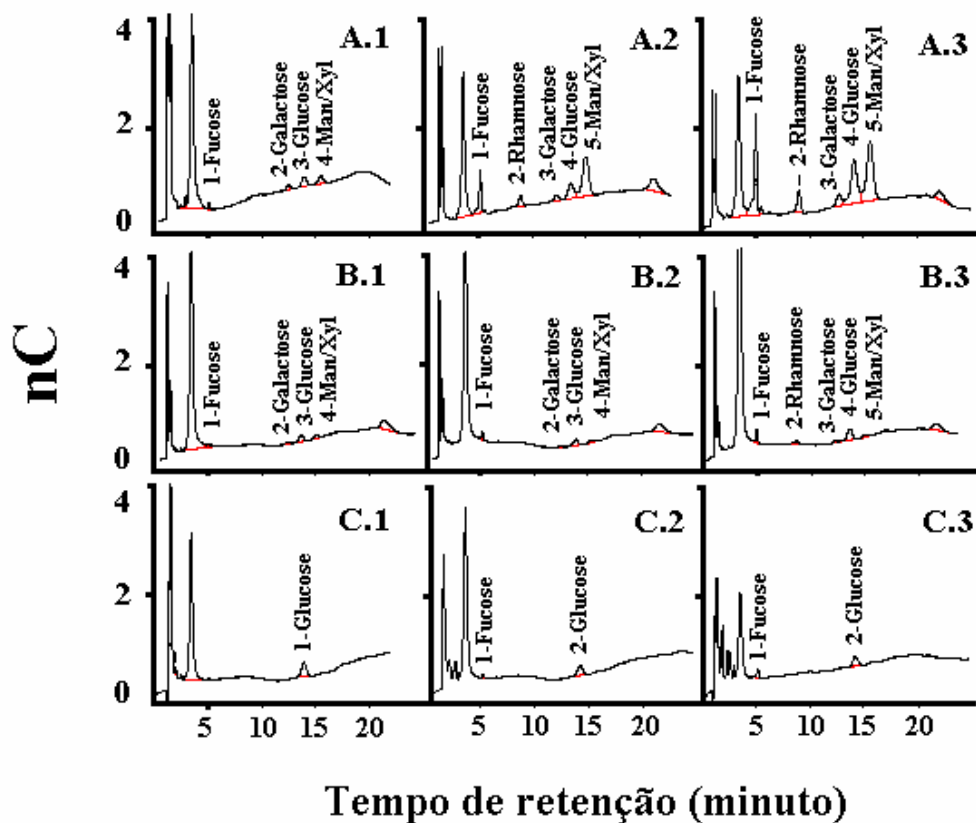


Figura 13: Análise por HPLC-PAD dos carboidratos liberados por *Thalassiosira* sp nas diferentes fases de crescimento: (A) Fração de alta massa molecular, (B) Fração de massa molecular intermediária e (C) Fração de baixa massa molecular. (1) Fase exponencial inicial, (2) Fase exponencial final e (3) Fase estacionária de crescimento.

Tabela 4: Quantificação dos monossacarídeos (mg/L) identificados após a hidrólise dos carboidratos de alta massa molecular (A), de massa molecular intermediária (B) e dos monossacarídeos livres (C) excretados por *Thalassiosira* sp em diferentes fases de crescimento.

(A)						
Tempo	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN/XIL	TOTAL
INICIAL	0,10 x 10 ⁻²	0	0,10 x 10 ⁻²	0,09 x 10 ⁻²	0,37 x 10 ⁻²	0,66 x 10 ⁻²
7 DIAS	0,16 x 10 ⁻²	0,14 x 10 ⁻²	0,08 x 10 ⁻²	0,32 x 10 ⁻²	0,70 x 10 ⁻²	1,40 x 10 ⁻²
14 DIAS	0,85 x 10 ⁻²	0,54 x 10 ⁻²	0,18 x 10 ⁻²	0,66 x 10 ⁻²	2,70 x 10 ⁻²	4,93 x 10 ⁻²
20 DIAS	2,66 x 10 ⁻²	1,45 x 10 ⁻²	0,33 x 10 ⁻²	1,30 x 10 ⁻²	5,16 x 10 ⁻²	10,9 x 10 ⁻²
25 DIAS	3,16 x 10 ⁻²	1,55 x 10 ⁻²	0,60 x 10 ⁻²	2,70 x 10 ⁻²	5,40 x 10 ⁻²	13,4 x 10 ⁻²
(B)						
Tempo	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN/XIL	TOTAL
INICIAL	0,06 x 10 ⁻²	0	0,04 x 10 ⁻²	0,22 x 10 ⁻²	0,15 x 10 ⁻²	0,47 x 10 ⁻²
7 DIAS	0,05 x 10 ⁻²	0	0,09 x 10 ⁻²	0,22 x 10 ⁻²	0,11 x 10 ⁻²	0,47 x 10 ⁻²
14 DIAS	0,12 x 10 ⁻²	0	0,03 x 10 ⁻²	0,21 x 10 ⁻²	0,11 x 10 ⁻²	0,47 x 10 ⁻²
20 DIAS	0,38 x 10 ⁻²	0,16 x 10 ⁻²	0,08 x 10 ⁻²	0,27 x 10 ⁻²	0,11 x 10 ⁻²	1,00 x 10 ⁻²
25 DIAS	0,26 x 10 ⁻²	0,18 x 10 ⁻²	0,07 x 10 ⁻²	0,51 x 10 ⁻²	0,19 x 10 ⁻²	1,21 x 10 ⁻²
(C)						
Tempo	FUC	RAM	GAL	GLI	MAN/XIL	TOTAL
INICIAL	0	0	0	0,47 x 10 ⁻²	0	0,47 x 10 ⁻²
7 DIAS	0	0	0	0,22 x 10 ⁻²	0	0,22 x 10 ⁻²
14 DIAS	0,06 x 10 ⁻²	0	0	0,36 x 10 ⁻²	0	0,42 x 10 ⁻²
20 DIAS	0,15 x 10 ⁻²	0	0	0,47 x 10 ⁻²	0	0,62 x 10 ⁻²
25 DIAS	0,20 x 10 ⁻²	0	0	0,44 x 10 ⁻²	0	0,64 x 10 ⁻²

4.1.2.4) Caracterização dos polissacarídeos.

4.1.2.4.1) Cromatografia de troca iônica em coluna de gel DEAE Sepharose.

A Figura 14 mostra as frações obtidas com a separação dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp no gel para troca iônica DEAE-Sepharose “Fast Flow”. Pode-se observar que os polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* e *Thalassiosira* sp foram separados em duas frações com diferentes graus de acidez, uma eluída com NaCl 0,5 M e outra com NaCl 1 M, ambas com significativa representatividade e composição bastante diferente, como será apresentado mais adiante. Já o polissacarídeo excretado por *S. orbiculare* teve a maior

parte eluída com NaCl 0,5 M, e uma pequena parte eluída com NaCl 1 M, e a composição sofreu pouca variação. As frações neutras das três algas em estudo, eluídas com água destilada não apresentaram quantidades significativas de carboidratos. As frações foram armazenadas, dializadas e liofilizadas antes de proceder à análise da composição e das ligações glicosídicas presentes nas mesmas.

4.1.2.4.2) *Análise da composição das frações dos polissacarídeos.*

A Tabela 5 mostra a composição de cada uma das frações separadas pela cromatografia de troca iônica, após metanólise e análise por cromatografia gasosa. Pode-se notar que a composição das frações foi significativamente diferente, o que justificou a análise das ligações glicosídicas em separado para cada uma delas. É interessante ressaltar a alteração das proporções de xilose e ramnose no caso das frações eluídas com 0,5 e 1 M do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp e de ácido glicorônico no caso do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Neste último, observou-se uma fração bastante peculiar com quase 50 % de ácido glicorônico. Todas as amostras passaram por redução carboxílica antes de serem metiladas, exceto *Thalassiosira* sp eluída com NaCl a 0,5 M.

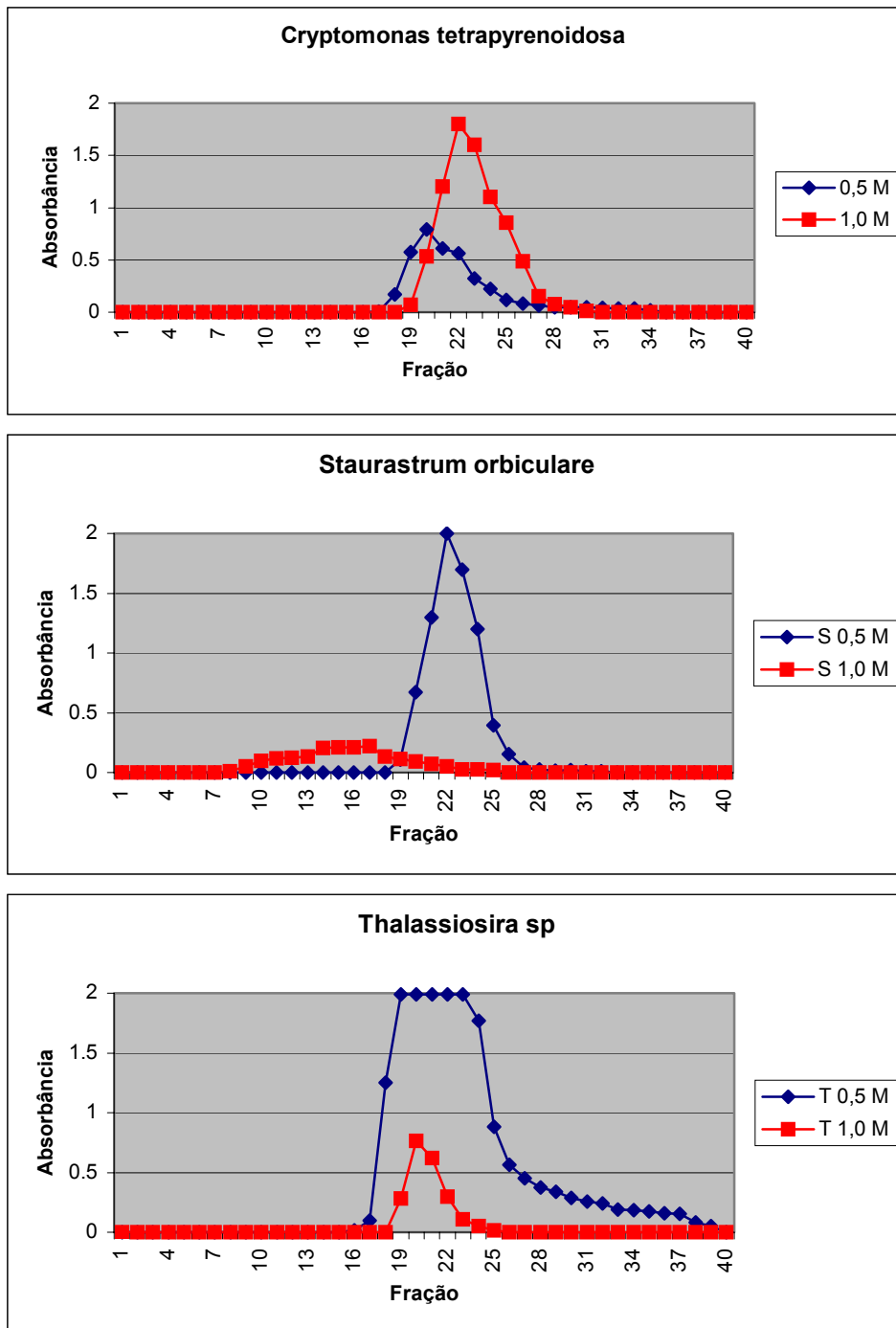


Figura 14: Cromatografia em coluna de gel DEAE-Sepharose “Fast Flow” Pharmacia® dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp, eluídos com NaCl a 0,5 e 1,0 M. O fluxo foi de 1 mL por 3 minutos em uma coluna de 100 mL.

Tabela 5: Composição das frações separadas pela cromatografia de troca iônica após metanólise e análise em cromatografia gasosa. **C** – *C. tetrapyrenoidosa*, **S** – *S. orbiculare* e **T** – *Thalassiosira* sp. **0,5M** – Fração eluída com NaCl a 0,5 M e **1,0M** – Fração eluída com NaCl a 1,0 M.

	C 0,5M	C 1,0M	S 0,5M	S 1,0M	T 0,5M	T 1,0M
Ara	0%	0%	2,1%	2,4%	0%	0%
Ram	9,0%	0,8%	4,1%	1,8%	18,3%	3,3%
Fuc	24,3%	8,6%	39,8%	43,1%	7,7%	2,1%
Xil	4,7%	0,4%	7,6%	9,2%	6,2%	19,5%
Man	15,4%	0,8%	1,3%	0,7%	51,8%	57,4%
Gal	13,7%	36,0%	10,9%	8,7%	4,4%	4,2%
Gli	3,5%	0,5%	4,4%	1,8%	3,8%	0,8%
Ac. gli	4,1%	47,0%	18,6%	22,6%	1,7%	5,5%
Ac. gal	0%	4,5%	10,3%	9,7%	0	4,9%
N-ac-gal	8,6%	0,27%	0%	0%	2,0%	0%
N-ac-gli	16,8%	1,1%	0,59%	0%	3,8%	2,0%

4.1.2.4.3) Análise das ligações glicosídicas.

A Tabela 6 mostra as ligações glicosídicas identificadas por meio da metilação e da análise em GC-MS, bem como os fragmentos encontrados e utilizados para identificar a posição da ligação glicosídica nos componentes de cada fração do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. No caso da fração eluída com NaCl a 0,5 M, percebe-se uma grande complexidade em termos de componentes principais, uma vez que as ligações glicosídicas mais abundantes são Fucose terminal (12 %), Manose terminal (11,7 %), Ramnose terminal (8,1 %) e Galactose terminal (6,1 %). Isso indica que as porções terminais contam com proporções semelhantes destes quatro monossacarídeos. De maneira geral essa fração é composta por uma porção ramificada, composta majoritariamente por fucose e ácido glicorônico, que representam, respectivamente 8,8 % e 4,1 % de todas as ligações deste polissacarídeo e possuem ligações glicosídicas em três carbonos. Possivelmente os açúcares aminados detectados

na cromatografia gasosa integrem essa porção ramificada, uma vez que os mesmos não foram detectados após a metilação e, quando se apresentam ramificados, podem precisar de uma hidrólise mais forte para que sejam encontrados. Desta porção ramificada partem cadeias lineares com dois carbonos ligados e as porções terminais, que representam a maior parte desta fração, o que reforça a hipótese dos açúcares aaminados integrarem a porção ramificada, uma vez que normalmente as porções terminais possuem a mesma ordem de grandeza das porções ramificadas. Uma outra hipótese para o excesso de porções terminais em relação às ramificadas é a existência de uma base protéica no polissacarídeo, da qual poderiam partir mais alguns açúcares terminais, já que esta fração conta com 10 % de proteínas. Já a fração eluída com NaCl 1,0 M apresentou uma composição mais homogênea, uma vez que duas ligações glicosídicas compõem mais de 60 % desta fração (Ácido glicorônico 1,3- 36,8 % e Galactose 1,3- 28 %). Essa fração se apresenta, de maneira geral, como uma grande cadeia linear composta por ácido glicorônico, de onde partem cadeias também lineares de galactose.

Tabela 6: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS das frações eluídas com NaCl a 0,5 (C 0,5M) e 1,0 M (C 1,0M) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (% M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração (% T).

Açúcar	Ligações glicosídicas	Fragmentos (UM)	C 0,5 M		C 1,0 M	
			% M	% T	% M	% T
Ram	T	118,131,162,175	90,5	8,1	48,7	0,4
	1,4	118,162,203	9,5	0,9	0	0
	1,2,3	131,262	0	0	51,3	0,4
	Total		100	9,0	100	0,8
Fuc	T	118,131,162,175	48,9	12,0	43,5	3,7
	1,3	118,131,234	14,5	3,5	13,5	1,2
	1,4	118,162,203	0	0	43,0	3,7
	1,2,3	131,262	29,9	7,2	0	0
	1,3,4	118,275	6,7	1,6	0	0
	Total		100	24,3	100	8,6
Xil	T	117,118,161,162	70,1	3,4	43,9	0,18
	1,2	117,190	14,2	0,6	0	0
	1,4	118,189	14,2	0,6	56,1	0,22
	1,3,4		1,5	0,1		
	Total		100	4,7	100	0,4
Man	T	45,118,161,162,205	76,3	11,7	0	0
	1,3	45,118,161,234,275	12,5	2,0	0	0
	1,4	45,118,162,233	8,6	1,3	100	0,8
	1,2,3	45,161,262	2,6	0,4	0	0
	Total		100	15,4	100	0,8
Gal	T	45,118,161,162,205	44,2	6,1	22,2	8,0
	1,2	45,161,190	2,1	0,3	0	0
	1,3	45,118,161,234,275	31,3	4,3	77,8	28,0
	1,4	45,118,162,233	16,2	2,2	0	0
	1,6	118,162,189,233	6,2	0,8	0	0
	Total		100	13,7	100	36,0
Gli	1,2,4,6	190,261	100	3,5	0	0
	Total		100	3,5	0	0
Ac. glic.	T	47,118,162,163,207	0	0	13,6	6,4
	1,3	47,118,163,234,277	0	0	78,4	36,8
	1,2,3	47,163,262	0	0	1,4	0,7
	1,2,4	47,162,263	100	4,1	0	0
	1,3,4	47,118,307	0	0	6,6	3,1
	Total		100	4,1	100	47,0

A Tabela 7 mostra as ligações glicosídicas identificadas por meio da metilação e da análise em GC-MS, bem como os fragmentos encontrados e utilizados para identificar a posição da ligação glicosídica nos componentes da fração eluída com NaCl a 0,5 M do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. De maneira geral este polissacarídeo foi composto majoritariamente por fucose em cadeias lineares com ligações nos carbonos 1 e 3, contando também com uma porção ramificada significativa, composta basicamente por ácido glicorônico e também fucose. As porções terminais foram também compostas, em sua maioria por fucose, evidenciando a complexidade das ligações deste monômero neste polissacarídeo. Xilose e galactose compuseram também significativamente as porções terminais dessa fração. Foram também detectados significativamente em cadeias lineares, ácido galacturônico, galactose e ácido glicorônico, demonstrando a complexidade deste polissacarídeo.

Tabela 7: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS da fração eluídas com NaCl a 0,5 (S 0,5M) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (%M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração.

	Ligações glicosídicas	Fragmentos (UM)	S 0,5 M %M	S 0,5 M %T
Araf	T	45,118,161	17,6	0,3
	1,2	45,161,190	82,4	1,8
	Total		100	2,1
Ram	T	118,131,162,175	72,5	2,9
	1,3	118,131,234	27,5	1,2
	Total		100	4,1
Fuc	T	118,131,162,175	34,5	13,7
	1,3	118,131,234	48,4	19,3
	1,2,4	190,203	3,5	1,4
	1,3,4	118,275	13,6	5,4
	Total		100	39,8
Xyl	T	117,118,161,162	66,0	5,0
	1,3	117,118	2,6	0,2
	1,4	118,189	31,4	2,4
	Total		100	7,6
Gal	T	45,118,161,162,205	41,2	4,5
	1,4	45,118,162,233	14,4	1,5
	1,6	118,162,189,233	36,9	4,0
	1,3,6	118,189,234	7,5	0,9
	Total		100	10,9
Gli	T	45,118,161,162,205	17,4	0,8
	1,4	45,118,162,233	66,0	2,9
	1,4,6	118,261	16,6	0,7
	Total		100	4,4
Ac. glic.	T	47,118,162,163,207	3,6	0,6
	1,4	47,118,162,235	40,4	7,6
	1,2,4	47,162,263	56,0	10,4
	Total		100	18,6
Ac galac.	T	47,118,162,163,207	26,8	2,8
	1,3	47,118,163,234,277	35,6	3,6
	1,4	47,118,162,235	37,6	3,9
	Total		100	10,3

A Tabela 8 mostra as ligações glicosídicas identificadas por meio da metilação e da análise em GC-MS, bem como os fragmentos encontrados e utilizados para identificar a posição da ligação glicosídica nos componentes de cada fração do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. No caso da fração eluída com NaCl a 0,5 M, nota-se que o polissacarídeo foi composto majoritariamente por manose terminal (15,9 %) e ramnose ligada nos carbonos 1 e 3. Pode-se perceber a extrema complexidade de manose nesta fração, uma vez que foram identificados sete diferentes tipos de ligações glicosídicas para este monossacarídeo. Em termos gerais pode-se dizer que houve uma porção ramificada composta principalmente por manose, de onde partem cadeias lineares compostas por ramnose, fucose, manose, galactose, xilose e glicose, além de significativas porções terminais de manose. Já a fração eluída com NaCl 1,0M apresentou um padrão bem mais simples que a eluída com NaCl a 0,5M. Este polissacarídeo foi essencialmente linear, uma vez que não foi identificada nenhuma ligação em três carbonos. A ligação preponderante foi manose ligada nos carbonos 1 e 4 (35,4 %) seguida por xilose também ligada nos carbonos 1 e 4 (13,3 %). Manose ligada nos carbonos 1 e 2 também apresentou significativa proporção (10,3 %). As principais porções terminais são representadas por manose e pelos ácidos urônicos.

Tabela 8: Ligações glicosídicas identificadas por meio de redução carboxílica, metilação e análise dos fragmentos (Unidades de Massa) em GC-MS das frações eluídas com NaCl a 0,5 (T 0,5M) e 1,0 M (T 1,0M) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. São apresentadas as proporções de ligações glicosídicas em relação às ligações do próprio monossacarídeo (%M) e em relação a todas as ligações glicosídicas da respectiva fração (%T).

	Ligações glicosídicas	Fragmentos (UM)	T 0,5 M %M	T 0,5 M %T	T 1,0 M %M	T 1,0M %T
Ram	T	118,131,162,175	10,7	1,9	0	0
	1,2	131,190	12,6	2,4	0	0
	1,3	118,131,234	69,1	12,6	100	3,3
	1,2,4	190,203	4,4	0,8	0	0
	1,3,4		3,2	0,6		
	Total		100	18,3	100	3,3
Fuc	T	118,131,162,175	27,3	2,1	0	0
	1,3	118,131,234	72,7	5,6	100	2,1
	Total		100	7,7	100	2,1
Xyl	T	117,118,161,162	48,0	3,0	32,0	6,2
	1,2	117,190	37,7	2,3	0	0
	1,4	118,189	0	0	68,0	13,3
	1,2,4	189,190	14,3	0,9	0	0
	Total		100	6,2	100	19,5
Man	T	45,118,161,162,205	30,6	15,9	20,5	11,7
	1,2	45,161,190,205	11,6	6,0	18,0	10,3
	1,3	45,118,161,234,275	6,1	3,2	0	0
	1,4	45,118,162,233	14,9	7,7	61,5	35,4
	1,3,4	45,118,305	6,6	3,5	0	0
	1,4,6	118,261	20,8	10,8	0	0
	1,3,4,6	118,333	9,4	4,9	0	0
Total		100	52,0	100	57,4	
Gal	T	45,118,161,162,205	73,1	3,3	33	1,4
	1,2	45,161,190,205	24,9	1,1	0	0
	1,4	45,118,162,233	0	0	67	2,8
	Total		100	4,4	100	4,2
Gli	T	45,118,161,162,205	56,5	2,1	0	0
	1,2	45,161,190,205	43,5	1,7	0	0
	Total		100	3,8	0	0
Ac. gli	T	47,118,162,163,207	0	0	100	5,5
	Total		0	0	100	5,5
Ac. gal	T	47,118,162,163,207	0	0	100	4,5
	Total		0	0	100	4,5

4.2) EXPERIMENTO II.

4.2.1) Cultivos conjuntos alga/bactéria.

4.2.1.1) Crescimento das espécies fitoplanctônicas.

Como pode ser observado pela análise das Figuras 15 e 16 e das Tabelas 9 e 10, o crescimento das populações de *C. tetrapyrenoidosa* e *S. orbiculare*, respectivamente, não foi afetado pela contaminação com bactérias. Comparando pelo teste "t" de student, a densidade celular da cultura axênica de *C. tetrapyrenoidosa* não apresentou diferença significativa em relação à réplica contaminada em nenhuma das amostragens, tendo os valores de "p" variado entre 0,0888 e 0,04123 (Tabela 9). Em *S. orbiculare* foram detectadas diferenças significativas, apontando para uma densidade celular mais expressiva da cultura contaminada apenas nos 8° e 14° dias de cultivo. Na maioria das amostragens não foi detectada diferença significativa, levando a crer que, de maneira geral, a presença de bactérias não estimulou o crescimento de *S. orbiculare* (Tabela 10). Contudo, *Thalassiosira* sp apresentou um comportamento diferenciado em relação às outras duas espécies. Conforme pode ser observado na Figura 17, e também na Tabela 11, a cultura contaminada alcançou uma densidade celular significativamente superior à alcançada pela cultura axênica. Além disso, a fase exponencial de crescimento foi prolongada em três dias na cultura contaminada. As diferenças foram caracterizadas a partir do 11° dia de cultivo (Tabela 11), com os valores de "p" variando entre 0,0014 e valores inferiores a 0,0001.

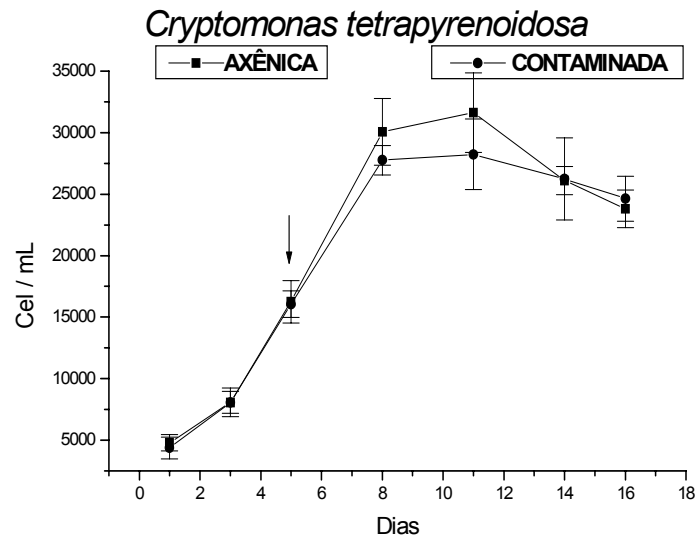


Figura 15: Curva de crescimento de duas culturas de *C. tetrapyrenoidosa*: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão (n=6). A seta indica o momento da contaminação.

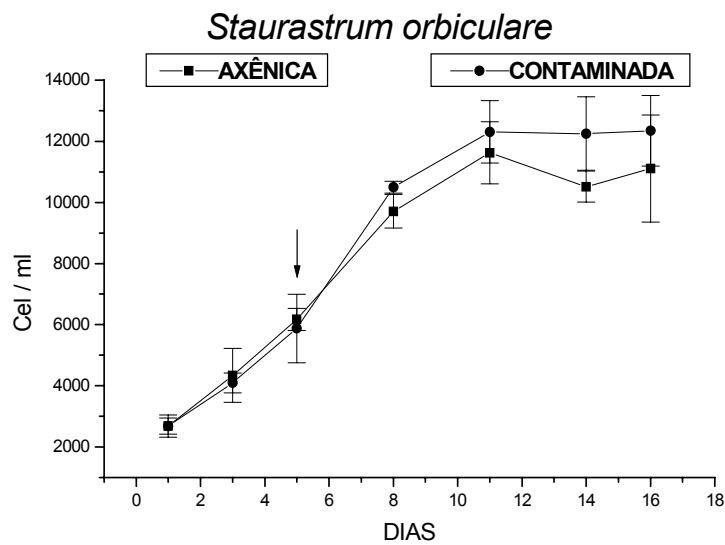


Figura 16: Curva de crescimento de duas culturas de *S. orbiculare*: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão (n=6). A seta indica o momento da contaminação.

Tabela 9: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *C. tetrapyrenoidosa*: axênica e contaminada.

Tempo (dia)	Densidade celular média		"t" student
	Axênica	Contaminada	P
1	4791,50 ± 675,02	1374,66 ± 884,10	0,3803
3	9072,83 ± 893,07	8072,00 ± 1159,50	0,9996
5	17916,33 ± 4287,8	16041,50 ± 1076,3	0,3234
8	30052,00 ± 2712,9	27760,16 ± 1208,9	0,0880
11	31614,33 ± 3232,2	28229 ± 2868,50	0,0840
14	26093,33 ± 1148,1	26849,83 ± 3336,4	0,9156
16	23802,00 ± 1536,3	24635,16 ± 1826,7	0,4125

Tabela 10: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *S. orbiculare*: axênica e contaminada.

Tempo (dia)	Densidade celular média		"t" student
	Axênico	Contaminado	P
1	2681,83 ± 262,33	3015,50 ± 1092,90	0,4838
3	4339,50 ± 880,82	4097,66 ± 327,58	0,5426
5	6171,33 ± 364,84	5840,33 ± 1103,60	0,5013
8	9708,33 ± 544,97	10494,83 ± 192,78	0,0076
11	11583 ± 921,68	11819,16 ± 935,09	0,6689
14	10516,83 ± 506,62	12208,33 ± 1135,3	0,0076
16	11107,8 ± 1762,50	12788,6 ± 11992,0	0,0823

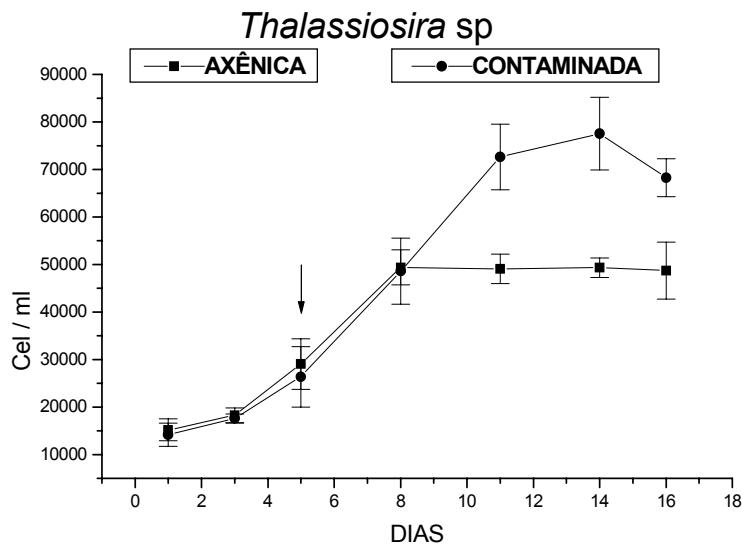


Figura 17: Curva de crescimento de duas culturas de *Thalassiosira* sp: uma em condições axênicas e a outra contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão n=6. A seta indica o momento da contaminação.

Tabela 11: Densidade celular média (cel/mL), desvios padrões e o valor de "p" (teste "t" de student) em relação ao tempo de cultivo (dias) de duas populações de *Thalassiosira* sp: axênica e contaminada.

Tempo (dia)	Densidade celular média		Contaminada p
	Axênica	Contaminada	
1	15208,00 ± 2293,7	14211,33 ± 2458,5	0,4844
3	18281,00 ± 1565,4	17551,33 ± 1034,8	0,3636
5	29062,33 ± 5332,8	26354,00 ± 6332,8	0,4416
8	49374,83 ± 3692,3	48593,50 ± 6995,6	0,8137
11	47708,00 ± 3753,5	72656,16 ± 6885,6	< 0,0001
14	49422,83 ± 1906,7	82395,6 ± 18395,0	0,0014
16	48749,83 ± 6011,1	68281,00 ± 3995,8	< 0,0001

O tempo de duplicação não foi afetado significativamente pela presença de bactérias em nenhuma das espécies estudadas. As células axênicas de *C. tetrapyrenoidosa* tiveram um tempo de duplicação igual a 2,68 dias, enquanto as contaminadas levaram 2,64 dias para se dividirem. *S. orbiculare* levou 4,03 dias para se dividir, em condições axênicas e 4,06 dias quando contaminado com bactérias de Barra Bonita. *Thalassiosira* sp levou 3,5 dias para se dividir em condições axênicas e 3,9 dias contaminada com bactérias. O tempo de duplicação foi determinado pela equação descrita por Fogg (1975). As concentrações de clorofila-a são mostradas nas Figuras 18, 19 e 20 e seguiram o mesmo padrão das densidades celulares das três espécies estudadas.

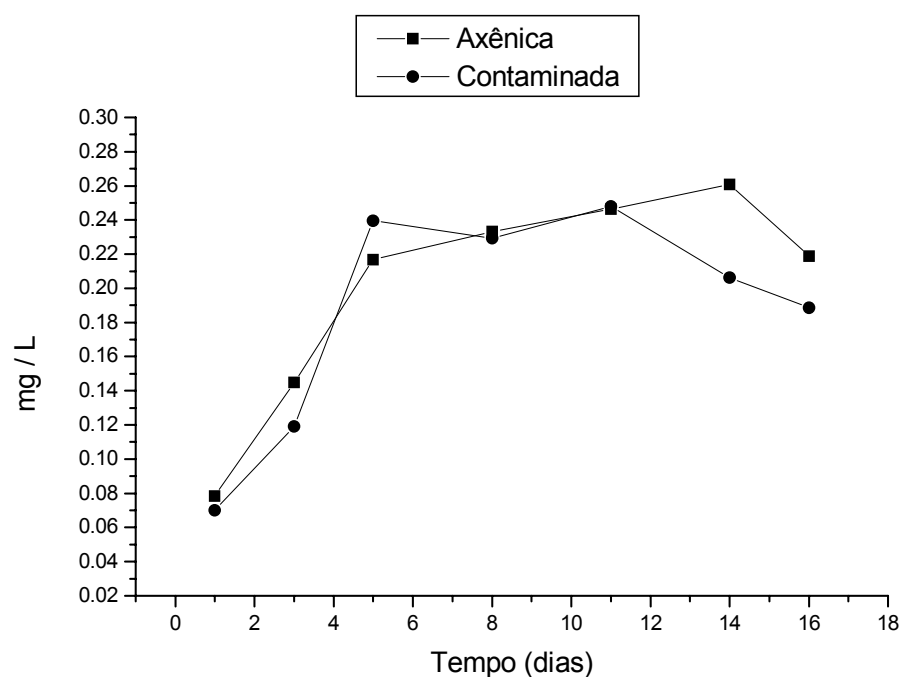


Figura 18: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de cultivo.

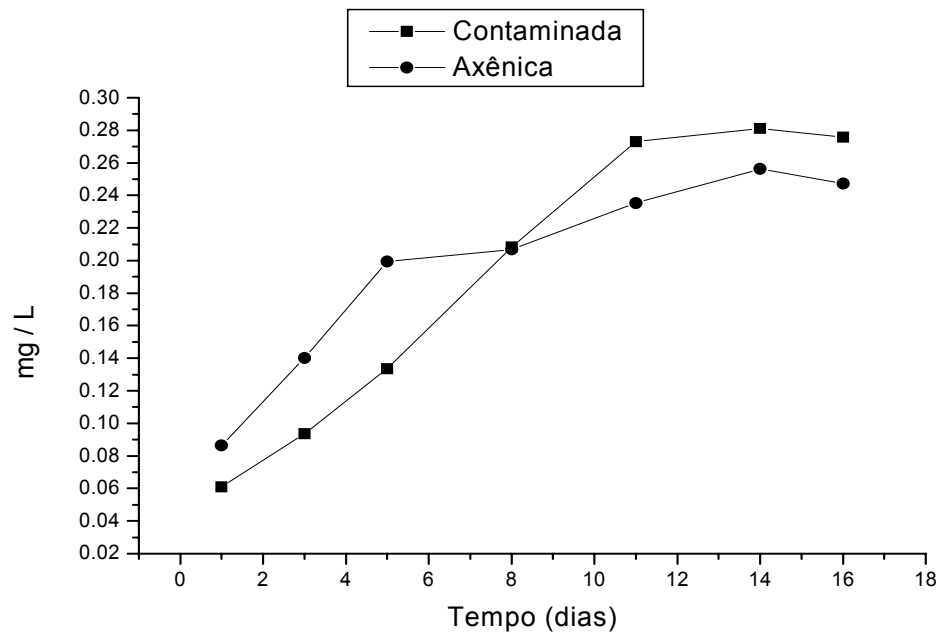


Figura 19: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*, em função do tempo de cultivo.

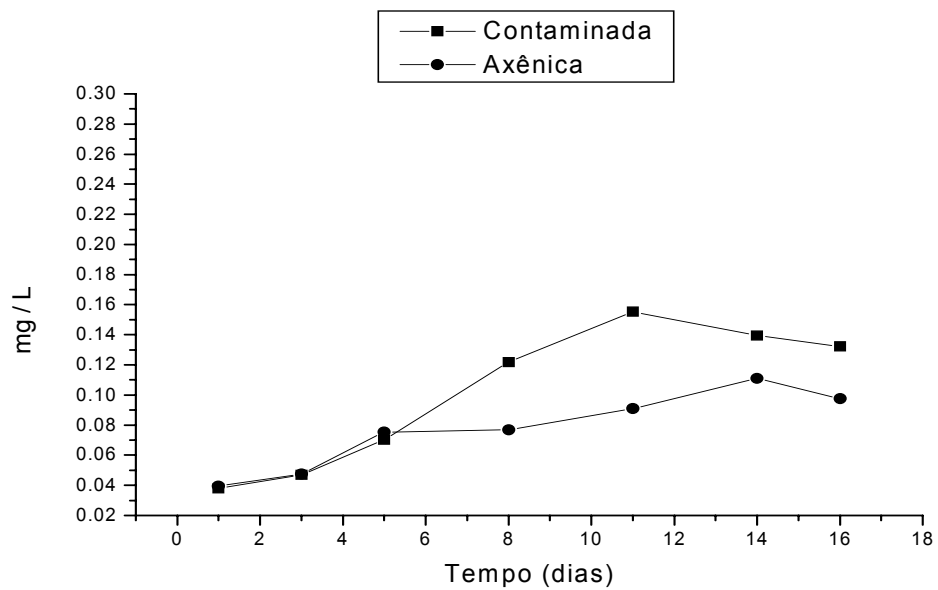


Figura 20: Variação das concentrações de clorofila-a nas culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo.

4.2.1.2) Excreção de carboidratos.

A comparação entre a concentração de carboidratos totais dissolvidos nas culturas axênicas e contaminadas mostrou que as bactérias planctônicas do Reservatório de Barra Bonita são capazes de degradar os carboidratos totais, incluindo os poliméricos, excretados pelas três espécies estudadas, como pode ser observado nas Tabelas 12 a 17, e nas Figuras 21, 22 e 23. A inoculação da população bacteriana do Reservatório nas culturas algais ocorreu no 5º dia de cultivo. As amostras para a determinação da concentração de carboidratos totais excretados foram feitas com as culturas nas idades de 5, 11, 14 e 16 dias (ou inicial, 6, 9 e 11 dias após a contaminação).

Tabela 12: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º dia	9º dia	11º dia
Fucose	0,238 ± 0,004	0,284 ± 0,004	0,690 ± 0,009	0,791 ± 0,160
Ramnose	0,011 ± 0,010	0,018 ± 0,015	0,039 ± 0,007	0,075 ± 0,002
Galactose	0,214 ± 0,050	0,222 ± 0,020	0,617 ± 0,040	0,670 ± 0,160
Glicose	0,099 ± 0,040	0,143 ± 0,010	0,175 ± 0,030	0,196 ± 0,050
Manose/xilose	0,069 ± 0,030	0,077 ± 0,007	0,114 ± 0,040	0,161 ± 0,040
Total	0,632 ± 0,110	0,745 ± 0,080	1,600 ± 0,121	1,880 ± 0,410

Tabela 13: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º. dia	9º. dia	11º. dia
Fucose	0,288 ± 0,010	0,391 ± 0,040	0,517 ± 0,040	0,547 ± 0,010
Ramnose	0,013 ± 0,010	0,052 ± 0,010	0,047 ± 0,007	0,039 ± 0,010
Galactose	0,250 ± 0,050	0,304 ± 0,040	0,374 ± 0,090	0,342 ± 0,070
Glicose	0,094 ± 0,060	0,076 ± 0,010	0,129 ± 0,030	0,078 ± 0,020
Manose/xilose	0,077 ± 0,030	0,081 ± 0,020	0,072 ± 0,010	0,082 ± 0,020
Total	0,663 ± 0,016	0,905 ± 0,100	1,138 ± 0,170	1,090 ± 0,100

Tabela 14: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º. dia	9º. dia	11º. dia
Fucose	0,140 ± 0,026	0,234 ± 0,0005	0,297 ± 0,012	0,317 ± 0,015
Ramnose	0,024 ± 0,006	0,017 ± 0,006	0,024 ± 0,006	0,027 ± 0,006
Arabnose	0,007 ± 0,006	0,008 ± 0,007	0,012 ± 0,008	0,014 ± 0,005
Galactose	0,050 ± 0,001	0,052 ± 0,004	0,076 ± 0,005	0,118 ± 0,020
Glicose	0,101 ± 0,002	0,095 ± 0,003	0,132 ± 0,010	0,165 ± 0,030
Manose/xilose	0,046 ± 0,003	0,041 ± 0,004	0,087 ± 0,044	0,100 ± 0,040
Total	0,370 ± 0,012	0,448 ± 0,004	0,630 ± 0,043	0,742 ± 0,090

Tabela 15: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º. dia	9º. dia	11º. dia
Fucose	0,156 ± 0,009	0,246 ± 0,010	0,176 ± 0,025	0,088 ± 0,001
Ramnose	0,006 ± 0,010	0,022 ± 0,006	0,029 ± 0,010	0,030 ± 0,007
Arabnose	0,004 ± 0,007	0,023 ± 0,004	0,027 ± 0,021	0,004 ± 0,007
Galactose	0,049 ± 0,008	0,046 ± 0,007	0,057 ± 0,007	0,027 ± 0,001
Glicose	0,116 ± 0,004	0,033 ± 0,003	0,048 ± 0,004	0,036 ± 0,001
Manose/xilose	0,036 ± 0,003	0,063 ± 0,003	0,055 ± 0,009	0,050 ± 0,013
Total	0,368 ± 0,021	0,434 ± 0,032	0,393 ± 0,040	0,237 ± 0,029

Tabela 16: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura axênica de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º. dia	9º. dia	11º. dia
Fucose	0,026 ± 0,003	0,044 ± 0,005	0,029 ± 0,004	0,081 ± 0,008
Ramnose	0,017 ± 0,012	0,037 ± 0,009	0,021 ± 0,002	0,053 ± 0,005
Galactose	0,032 ± 0,019	0,023 ± 0,012	0,026 ± 0,013	0,061 ± 0,017
Glicose	0,181 ± 0,038	0,203 ± 0,012	0,129 ± 0,027	0,215 ± 0,008
Manose/xilose	0,152 ± 0,027	0,239 ± 0,010	0,169 ± 0,022	0,313 ± 0,007
Total	0,409 ± 0,093	0,548 ± 0,037	0,375 ± 0,060	0,725 ± 0,026

Tabela 17: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração (mg/L) dos carboidratos totais excretados por uma cultura contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5º dia de cultivo			
	Inicial	6º. dia	9º. dia	11º. dia
Fucose	0,054 ± 0,022	0,110 ± 0,003	0,141 ± 0,009	0,163 ± 0,006
Ramnose	0,034 ± 0,005	0,088 ± 0,009	0,106 ± 0,002	0,132 ± 0,052
Galactose	0,088 ± 0,026	0,039 ± 0,002	0,035 ± 0,002	0,037 ± 0,002
Glicose	0,221 ± 0,020	0,073 ± 0,009	0,038 ± 0,002	0,043 ± 0,007
Manose/xilose	0,155 ± 0,023	0,284 ± 0,036	0,142 ± 0,019	0,154 ± 0,031
Total	0,486 ± 0,017	0,594 ± 0,042	0,464 ± 0,022	0,529 ± 0,084

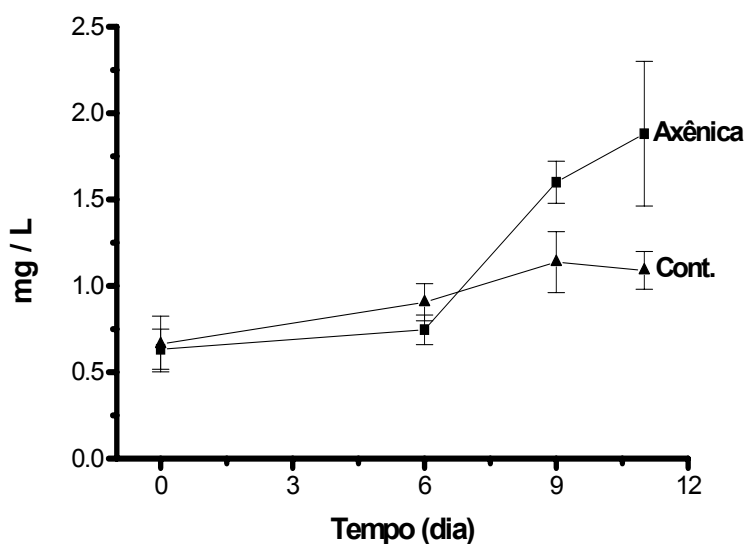


Figura 21: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

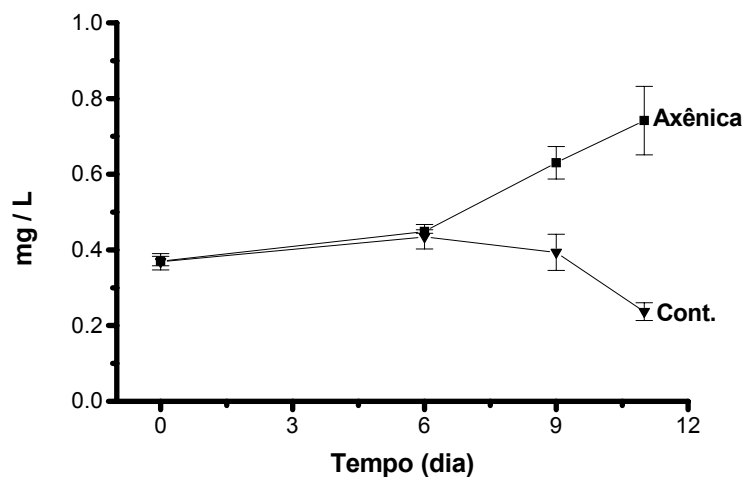


Figura 22: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *S. orbiculare*. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

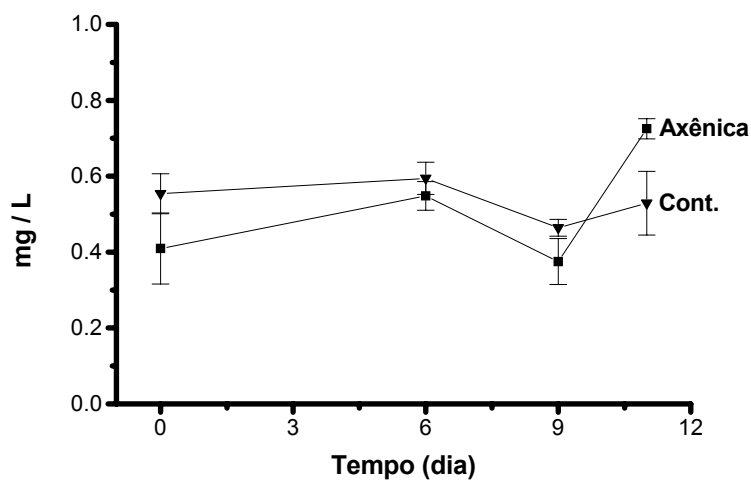


Figura 23: Variação, após a contaminação, das concentrações dos carboidratos totais em relação ao tempo de cultivo de uma cultura axênica e outra contaminada de *Thalassiosira* sp. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

A excreção de carboidratos totais foi confirmada estatisticamente para as três espécies estudadas segundo a análise de variância paramétrica (ANOVA): *C. tetrapyrenoidosa* axênica p=0,004 Tuckey 0=6<9<11 dias, *C. tetrapyrenoidosa* contaminada p=0,004 Tuckey 0<6=9=11 dias; *S. orbiculare* axênico p=0,0038 Tuckey 0=3<6<9 dias, *S. orbiculare* contaminado p=0,0036 Tuckey 0=6=9<11 dias; *Thalassiosira* sp axênica p=0,0087 Tuckey 0=6=9<11 dias, *Thalassiosira* sp contaminada p=0,0125 Tuckey 0<6=9=11 dias. A comparação estatística entre as concentrações de carboidratos totais detectadas nas culturas axênicas e contaminadas foi realizada por meio do teste "t" de student em cada uma das amostragens, conforme mostrado nas Tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após a contaminação			
	Inicial	6°. dia	9°. dia	11°. dia
Total axênico	0,63±0,11	0,74±0,08	1,60±0,12	1,88 ±0,41
Total cont.	0,66±0,16	0,90±0,10	1,13±0,17	1,09 ±0,10
P	0,8025	0,1162	0,0203	0,0340

Tabela 19: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após a contaminação			
	Inicial	6°. dia	9°. dia	11°. dia
Total axênico	0,370±0,01	0,448±0,004	0,630±0,04	0,742±0,09
Total cont.	0,368±0,02	0,434±0,03	0,393±0,04	0,237±0,02
P	0,8961	0,5013	0,0031	0,0007

Tabela 20: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos totais das culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após a contaminação			
	Inicial	6 ^o . dia	9 ^o . dia	11 ^o . dia
Total axênico	0,41±0,09	0,548±0,037	0,375±0,06	0,725±0,026
Total cont.	0,55±0,05	0,694±0,042	0,464±0,02	0,529±0,084
P	0,0803	0,2339	0,0745	0,0184

C. tetrapyrenoidosa (Figura 21 e Tabela 18) começou a apresentar uma concentração menor de carboidratos totais na cultura contaminada a partir do 9^o dia após a contaminação (11 dias de idade) ($p=0,0203$) e foi menor até o 11^o dia ($p=0,034$), evidenciando a degradação de carboidratos totais extracelulares pelas bactérias do reservatório em questão. O mesmo ocorreu com *S. orbiculare* (Figura 22 e Tabela 19), que também começou a apresentar uma concentração menor de carboidratos totais na cultura contaminada a partir do 9^o dia após a contaminação ($p=0,0031$) e foi menor até o 11^o dia ($p=0,0007$).

Thalassiosira sp novamente apresentou um comportamento diferenciado em relação às outras duas espécies estudadas. Numa primeira observação, menos cuidadosa (Tabela 20 e Figura 23), nota-se que as diferenças entre as culturas axênica e contaminada começam apenas a partir do 11^o dia posterior à contaminação ($p=0,0104$). Seria um comportamento semelhante às outras duas espécies, se não fosse uma análise detalhada das Tabelas 16 e 17. Observando-se qualitativamente a excreção de carboidratos totais (CTs), nota-se que a concentração relativa de fucose, ramnose e galactose torna-se gradativamente maior na cultura contaminada em relação à axênica. Antagonicamente, as concentrações de glicose e manose/xilose (man/xil) começam a decair no 9^o dia após a contaminação. Mais adiante será apresentado um estudo mais

detalhado da degradação dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp que ajudará a esclarecer esta questão. Para ilustrar as diferenças mencionadas, dividiu-se grosseiramente os CTs em dois grupos: T₁ considerando a soma das concentrações de fucose, ramnose e galactose, e T₂ considerando a soma das concentrações de glicose e man/xil (Figuras 24 e 25).

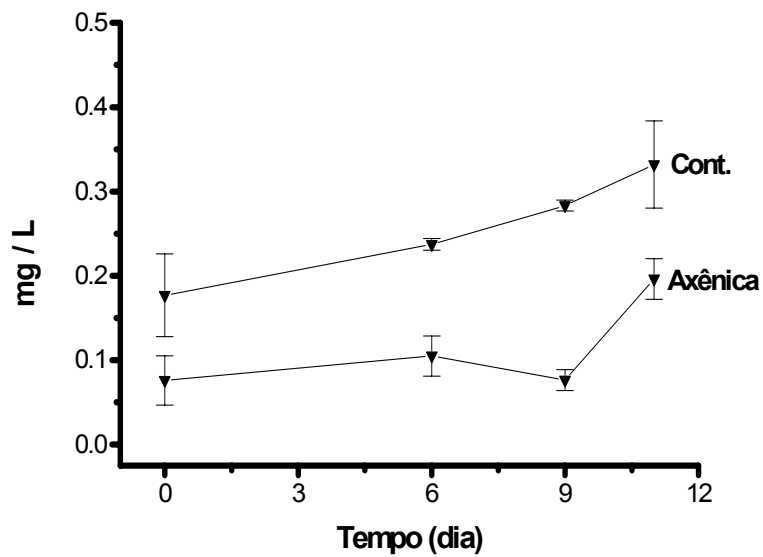


Figura 24: Variação da concentração, após a contaminação, dos carboidratos totais do grupo T₁ (fucose + ramnose + galactose) de *Thalassiosira* sp axênica e contaminada em relação ao tempo. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

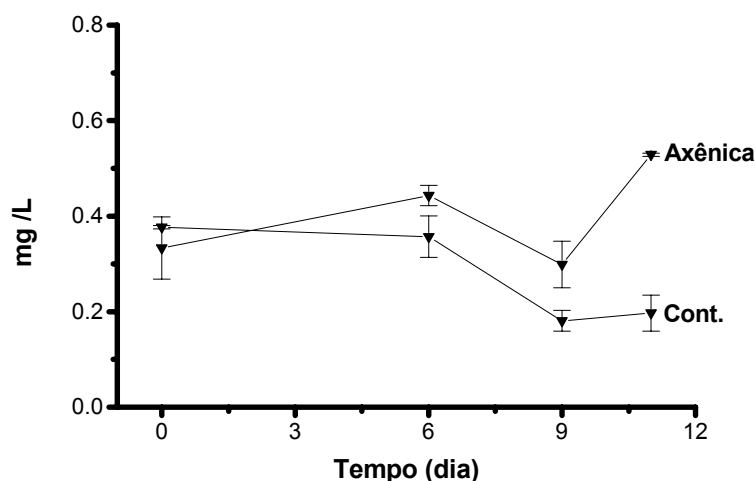


Figura 25: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos totais do grupo T₂ (glicose + man/xil) de *Thalassiosira* sp axênica e contaminada em relação ao tempo. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

Os carboidratos livres (CLs) foram detectados nas amostras não hidrolizadas e foram comparados da mesma forma que os CTs; porém, em concentrações bem inferiores (entre 0,01 e 0,06 mg/L). *C. tetrapyrenoidosa* (Figura 26 e Tabelas 21 e 22) apresentou liberação significativa na cultura axênica (ANOVA $p=0,059$ Tuckey $0=6=9<11$ dias), e a degradação da concentração inicial pelas bactérias foi bastante significativa na cultura contaminada (ANOVA $p<0,0001$ Tuckey $0>6=9>11$ dias). As diferenças entre as culturas axênica e contaminada tornaram-se significativas a partir do 6^o dia após a contaminação (teste "t" student $p=0,0191$) e mantiveram-se pelo 9^o dia ($p=0,0122$), até o 11^o dia ($p=0,0071$), sempre apontando a concentração de CLs da cultura axênica como superior a da cultura contaminada (Tabela 23).

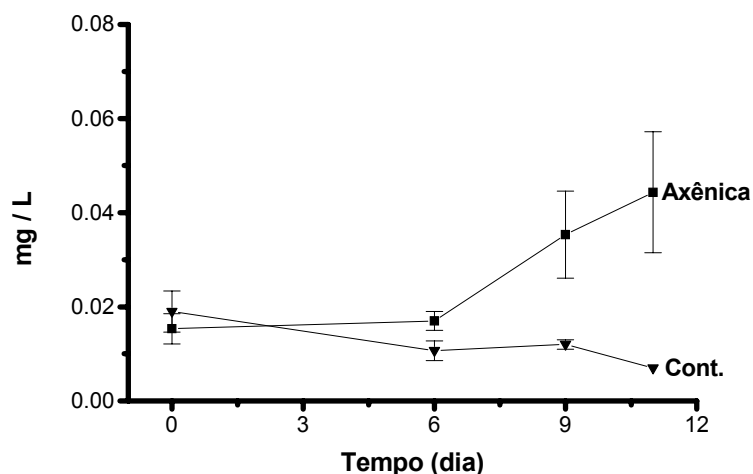


Figura 26: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

Tabela 21: Variação, após o quinto dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Fucose	0	0	0	0,002 ± 0,002
Ramnose	0	0	0	0,010 ± 0,006
Galactose	0	0	0,005 ± 0,002	0,006 ± 0,0005
Glicose	0,014 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,030 ± 0,006	0,012 ± 0,0005
Manose/xilose	0	0	0	0,009 ± 0,002
Total	0,014 ± 0,003	0,017 ± 0,002	0,035 ± 0,009	0,044 ± 0,012

Tabela 22: Variação, após o 5º dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Fucose	0,002 ± 0,0005	0	0	0
Ramnose	0,016 ± 0,002	0	0	0
Galactose	0	0	0,008 ± 0,007	0,007 ± 0,0005
Glicose	0,002 ± 0,004	0,010 ± 0,002	0,003 ± 0,006	0
Total	0,019 ± 0,004	0,010 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,007 ± 0,0005

Tabela 23: Comparação estatística entre as concentrações (mg/L) de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *C. tetrapyrenoidosa*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o . dia	9 ^o . dia	11 ^o . dia
total axênico	0,014±0,003	0,017±0,002	0,035±0,009	0,044±0,012
Total cont.	0,019±0,004	0,010±0,002	0,012±0,001	0,007±0,0005
P	0,0603	0,0191	0,0122	0,0071

Em *S. orbiculare* (Figura 27 e Tabelas 24 e 25) também foi possível detectar liberação significativa de CLs ($p=0,0003$ Tuckey $0=6=9<11$ dias), e a degradação da concentração inicial pelas bactérias também foi bastante significativa na cultura contaminada (ANOVA $p<0,0001$ Tuckey $0>6=9=11$ dias). As diferenças entre as culturas axênica e contaminada tornaram-se significativas a partir do 6^o e 9^o dia após a contaminação quando não mais foram detectados CLs na cultura contaminada e mantiveram-se até o 11^o dia ($p<0,0001$), sempre apontando a concentração de CLs da cultura axênica como superior a da cultura contaminada (Tabela 26).

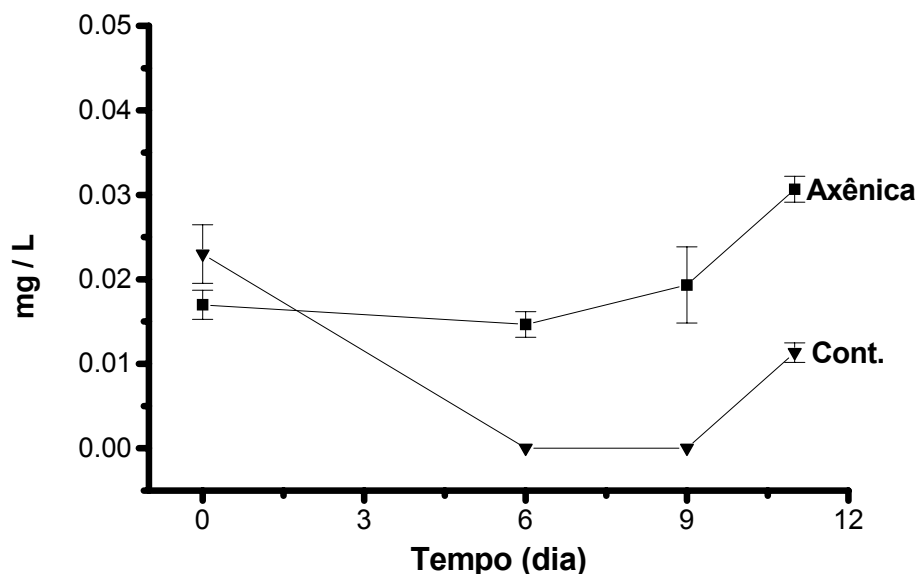


Figura 27: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *S. orbiculare* em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

Tabela 24: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Ramnose	0	0	0	0,005 ± ,0003
Glicose	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,025 ± 0,001
Total	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,030 ± 0,001

Tabela 25: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Glicose	0,023 ± 0,003	0	0	0,011 ± 0,001
Total	0,023 ± 0,003	0	0	0,011 ± 0,001

Tabela 26: Comparação estatística entre as concentrações de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *S. orbiculare*. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o . dia	9 ^o . dia	11 ^o . dia
Total axênico	0,017 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,019 ± 0,004	0,030 ± 0,001
Total cont.	0,023 ± 0,003	0	0	0,011 ± 0,001
P	0,0550	0	0	0,0001

Thalassiosira sp (Figura 28 e Tabelas 27 e 28) também mostrou liberação significativa de CLs em condições axênicas (ANOVA $p < 0,0001$ Tuckey $0 < 6 = 9 < 11$ dias), enquanto a cultura contaminada mostrou uma liberação significativa de CLs até o 6^o dia após a contaminação, e mantendo a concentração até o 9^o dia (ANOVA $p = 0,0175$ Tuckey $0 < 6 = 9 > 11$ dias). A concentração de CLs na cultura contaminada somente foi significativamente inferior no 11^o dia após a contaminação (teste "t" student $p = 0,0002$), mostrando um consumo de CLs por parte das bactérias planctônicas do Reservatório de Barra Bonita (Tabela 29).

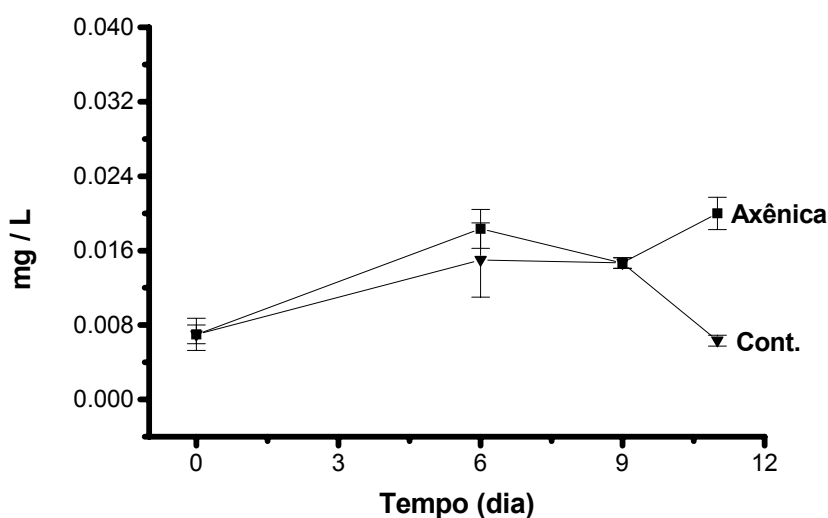


Figura 28: Variação, após a contaminação, da concentração dos carboidratos livres na cultura de *Thalassiosira* sp em condições axênica e contaminada com bactérias do Reservatório de Barra Bonita. As barras correspondem ao desvio padrão. O tempo 0 indica o momento da contaminação, quando a cultura estava com 5 dias.

Tabela 27: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura axênica de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Fucose	0,001 ± 0	0,002 ± 0,0005	0	0,003 ± 0,001
Glicose	0,006 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,014 ± 0,0005	0,016 ± 0,001
Total	0,007 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,014 ± 0,0005	0,020 ± 0,001

Tabela 28: Variação, após o 5^o dia de cultivo, da concentração dos carboidratos livres excretados por uma cultura contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o dia	9 ^o dia	11 ^o dia
Fucose	0,001 ± 0,0005	0,002 ± 0,0005	0	0,001 ± 0
Glicose	0,005 ± 0,001	0,012 ± 0,003	0,014 ± 0,0005	0,005 ± 0,0005
Total	0,007 ± 0,001	0,015 ± 0,004	0,014 ± 0,0005	0,006 ± 0,0005

Tabela 29: Comparação estatística entre as concentrações de carboidratos livres das culturas axênica e contaminada de *Thalassiosira* sp. O erro corresponde ao desvio padrão.

Monossacarídeos	Tempo após o 5 ^o dia de cultivo			
	Inicial	6 ^o . dia	9 ^o . dia	11 ^o . dia
total axênico	0,007 ± 0,001	0,018 ± 0,002	0,014 ± 0,0005	0,020 ± 0,001
Total cont.	0,007 ± 0,001	0,015 ± 0,004	0,014 ± 0,0005	0,006 ± 0,0005
P	0,999	0,2696	0,999	0,0002

4.2.1.3) Crescimento das populações de bactérias.

Como pode ser observado nas Tabelas 30, 31 e 32, houve crescimento de populações bacterianas nas culturas das três algas estudadas, *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, *Staurastrum orbiculare* e *Thalassiosira* sp.

Tabela 30: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, em relação ao tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (dias)	Densidade bacteriana média (bact / mL)
Início	$6,29 \times 10^5$
3	$4,90 \times 10^6$
6	$2,90 \times 10^6$
9	$2,13 \times 10^6$
11	$4,88 \times 10^6$

Tabela 31: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Staurastrum orbiculare*, em relação ao tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (dias)	Densidade bacteriana média (bact / mL)
Início	$3,41 \times 10^5$
3	$1,34 \times 10^6$
6	$1,77 \times 10^6$
9	$1,77 \times 10^6$
11	$1,78 \times 10^6$

Tabela 32: Variação da densidade bacteriana na cultura de *Thalassiosira* sp, em relação ao tempo de cultivo.

Tempo de cultivo (dias)	Densidade bacteriana média (bact / mL)
Início	6×10^5
3	$1,3 \times 10^6$
6	$1,69 \times 10^6$
9	$1,92 \times 10^6$
11	$2,48 \times 10^6$

A maior densidade bacteriana ao final do experimento ocorreu no excretado de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Tabela 30), atingindo um máximo de $4,8 \times 10^6$ bactérias por mililitro (bact/mL). A menor densidade populacional ao final do experimento ocorreu no excretado de *Staurastrum orbiculare* (Tabela 31), que atingiu $1,78 \times 10^6$ bact/mL e em *Thalassiosira* sp houve um crescimento intermediário, atingindo $2,48 \times 10^6$ bact/mL (Tabela 32).

As Figuras 29 a 32 mostram o desenvolvimento, durante 11 dias, da densidade bacteriana inoculada em culturas algais axênicas na fase exponencial de crescimento das três algas estudadas, e suas relações com a utilização de carboidratos livres e poliméricos excretados pelas algas. Como seria de se esperar, as figuras mostram comportamentos ligeiramente diferentes das populações bacterianas crescendo em substratos diferentes.

Na Figura 29, pode-se observar um rápido crescimento de bactérias na cultura de *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, passando de $6,28 \times 10^5$ bact/mL no início do cultivo para $4,89 \times 10^6$ bact/mL no 3º dia após a contaminação. Entretanto, este crescimento cessou e o número de bactérias reduziu-se para $2,9 \times 10^6$ bact/mL e seguiu diminuindo até o 9º dia ($2,1 \times 10^6$ bact/mL), quando novamente iniciou-se um aumento da densidade populacional, até atingir $4,9 \times 10^6$ bact/mL no 11º dia.

A variação na densidade bacteriana observada na Figura 29 pode refletir sucessão de diferentes populações de bactérias em função da variação do substrato excretado. O aumento da densidade bacteriana nos três primeiros dias de cultivo pode ter sido devido à utilização de monossacarídeos e/ou dissacarídeos livres excretados nos primeiros 6 dias de cultivo da alga por uma população específica na utilização desses substratos. Com a exaustão desses substratos o crescimento bacteriano dessa população

específica decresceu até o 11º dia de exposição, quando a baixa concentração (0,012 mg/L) não mais foi suficiente para a manutenção do crescimento. Isso, no entanto, não exclui a presença de uma outra população, ainda com baixa densidade, que estivesse utilizando outro substrato, os carboidratos poliméricos, heteropolissacarídeos, por exemplo. A partir do 9º dia de exposição, com a exaustão dos carboidratos livres e o aumento gradativo dos poliméricos, a população bacteriana inicial passou a utilizar estes substratos ou, então, foi substituída por uma outra mais especializada neste tipo de composto, o que explicaria a queda da concentração dos carboidratos poliméricos a partir do 9º dia de exposição. A existência de duas, ou mais, populações distintas de bactérias somente será comprovada pela análise da diversidade das bactérias contaminantes em função dos substratos, que será apresentada mais adiante.

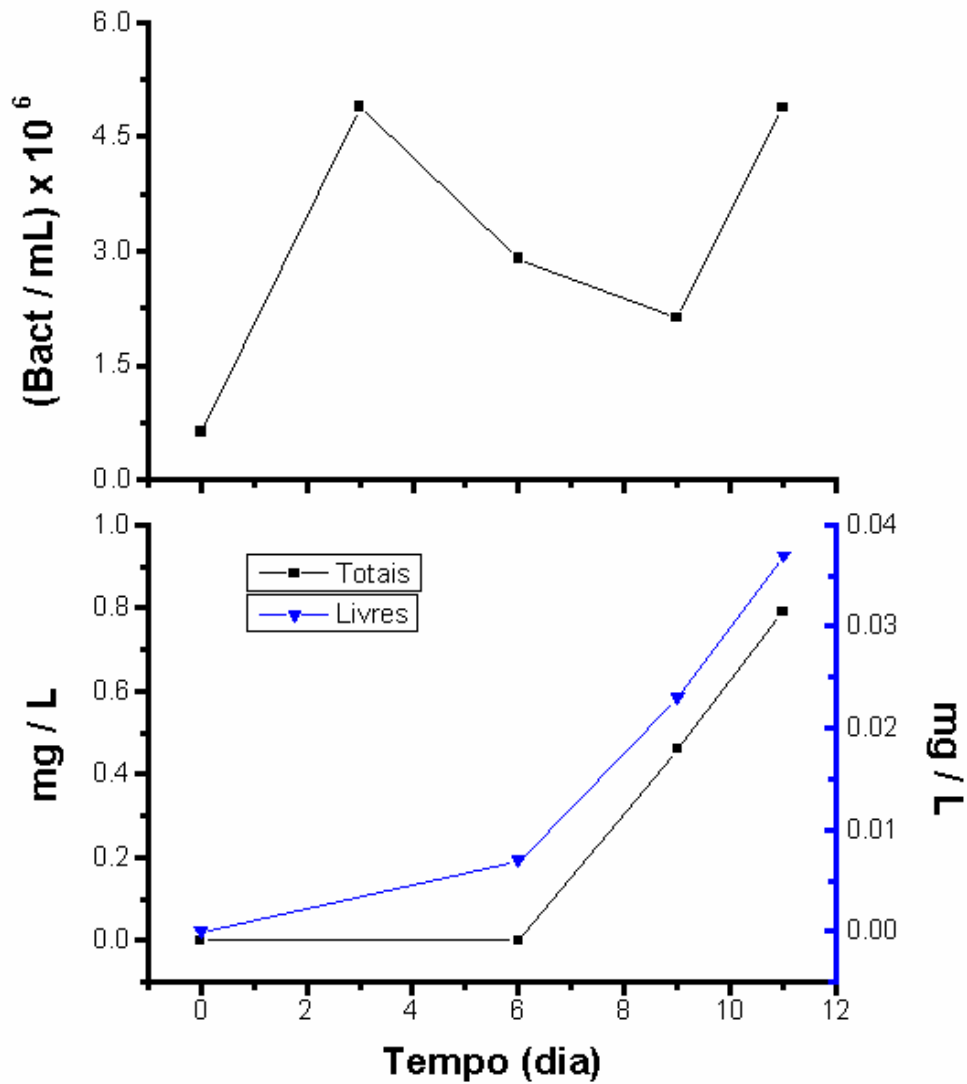


Figura 29: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres excretados por *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda aos carboidratos totais.

Já na cultura de *Staurastrum orbiculare*, as bactérias partiram de $3,4 \times 10^5$ bact/mL no início do cultivo, chegando até $1,78 \times 10^6$ bact/mL no 11º dia (Figura 30). Neste caso, a população bacteriana cresceu inicialmente utilizando os carboidratos livres presentes na cultura. Com a exaustão dos mesmos, o consumo dos carboidratos livres estabilizou-se a partir do nono dia após a contaminação e a população manteve-se às custas da degradação dos carboidratos poliméricos, cujo consumo aumenta exponencialmente após o sexto dia de contaminação. Um indício disso seria o decréscimo da concentração desse compostos a partir do momento do estabelecimento da densidade bacteriana máxima no 9º dia de exposição ao ataque das bactérias.

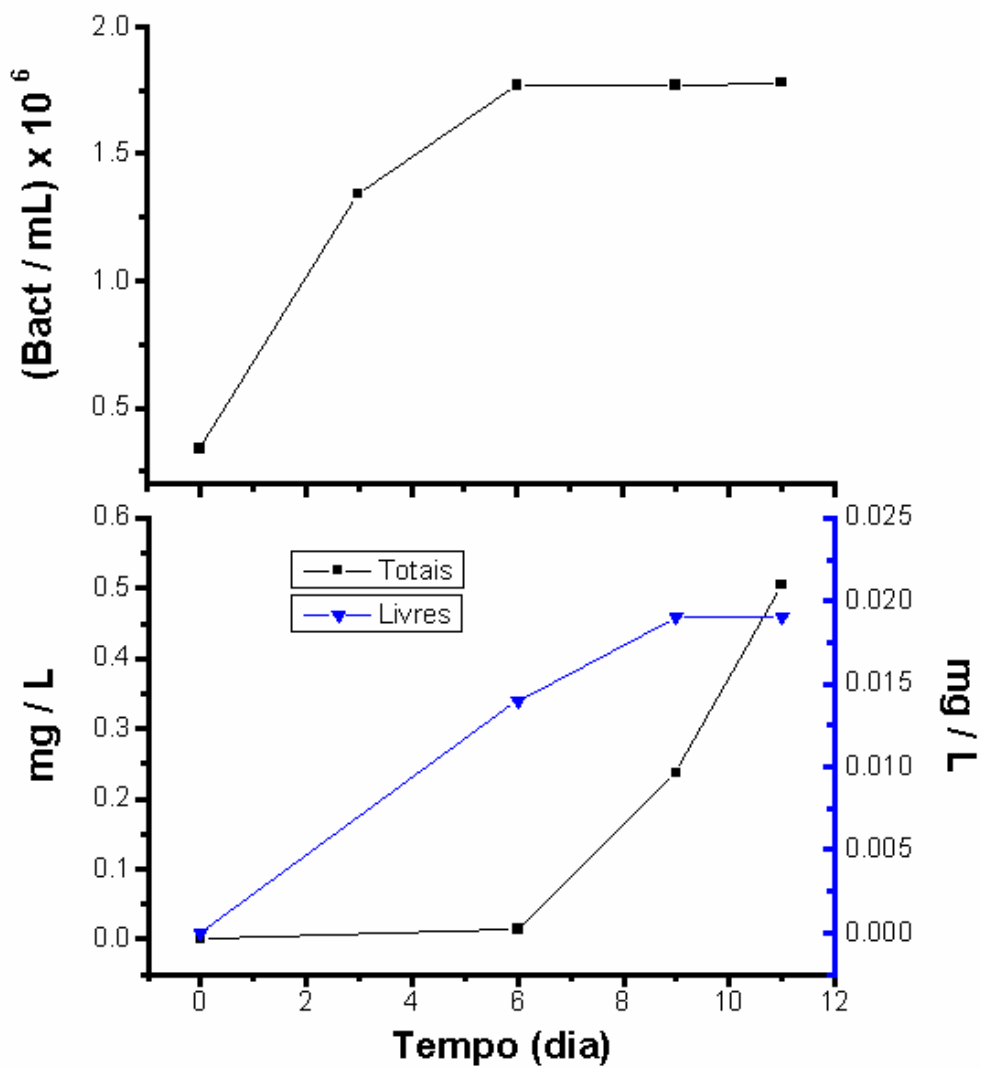


Figura 30: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres excretados por *Staurastrum orbiculare*, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda aos carboidratos totais.

A Figura 31 mostra o desenvolvimento da população bacteriana durante 11 dias na cultura de *Thalassiosira* sp e a variação dos carboidratos durante esse período. As bactérias que cresceram no meio contendo estes compostos chegaram a uma densidade total de $2,48 \times 10^6$ bact/mL, a partir de $6,6 \times 10^5$ bact/mL. Neste caso o crescimento bacteriano deu-se tanto às custas da degradação do carboidrato polimérico, como dos carboidratos livres, mas somente após o nono dia após a contaminação. Quando a densidade bacteriana tornou-se bastante alta, aumentou também a degradação dos carboidratos livres e poliméricos, diminuindo sua concentração no meio. No caso de *Thalassiosira* sp acompanhou-se também o consumo dos monossacarídeos fucose, ramnose e galactose (carboidratos 1) e glicose e manose/xilose (carboidratos 2) em função do crescimento bacteriano (Figura 32). Foi possível observar que o consumo dos carboidratos totais do grupo dois iniciou-se já no sexto dia após a contaminação, e que este grupo de carboidratos foi o principal responsável pelo crescimento bacteriano, enquanto os carboidratos do grupo um não foi consumido em nenhum momento do experimento.

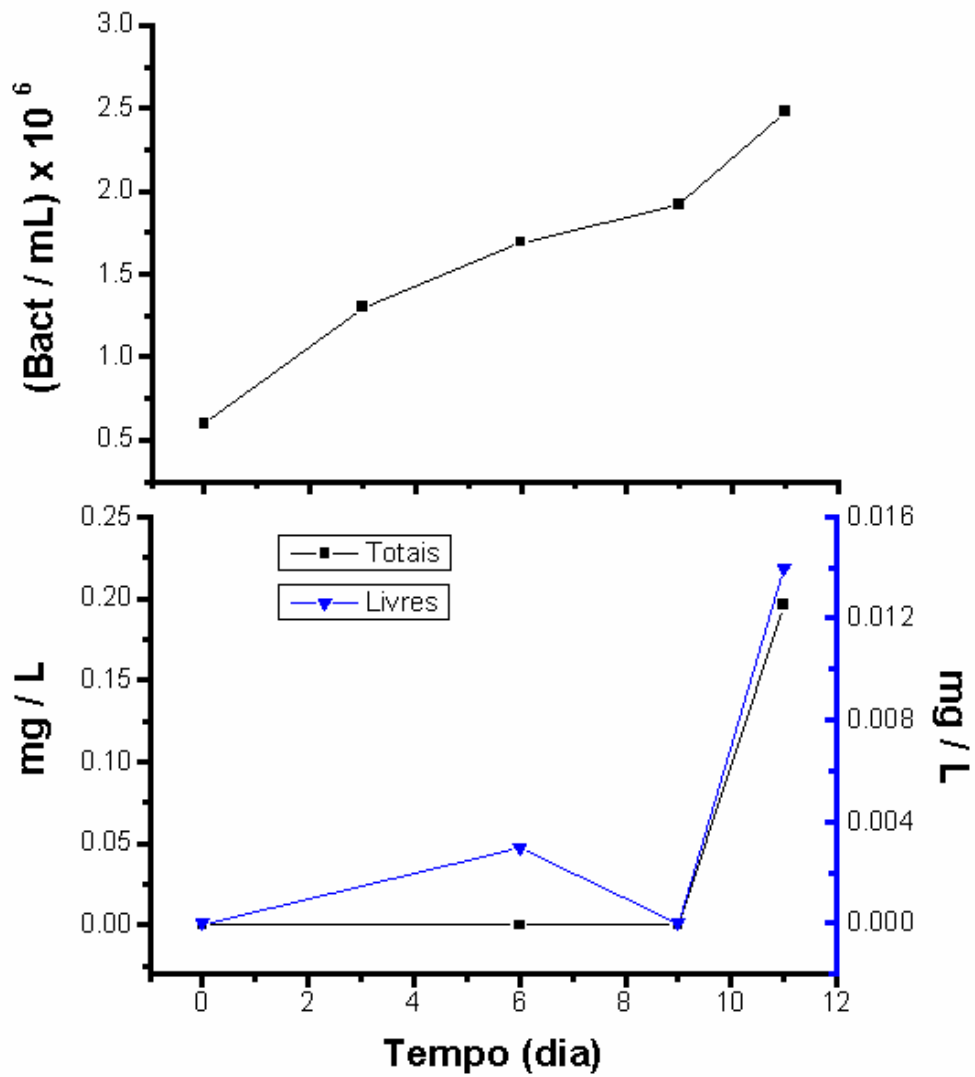


Figura 31: Variação da densidade bacteriana em relação ao consumo (concentração de carboidratos da cultura axênica subtraída pela cultura contaminada) de carboidratos totais e livres de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo. Escala da direita refere-se à concentração de carboidratos livres e a da esquerda refere-se aos carboidratos totais.

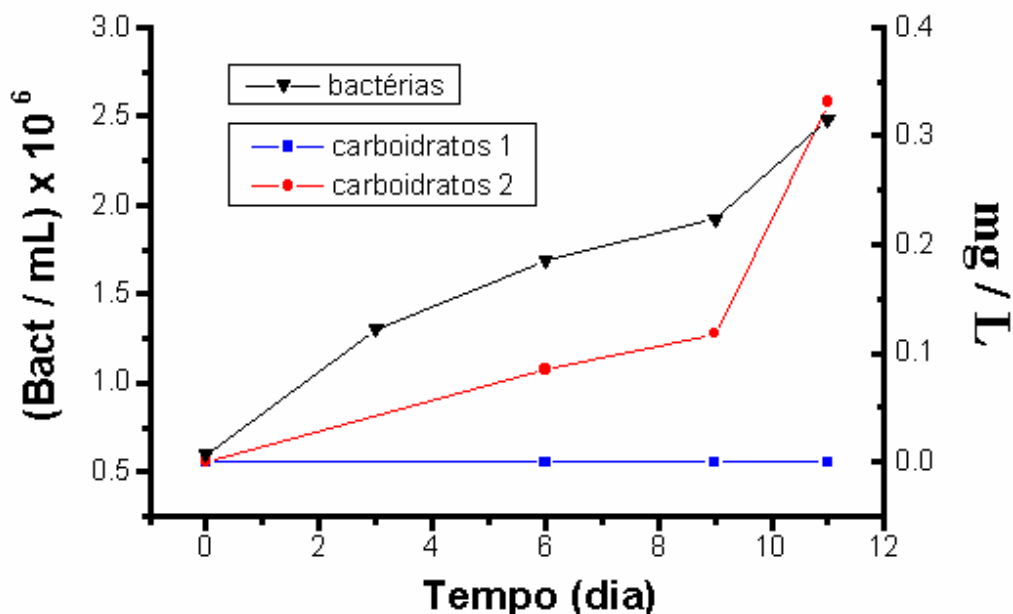


Figura 32: Variação da densidade bacteriana (escala da esquerda) em relação ao consumo dos carboidratos totais tipo 1 (fucose, ramnose e galactose) e 2 (glicose e manose/xilose), mostrados na escala da direita, de *Thalassiosira* sp, em função do tempo de cultivo.

4.3) EXPERIMENTO III:

4.3.1) Testes de especificidade.

4.3.1.1) Degradação dos polissacarídeos.

4.3.1.1.1) Cromatografia em coluna de gel.

As Figuras 33, 34 e 35 mostram a degradação dos polissacarídeos excretados por, respectivamente, *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp, analisada pela cromatografia por filtração em coluna de gel Pharmacia® Sepharose CL6B. Para todos os polissacarídeos em questão, foram observadas duas frações de massas moleculares distintas. A primeira (fração “A” - $V_e/V_t = 0 - 0,25$) foi muito mais representativa e teve aproximadamente 2×10^6 D, enquanto a segunda (fração “B” - $V_e/V_t = 0,45 - 0,65$) foi bem menos significativa e teve uma massa molecular intermediária entre 2×10^6 e 10^4 D, mais próxima ao limite inferior de exclusão do gel.

A fração “A” excretada por *C. tetrapyrenoidosa* foi rapidamente degradada e parte dela passou a incluir a fração “B”, de modo que após 7 dias, ambas as frações apresentaram praticamente a mesma representatividade (Figura 33), como será demonstrado pela análise em HPLC-PAD. Os polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* foram visualmente os mais rapidamente degradados. Após 7 dias de incubação houve uma brusca diminuição, principalmente da fração “A”, e ocorre uma pequena transferência de carboidratos da fração “A” para a “B” (Figura 34), como também será demonstrado pela análise em HPLC-PAD. Já os polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp foram os mais refratários ao ataque microbiano (Figura 35). Pela análise neste gel, as frações pouco se alteraram até o 7º dia e foram mais lentamente degradados que os outros dois polissacarídeos em questão, durante os 35 dias de experimento, como será mostrado pela análise por HPLC-PAD.

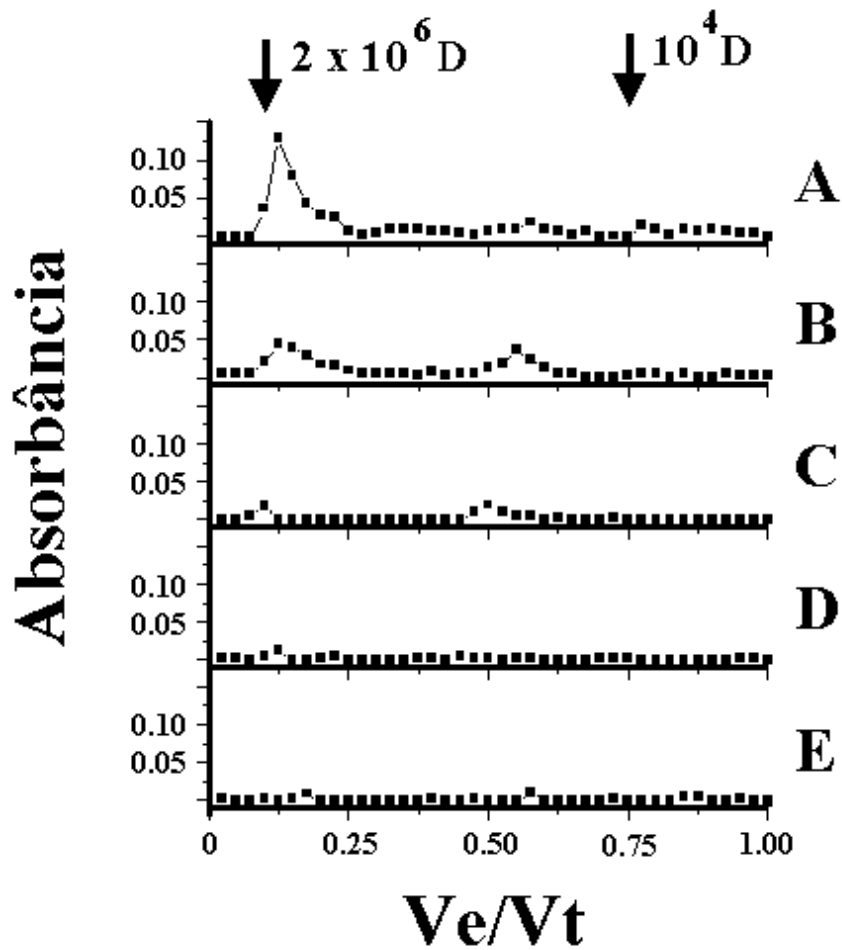


Figura 33: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

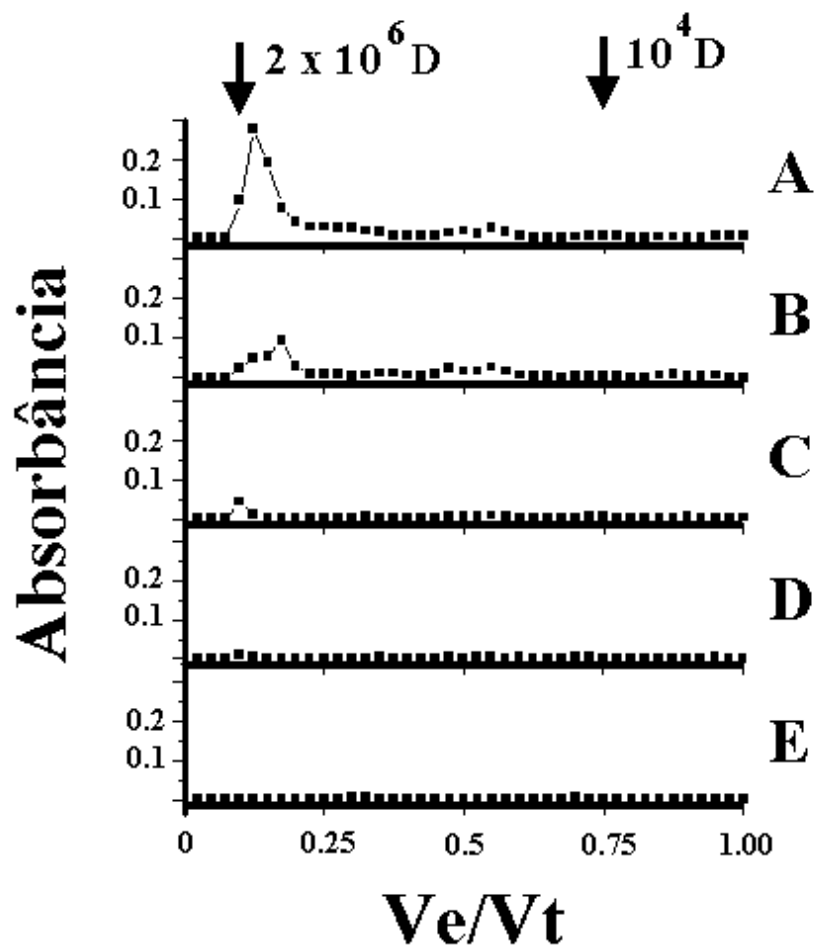


Figura 34: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

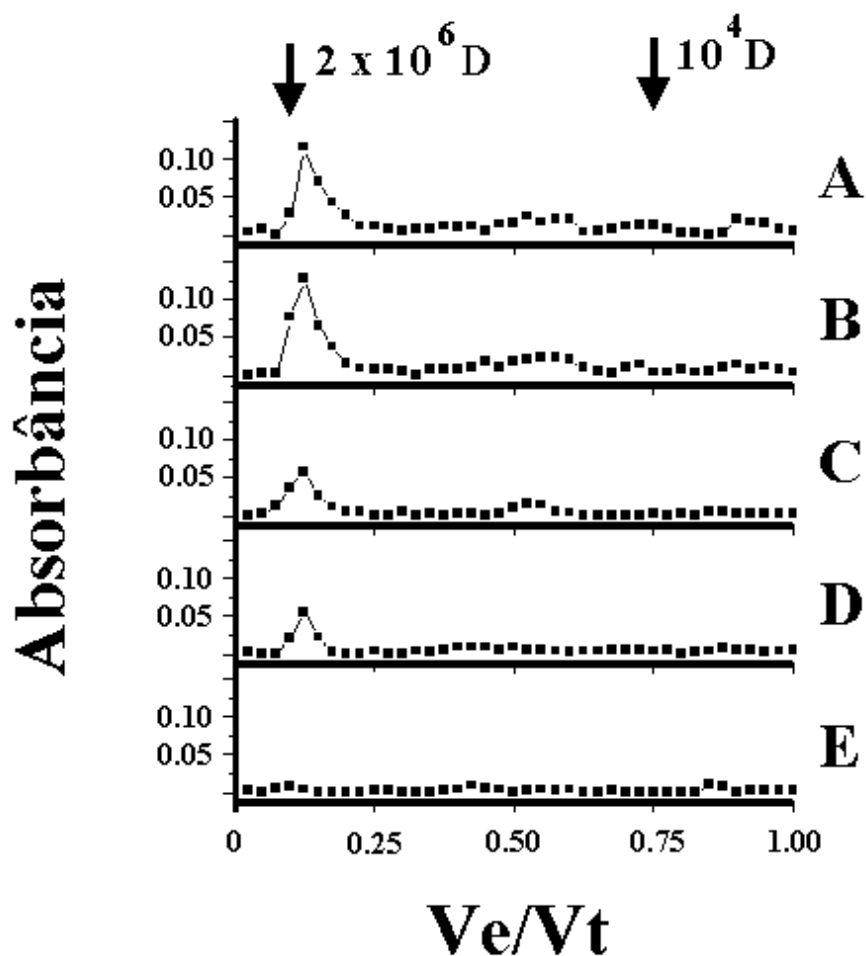


Figura 35: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel Sepharose CL6B. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

A largura dos picos detectados motivou a utilização de outro gel, Bio-Rad® A-15 com limites entre 4×10^5 e $1,5 \times 10^7$ D, para checar a existência de outras frações de diferentes massas moleculares. As Figuras 36, 37 e 38 mostram a degradação dos polissacarídeos excretados por, respectivamente, *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp medida pelo gel A-15. A separação dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* neste gel revelou um maior complexidade da fração “A”, dividindo-a em duas frações muito próximas uma da outra. Ambas foram rapidamente degradadas e parte delas foi transformada na terceira fração após 7 dias de incubação,

como mostra a Figura 36, reforçando os dados obtidos com o gel CL6B. Os polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* (Figura 37) continuaram sendo separados em apenas duas frações, sendo que a primeira (aprox. 2×10^6 D) foi rapidamente degradada e parte dela passou a incluir a segunda fração (aprox. 10 D), confirmando também os dados obtidos com o gel CL6B. Os polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp (Figura 38) foram novamente separados em duas frações, porém a fração “B” foi mais nítida neste gel, sendo que a primeira manteve-se praticamente intacta e a segunda sofreu considerável degradação após 7 dias.

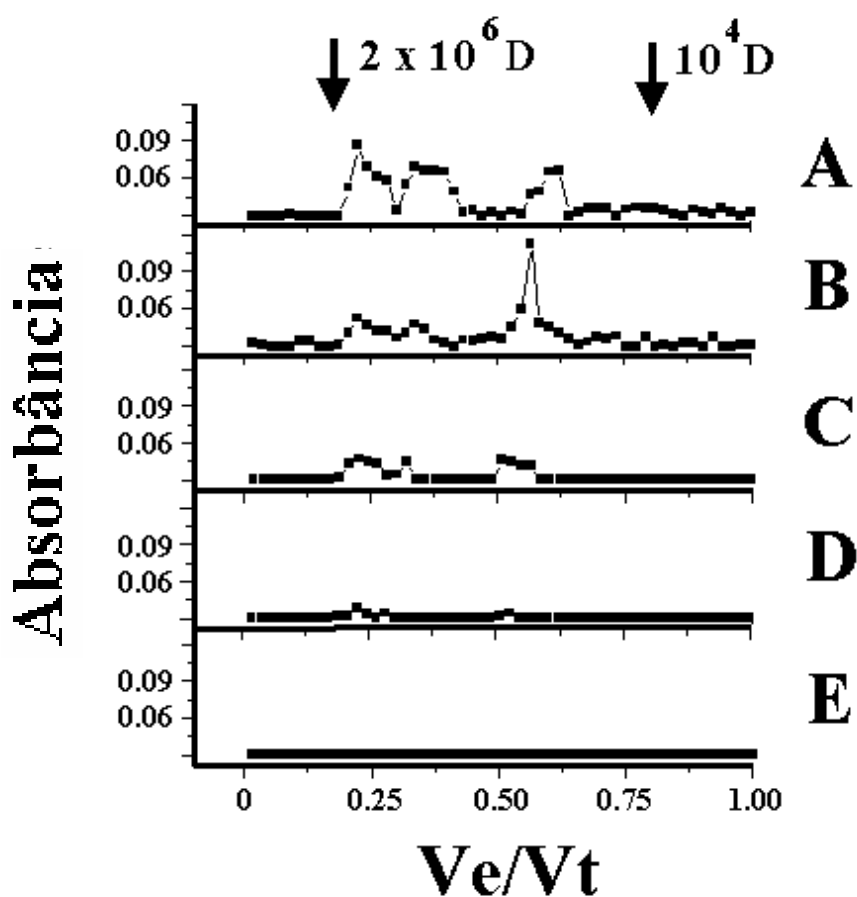


Figura 36: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

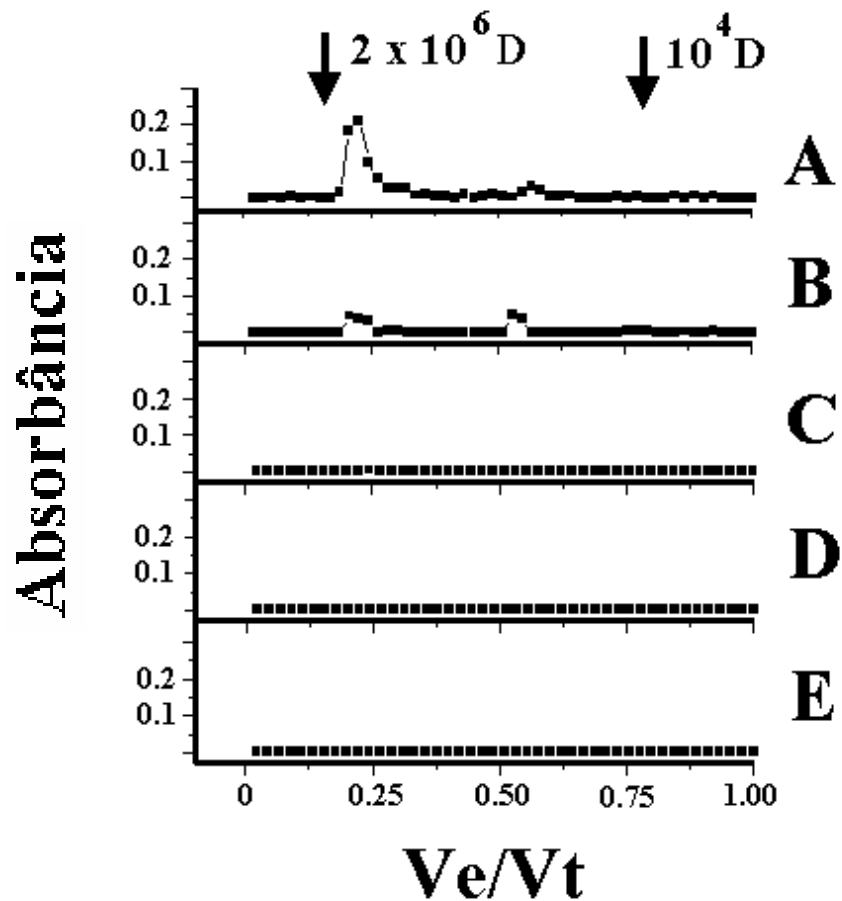


Figura 37: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare*, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

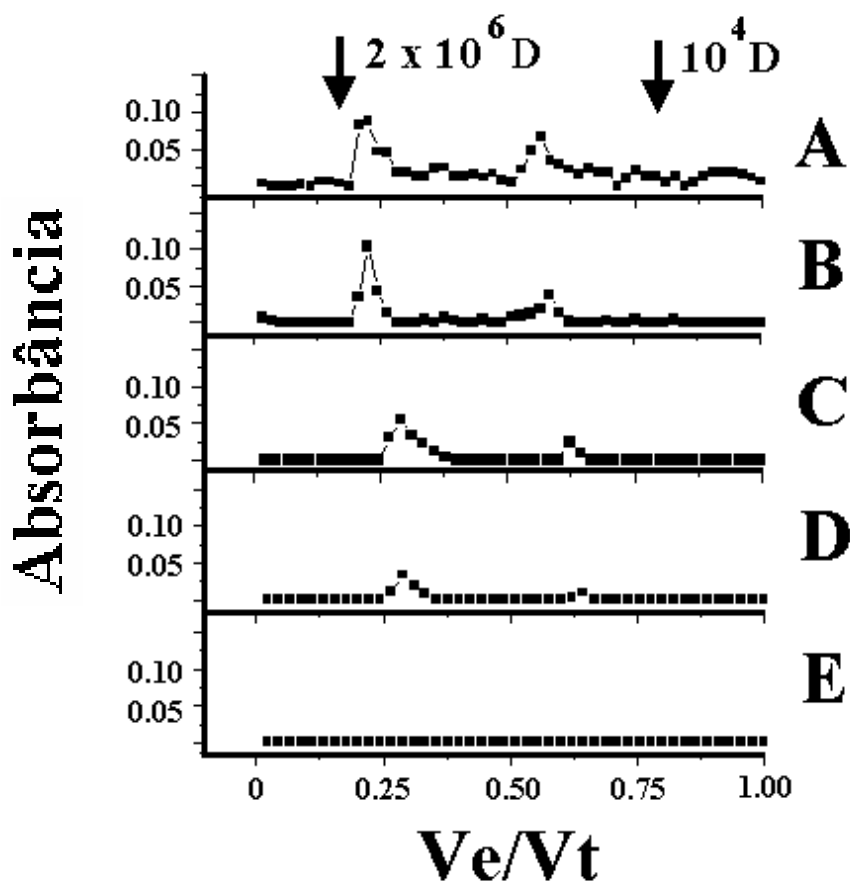


Figura 38: Degradação bacteriana dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp, em função do tempo de contaminação. (A) Inicial, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) 21 dias e (E) 35 dias. Cromatografia por permeação em coluna de gel BioRad A-15. Eluente: água destilada + Butanol 2%; fluxo = 1ml/5min.

4.3.1.1.2) Análise por HPLC-PAD.

4.3.1.1.2.1) *Cryptomonas tetrapyrenoidosa*.

A Tabela 33 mostra a quantificação das frações isoladas pela cromatografia em coluna de gel CL6B e que foram utilizados para a parametrização da degradação do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*, e de cada monossacarídeo que o compõe (Figuras 39 e 40). A Tabela 34 mostra o coeficiente de degradação (k) para cada um dos monossacarídeos componentes das duas frações de polissacarídeos detectadas neste gel, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). A Tabela 35 mostra a quantificação obtida por meio da análise em HPLC-PAD das frações separadas pelo gel A-15. As Figuras 41, 42 e 43 mostram a parametrização da degradação das

frações separadas neste gel. O coeficiente de degradação (k), bem como o respectivo coeficiente de determinação (r^2) são mostrados na Tabela 36.

Pode-se perceber pelo coeficiente de ajuste dos modelos que a degradação foi mais bem demonstrada quando analisada pelo gel A-15, que além de separar o polissacarídeo de *C. tetrapyrenoidosa* em três frações com degradações evidentes em todas elas, também permitiu um melhor ajuste ao modelo. Analisando os coeficientes de degradação de cada fração pode-se observar que a fração de menor massa molecular (“C”) apresentou a degradação mais acelerada, enquanto a fração “B” foi a menos acelerada. Isso pode ser explicado em parte pela transferência de material da fração “A” para a fração “B”, observada tanto nos cromatogramas das Figuras 33 e 36, como nas Tabelas 33 e 36. Observando o coeficiente de degradação de cada um dos monossacarídeos, tanto no gel CL6B, como no gel A-15, foi possível observar diferenças significativas, evidenciando que a degradação não ocorre igualmente em todo o polissacarídeo, e os principais sítios de degradação também podem variar entre as diferentes frações. Na fração “A” isolada pelo gel A-15, a degradação mais acelerada foi a da galactose, que nas outras duas frações foi superada pela glicose. Essa variação também pode ser observada nas frações separadas pelo gel CL6B.

Tabela 33: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em mg/L. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	1,13 ± 0,08	0,572 ± 0,01	0,071 ± 0,007	0,064 ± 0,003	0,027 ± 0,001
Ramnose	0,23 ± 0,03	0,223 ± 0,02	0,041 ± 0,01	0,047 ± 0,002	0
Galactose	0,696 ± 0,09	0,116 ± 0,004	0,077 ± 0,006	0,088 ± 0,01	0,016 ± 0,002
Glicose	0,208 ± 0,05	0,112 ± 0,011	0,08 ± 0,002	0,079 ± 0,008	0,027 ± 0,004
Man/xil	0,518 ± 0,07	0,35 ± 0,006	0,073 ± 0,004	0,093 ± 0,004	0,021 ± 0,001
Total	2,77 ± 0,31	1,37 ± 0,03	0,416 ± 0,008	0,371 ± 0,02	0,091 ± 0,01
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,195 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0,026 ± 0,002	0,011 ± 0,0005	0,012 ± 0,002
Ramnose	0,106 ± 0,03	0,073 ± 0,01	0	0	0
Galactose	0,103 ± 0,007	1,026 ± 0,04	0,021 ± 0,005	0,009 ± 1,001	0,01 ± 0,001
Glicose	0,178 ± 0,001	0,154 ± 0,03	0,03 ± 0,001	0,024 ± 0,001	0,051 ± 0,003
Man/xil	0,237 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,029 ± 0,01	0,024 ± 0,002	0,037 ± 0,005
Total	0,820 ± 0,09	1,57 ± 0,06	0,107 ± 0,02	0,069 ± 0,002	0,157 ± 0,02

Tabela 34: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,13	0,97	0,10	0,94
RAMNOSE	0,075	0,82	0,11	0,82
GALACTOSE	0,22	0,98	0,043	0,13
GLICOSE	0,058	0,94	0,072	0,77
MAN/XIL	0,091	0,94	0,087	0,85
TOTAL	0,1	0,98	0,060	0,45

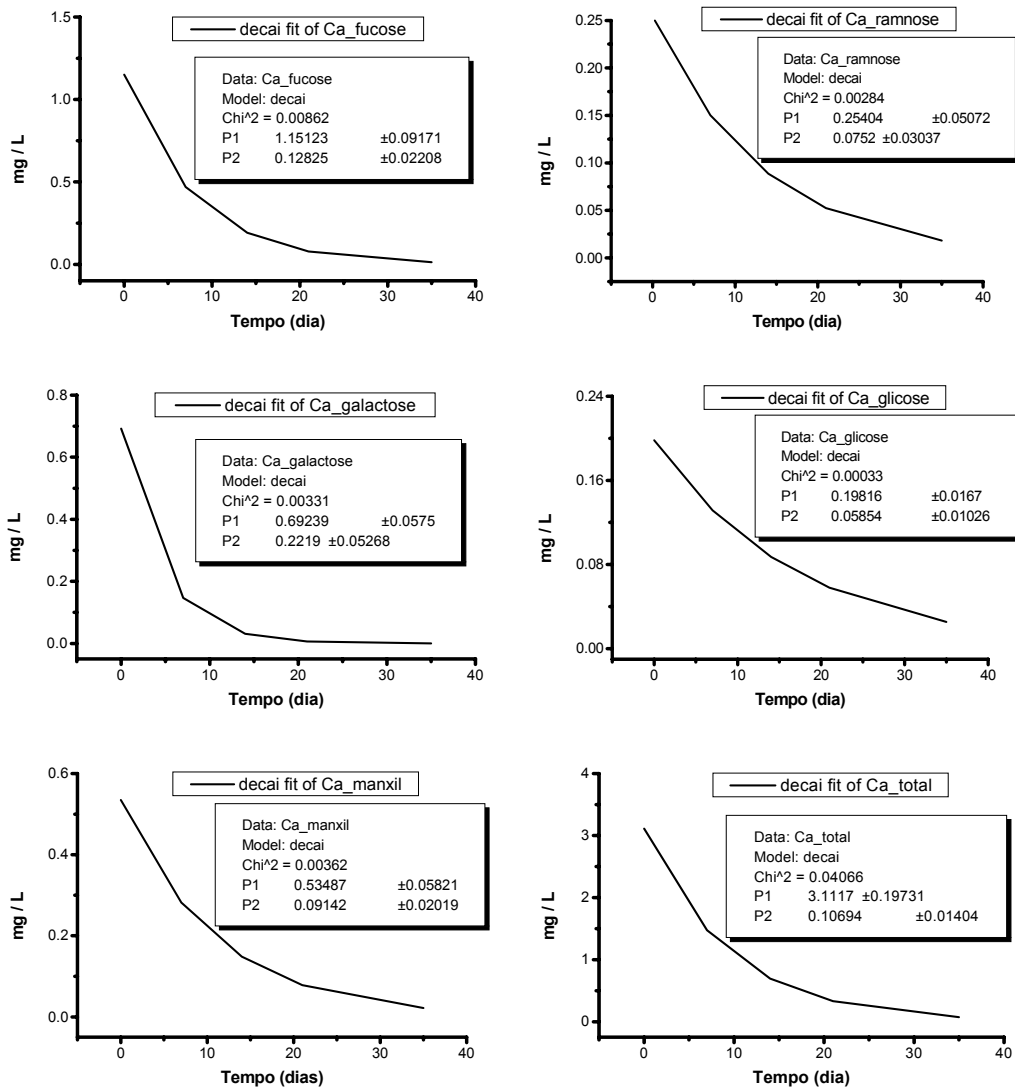


Figura 39: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida pelo gel CL6B.

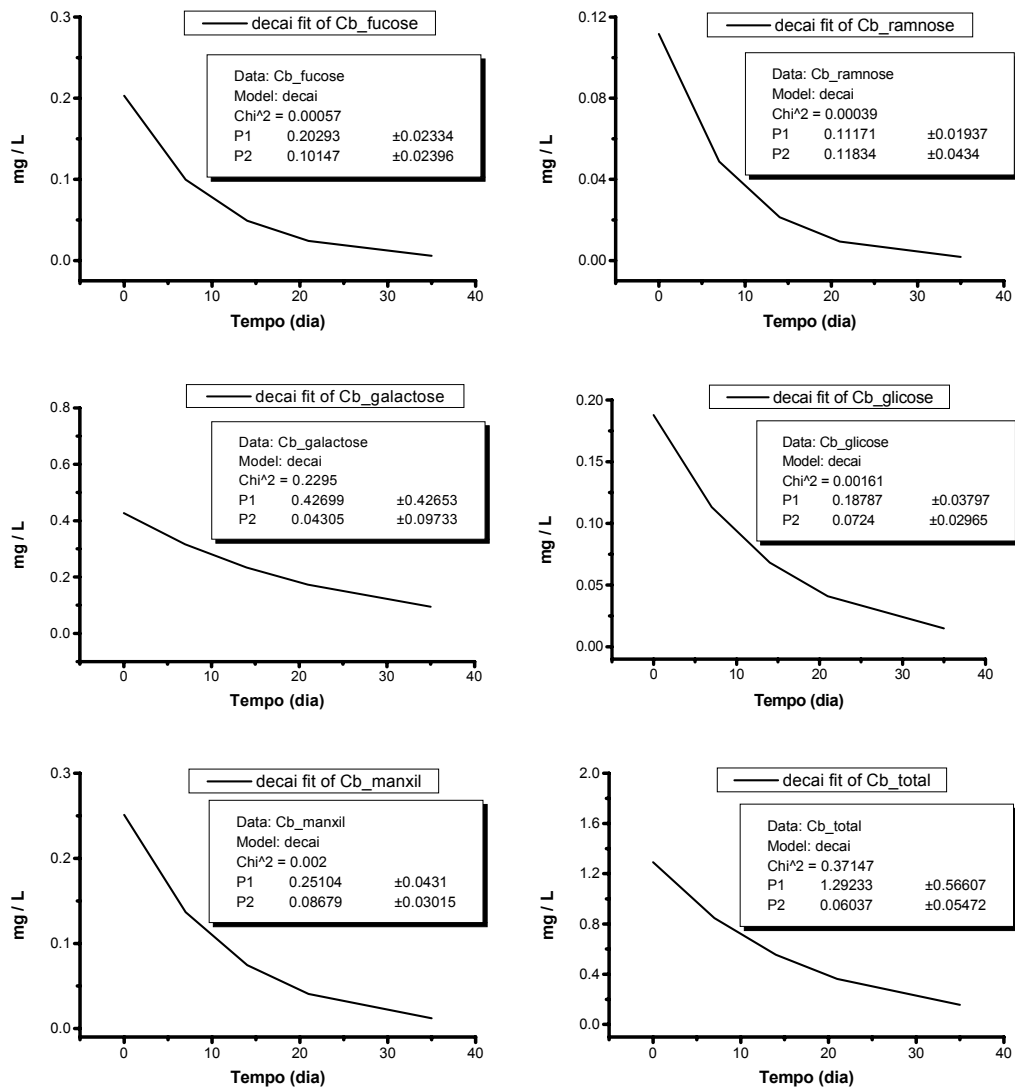


Figura 40: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel CL6B.

Tabela 35: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A”, “B” e “C” dos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa* em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,659± 0,015	0,463± 0,044	0,024± 0,008	0,020± 0,002	0,018± 0,004
Ramnose	0,194± 0,005	0,285± 0,008	0	0	0
Galactose	0,215± 0,014	0,084± 0,001	0,019± 0,009	0,017± 0,001	0,024± 0,006
Glicose	0,086± 0,042	0,075± 0,035	0,024± 0,012	0,026± 0,003	0,024± 0,002
Man/xil	0,228± 0,10	0,261± 0,035	0,027± 0,015	0,029± 0,009	0,026± 0,008
Total	1,024± 0,184	1,170± 0,063	0,095± 0,040	0,093± 0,001	0,093± 0,004
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,144± 0,033	0,173± 0,011	0,011± 0,001	0,007± 0,001	0
Ramnose	0,084± 0,027	0,151± 0,028	0,027± 0,003	0	0
Galactose	0,045± 0,010	0,024± 0,001	0,012± 0,003	0,008± 0,002	0
Glicose	0,095± 0,031	0,049± 0,019	0,024± 0,014	0,019± 0,004	0
Man/xil	0,151± 0,015	0,134± 0,030	0,023± 0,009	0,016± 0,006	0
Total	0,522± 0,007	0,532± 0,089	0,099± 0,023	0,050± 0,012	0
C	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,217± 0,011	0,208± 0,009	0	0,015± 0,001	0,008± 0
Ramnose	0,149± 0,014	0,131± 0,019	0	0	0
Galactose	0,115± 0,015	0,037± 0,008	0	0,007± 0,001	0,006± 0,0005
Glicose	0,321± 0,025	0,060± 0,012	0,021± 0,005	0,022± 0,004	0,023± 0,002
Man/xil	0,333± 0,065	0,188± 0,009	0	0,027± 0,005	0,024± 0,006
Total	1,137± 0,184	0,618± 0,040	0,021± 0,005	0,072± 0,005	0,062± 0,007

Tabela 36: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A”, “B” e “C” do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”		Fração “C”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,11	0,90	0,081	0,69	0,09	0,77
RAMNOSE	0,079	0,57	0,062	0,52	0,10	0,81
GALACTOSE	0,140	0,98	0,091	0,99	0,18	0,98
GLICOSE	0,055	0,83	0,091	0,99	0,22	0,99
MAN/XIL	0,073	0,70	0,084	0,86	0,12	0,92
TOTAL	0,094	0,83	0,079	0,81	0,14	0,96

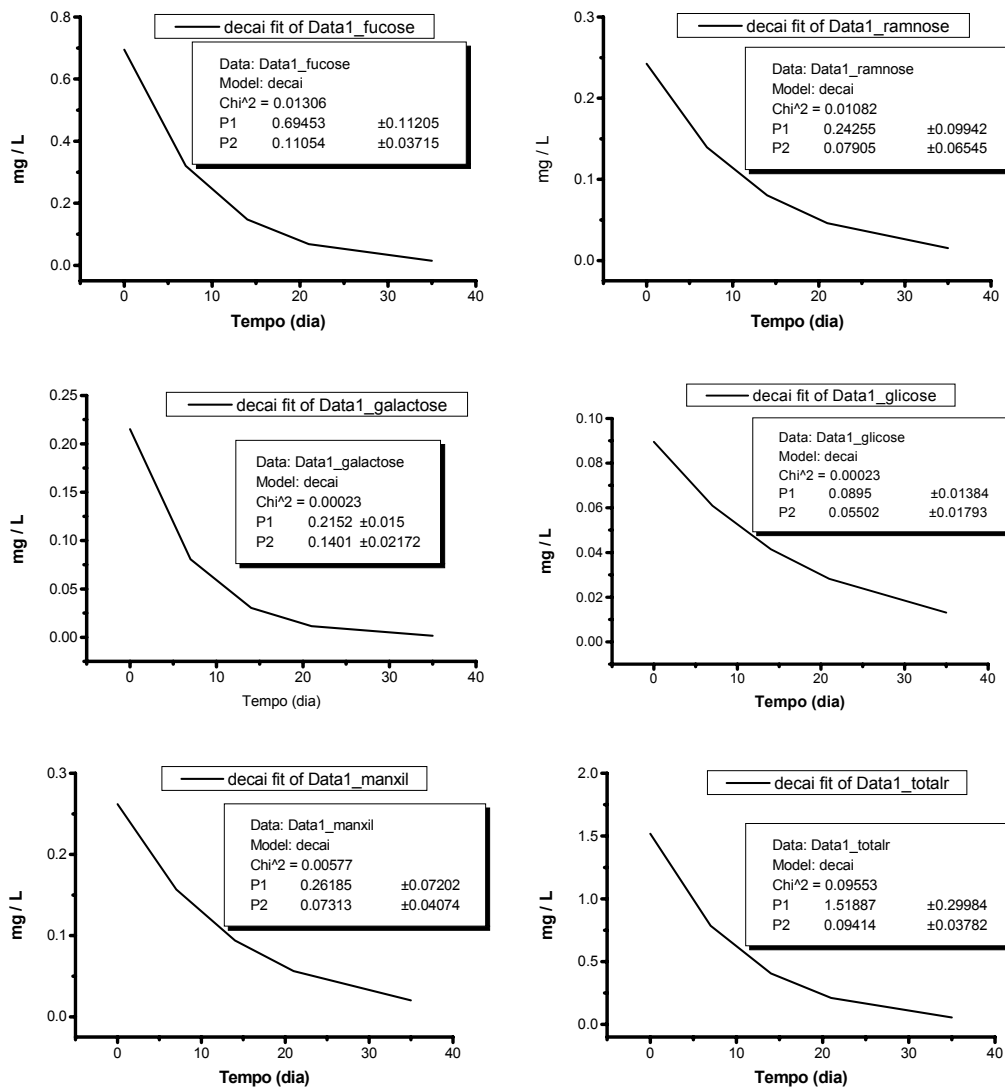


Figura 41: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetraplyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15.

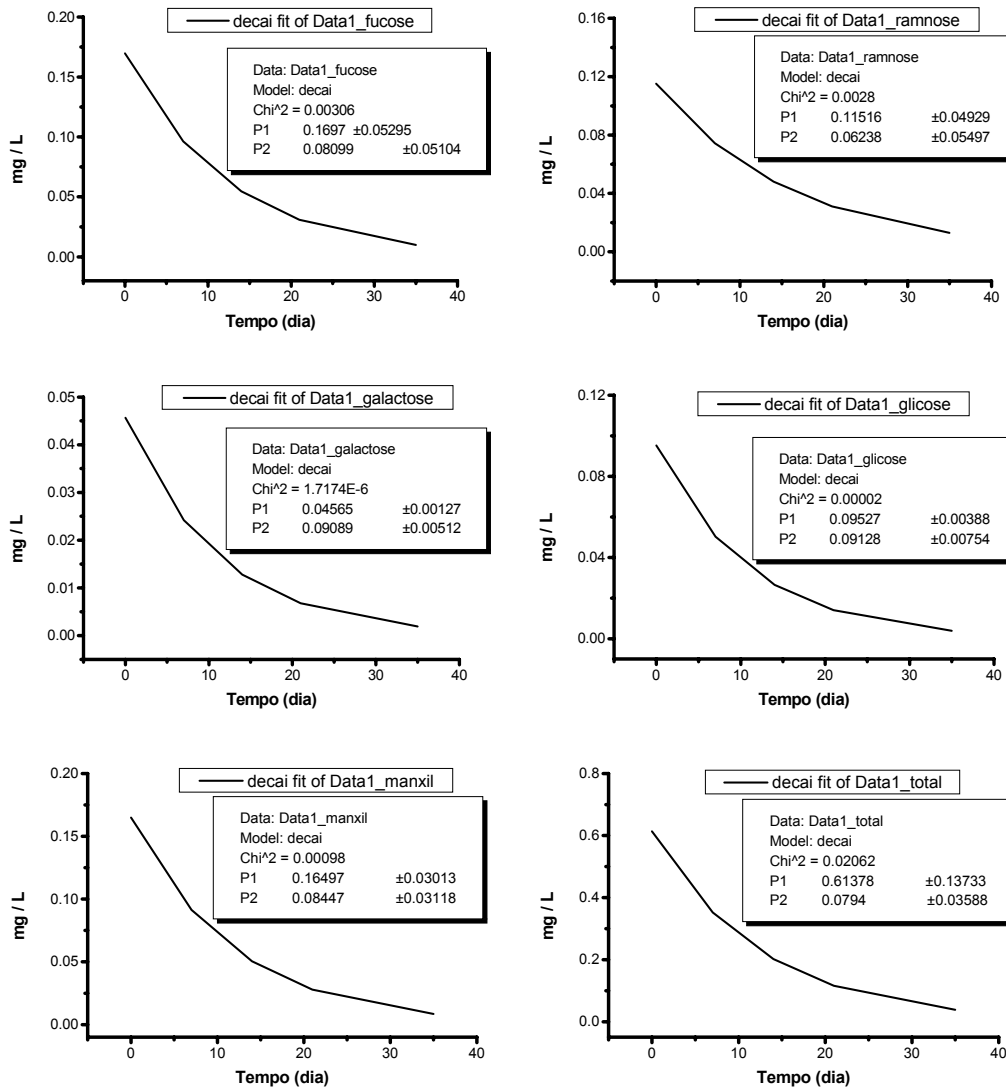


Figura 42: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15.

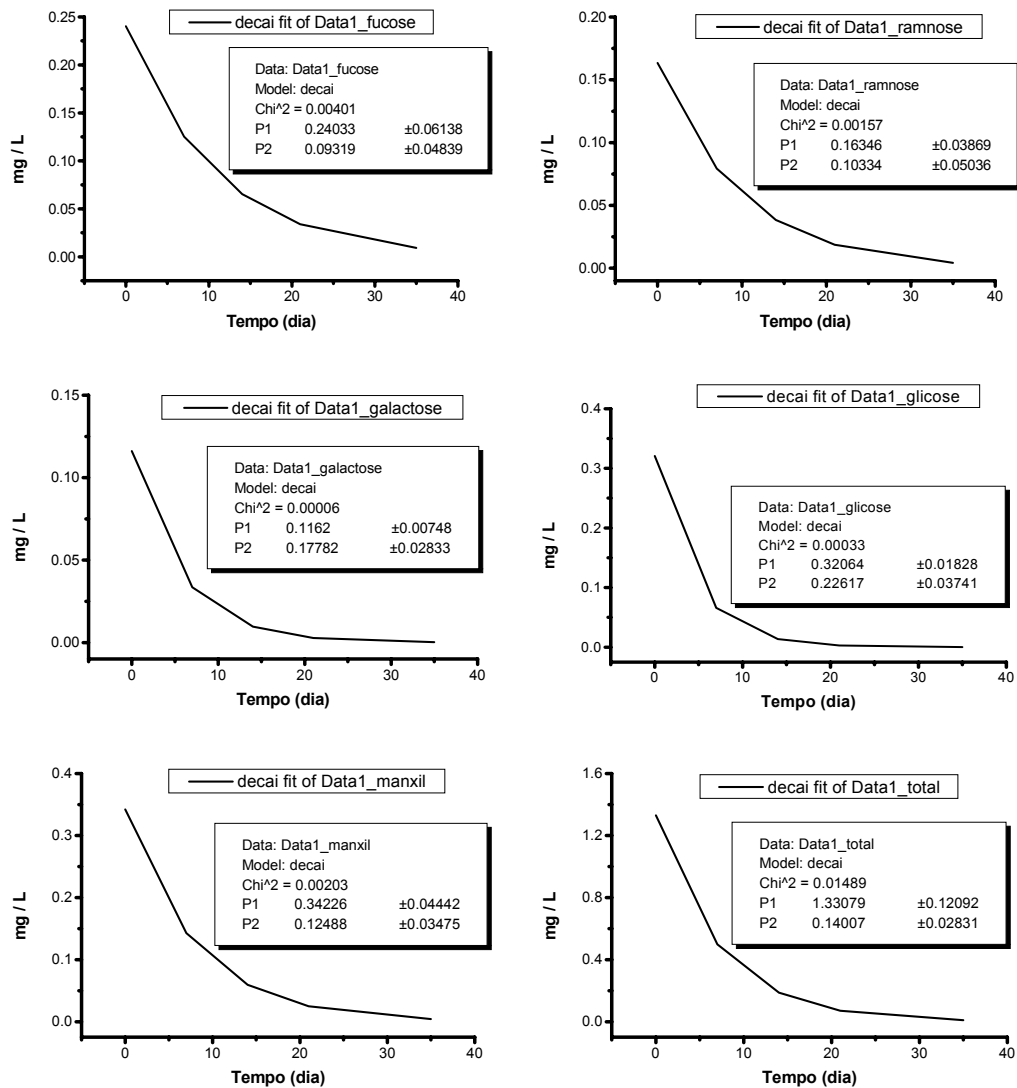


Figura 43: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “C” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *C. tetrapyrenoidosa*. Separação obtida com o gel A-15.

4.3.1.1.2.2) *Staurostrum orbiculare*.

A Tabela 37 mostra a quantificação das frações isoladas pela cromatografia em coluna de gel CL6B e que foram utilizados para a parametrização da degradação do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*, e de cada monossacarídeo que o compõe (Figuras 44 e 45). A Tabela 38 mostra o coeficiente de degradação (k) para cada um dos monossacarídeos componentes das duas frações de polissacarídeos detectadas neste gel,

e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). A Tabela 39 mostra a quantificação obtida por meio da análise em HPLC-PAD das frações separadas pelo gel A-15. As Figuras 46 e 47 mostram a parametrização da degradação das frações separadas neste gel. O coeficiente de degradação (k), bem como o respectivo coeficiente de determinação (r^2) são mostrados na Tabela 40.

Aqui, novamente observou-se uma maior eficiência na análise da degradação pelo gel A-15, pois comparando o coeficiente de determinação mostrados nas Tabelas 38 e 40, pode-se perceber valores de r^2 mais altos na Tabela 40, embora a degradação medida pelo gel CL6B tenha também obtido valores satisfatórios de r^2 . Comparando os coeficientes de degradação obtidos para as duas frações, tanto no gel CL6B, como no gel A-15, percebe-se que a menor massa molecular nem sempre esteve relacionada a uma degradação mais acelerada, já que a degradação da fração “A”, de maior massa molecular, foi aproximadamente duas vezes mais rápida que a fração “B”, de menor massa molecular. Em relação à degradação dos diferentes monossacarídeos componentes de cada fração do polissacarídeo, novamente observou-se uma significativa diferença no padrão de degradação, principalmente na fração “A” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Tanto nos dados obtidos com o gel A-15, como nos dados obtidos com o gel CL6B, fucose, galactose e glicose foram degradadas num padrão mais acelerado (Tabelas 38 e 40). Já a fração “B” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare* apresentou um padrão mais uniforme de degradação entre os diferentes monossacarídeos componentes desta fração, o que será discutido mais adiante.

Tabela 37: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* em mg/L. O erro corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	4,37 ± 0,1	1,062 ± 0,009	0,069 ± 0,004	0,094 ± 0,02	0,074 ± 0,02
Ramnose	0,85 ± 0,08	0,904 ± 0,03	0,037 ± 0,007	0,053 ± 0,01	0,032 ± 0,01
Arabinose	0,83 ± 0,01	0,580 ± 0,005	0,035 ± 0,009	0,044 ± 0,002	0,031 ± 0,01
Galactose	2,00 ± 0,06	0,542 ± 0,009	0,061 ± 0,001	0,068 ± 0,002	0,067 ± 0,002
Glicose	1,06 ± 0,01	0,097 ± 0,01	0,073 ± 0,004	0,078 ± 0,003	0,09 ± 0,006
Man/xil	0,95 ± 0,005	0,339 ± 0,03	0,074 ± 0,004	0,089 ± 0,011	0,089 ± 0,008
Total	10,06 ± 0,2	3,22 ± 0,09	0,349 ± 0,03	0,428 ± 0,02	0,385 ± 0,002
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,470 ± 0,002	0,518 ± 0,02	0,057 ± 0,003	0,039 ± 0,001	0,011 ± 0,002
Ramnose	0,199 ± 0,02	0,248 ± 0,01	0,064 ± 0,025	0,032 ± 0,003	0
Arabinose	0,329 ± 0,01	0,382 ± 0,005	0,057 ± 0,008	0,07 ± 0,01	0
Galactose	0,148 ± 0,001	0,132 ± 0,001	0,023 ± 0,006	0,02 ± 0,006	0,017 ± 0,002
Glicose	0,092 ± 0,002	0,059 ± 0,009	0,042 ± 0,01	0,078 ± 0,006	0,03 ± 0,002
Man/xil	0,216 ± 0,005	0,211 ± 0,01	0,029 ± 0,002	0,029 ± 0,029	0,029 ± 0,01
Total	1,45 ± 0,04	1,55 ± 0,03	0,275 ± 0,04	0,271 ± 0,06	0,087 ± 0,06

Tabela 38: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,21	0,99	0,080	0,74
RAMNOSE	0,086	0,73	0,064	0,73
ARABINOSE	0,11	0,90	0,070	0,73
GALACTOSE	0,19	0,99	0,080	0,84
GLICOSE	0,32	0,99	0,023	0,49
MAN/XIL	0,15	0,98	0,076	0,78
TOTAL	0,17	0,99	0,065	0,76

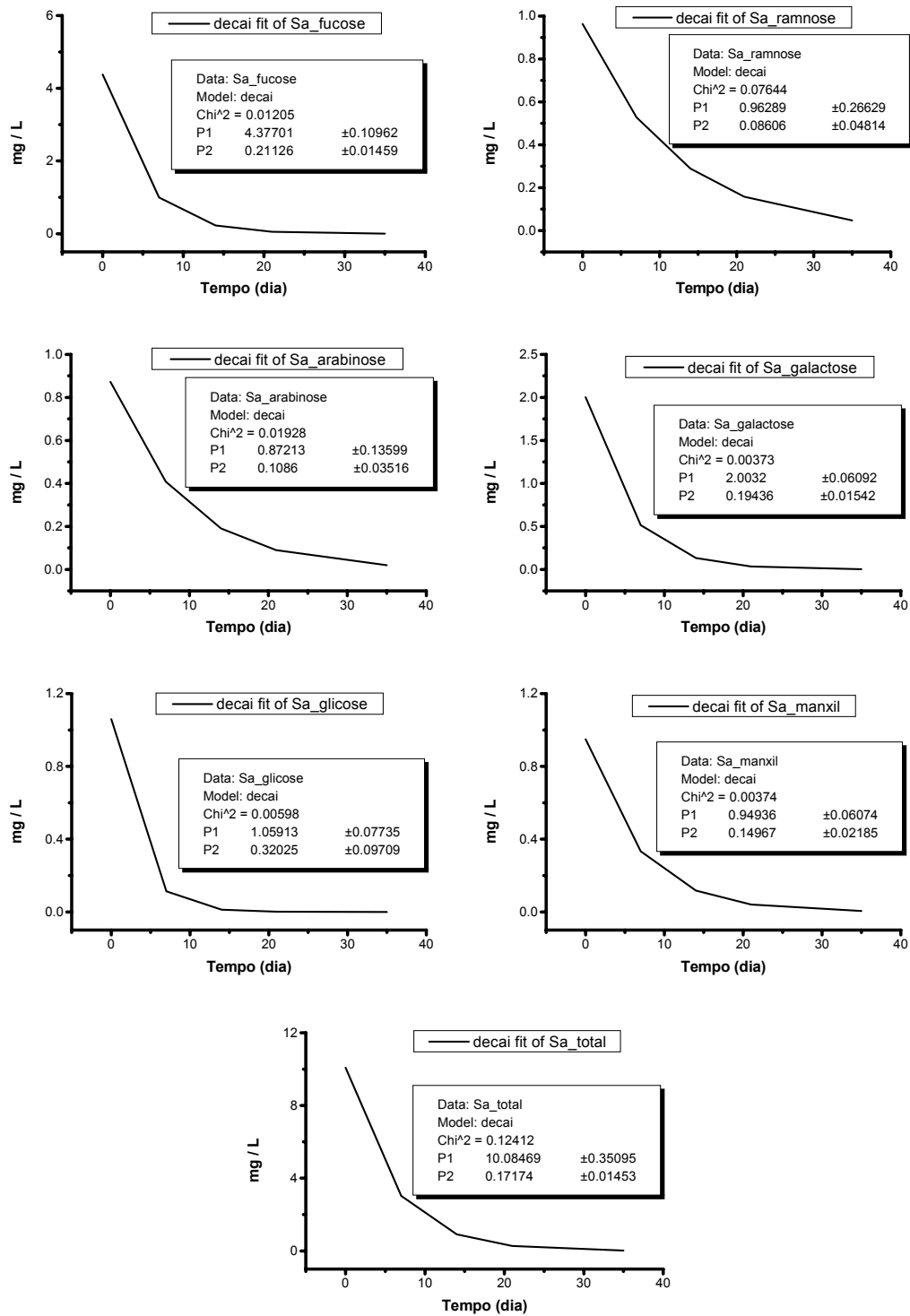


Figura 44: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel CL6B.

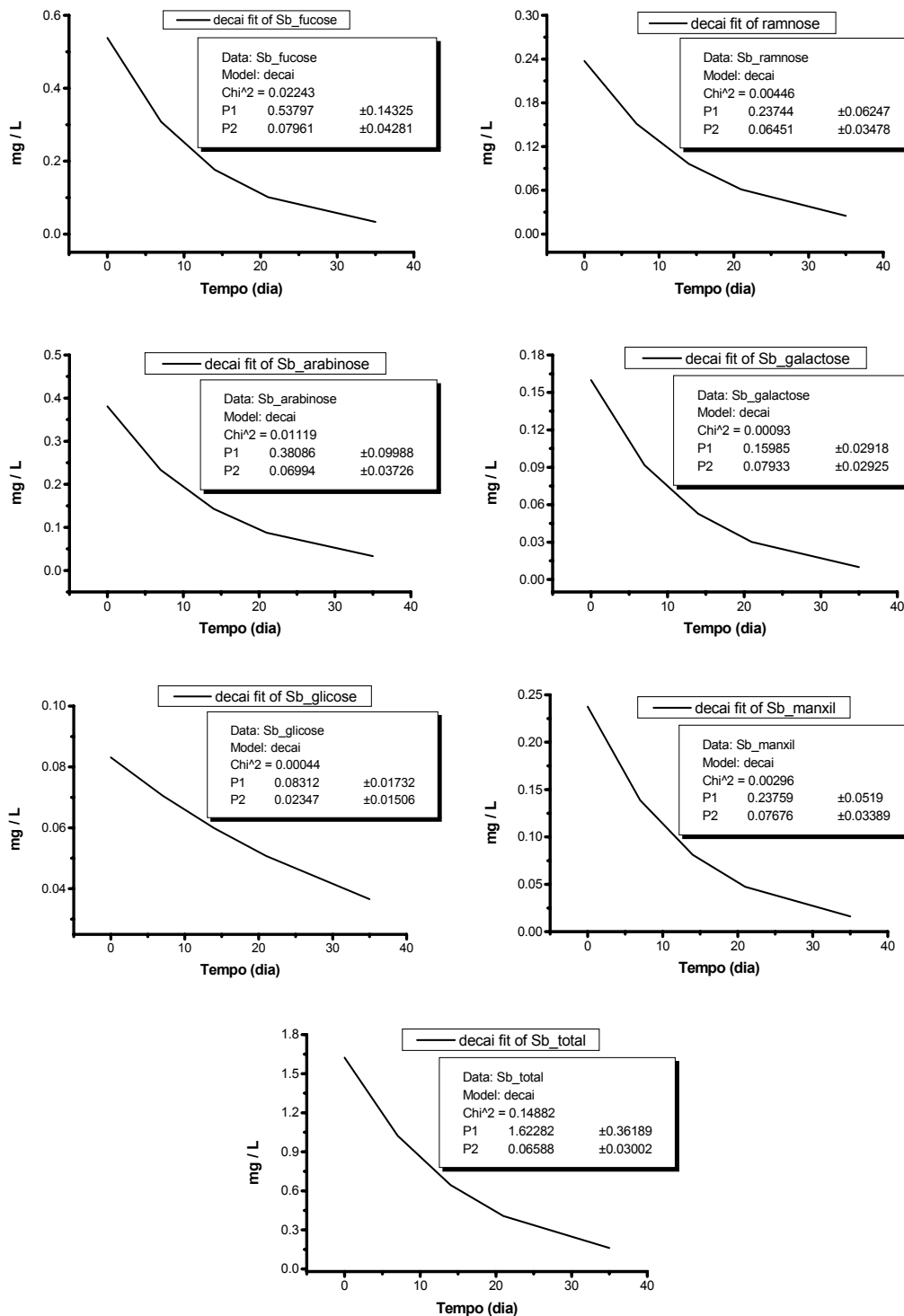


Figura 45: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel CL6B.

Tabela 39: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *S. orbiculare* em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	3,237± 0,25	0,915± 0,014	0,068± 0,013	0,081± 0,015	0,004± 0,0005
Ramnose	0,57± 0,1	0,691± 0,099	0,037± 0,004	0,036± 0,009	0
Arabinose	0,516± 0,048	0,497± 0,051	0,018± 0,002	0,029± 0,006	0
Galactose	1,00± 0,18	0,416± 0,41	0,033± 0,001	0,049± 0,045	0,010± 0,0005
Glicose	0,581± 0,065	0,186± 0,022	0,048± 0,005	0,087± 0,011	0,032± 0,002
Man/xil	0,398± 0,073	0,365± 0,067	0,040± 0,0005	0,055± 0,004	0,014± 0,006
Total	6,271± 0,52	3,072± 0,17	0,245± 0,012	0,336± 0,038	0,067± 0,007
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,731± 0,147	0,781± 0,056	0,012± 0,001	0,02± 0,001	0,015± 0,002
Ramnose	0,395± 0,092	0,402± 0,025	0,018± 0,004	0,020± 0,005	0
Arabinose	0,549± 0,038	0,497± 0,019	0,020± 0,003	0,020± 0,003	0
Galactose	0,247± 0,046	0,191± 0,013	0,017± 0,0005	0,015± 0,002	0
Glicose	0,180± 0,045	0,109± 0,006	0,051± 0,003	0,042± 0,007	0,020± 0,003
Man/xil	0,315± 0,042	0,228± 0,006	0,027± 0,003	0,020± 0,009	0
Total	2,415± 0,22	2,209± 0,043	0,148± 0,01	0,138± 0,011	0,035± 0,005

Tabela 40: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,190	0,99	0,089	0,76
RAMNOSE	0,080	0,68	0,089	0,76
ARABINOSE	0,092	0,78	0,096	0,79
GALACTOSE	0,150	0,98	0,100	0,88
GLICOSE	0,150	0,98	0,075	0,99
MAN/XIL	0,084	0,82	0,100	0,91
TOTAL	0,130	0,97	0,092	0,82

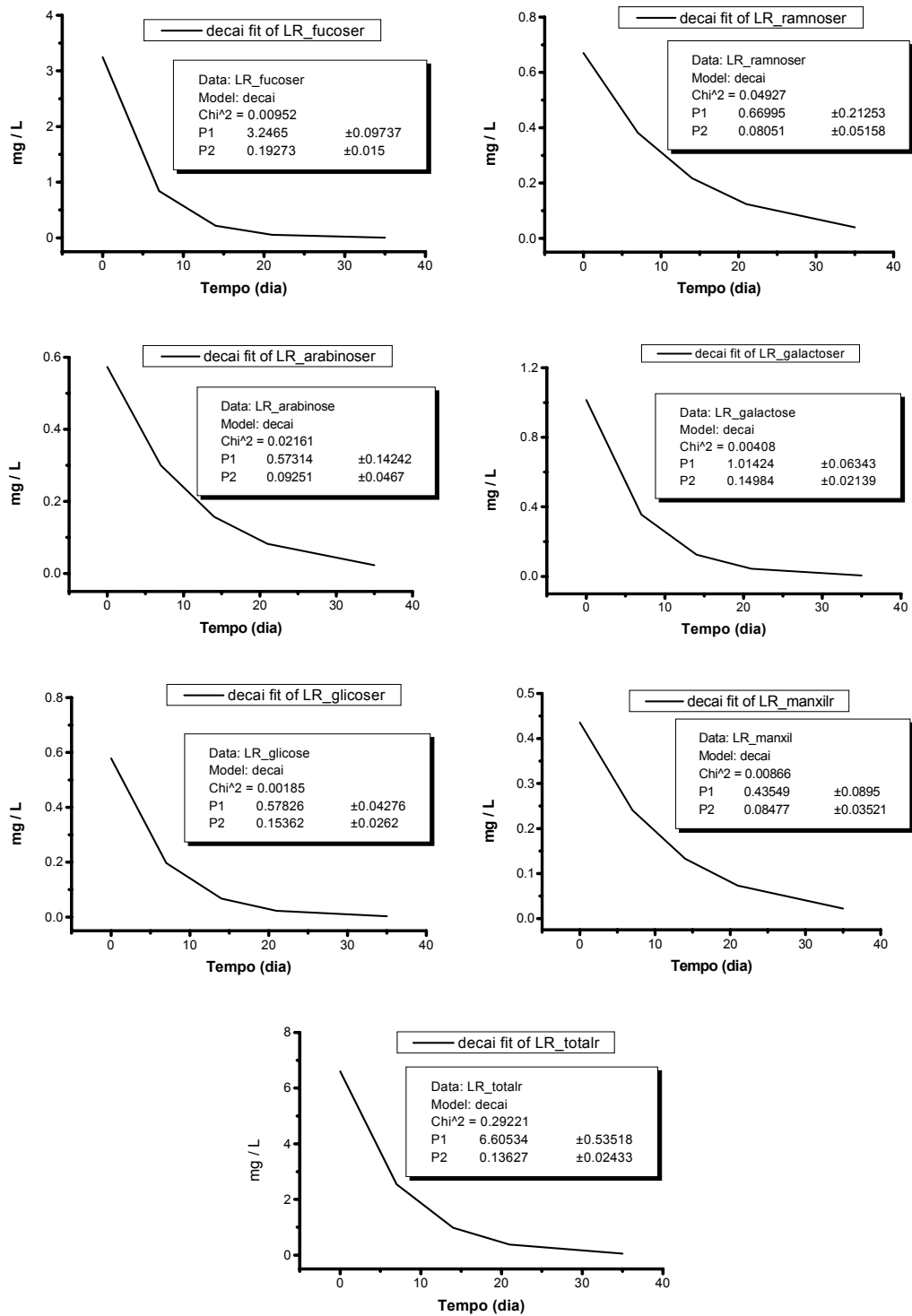


Figura 46: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel A-15.

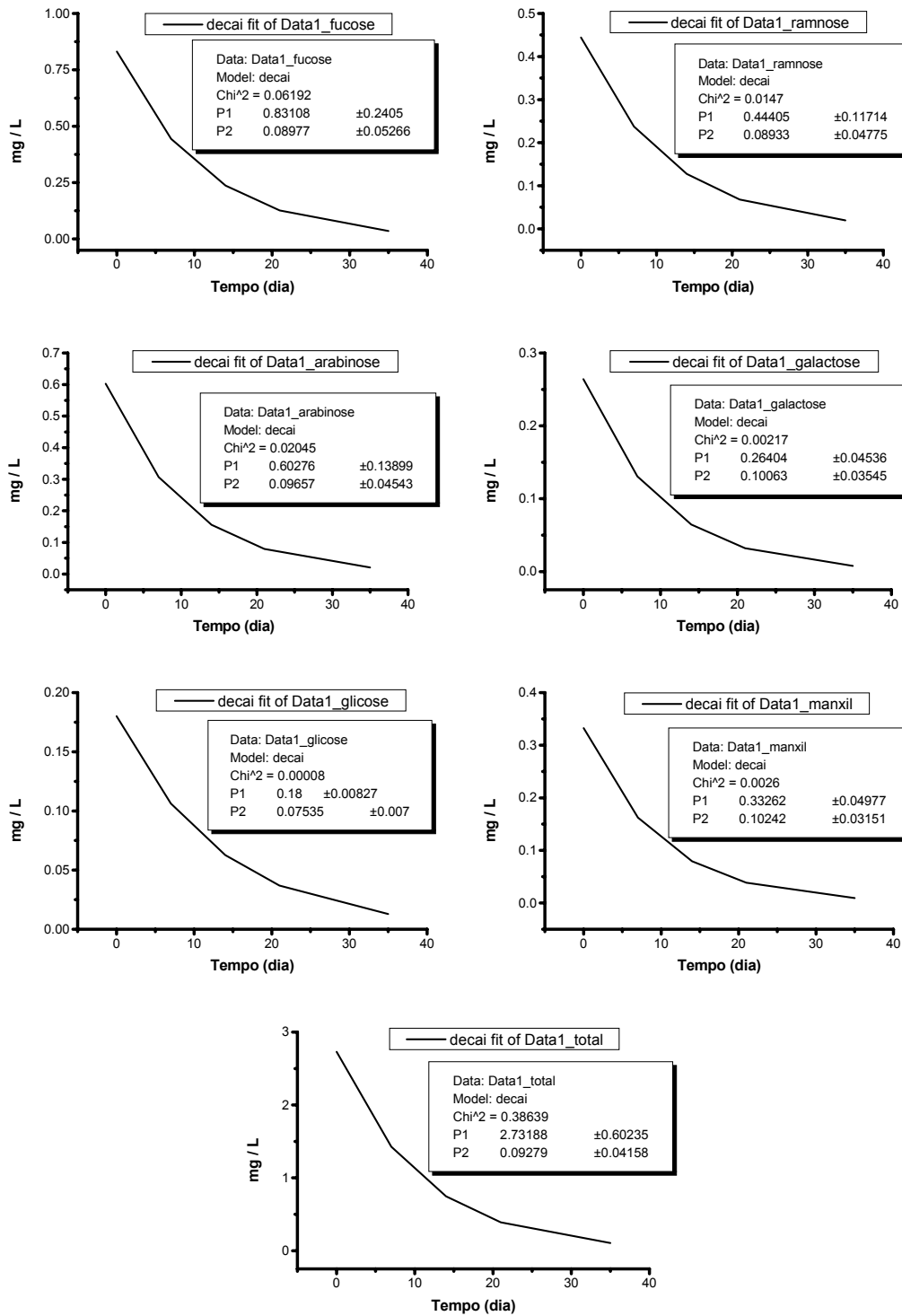


Figura 47: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *S. orbiculare*. Separação obtida pelo gel A-15.

4.3.1.1.2.3) *Thalassiosira* sp.

A Tabela 41 mostra a quantificação das frações isoladas pela cromatografia em coluna de gel CL6B e que foram utilizados para a parametrização da degradação do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp, e de cada monossacarídeo que o compõe (Figuras 48 e 49). A Tabela 42 mostra o coeficiente de degradação (k) para cada um dos monossacarídeos componentes das duas frações de polissacarídeos detectadas neste gel, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2). A Tabela 43 mostra a quantificação obtida por meio da análise em HPLC-PAD das frações separadas pelo gel A-15. As Figuras 50 e 51 mostram a parametrização da degradação das frações separadas neste gel. O coeficiente de degradação (k), bem como o respectivo coeficiente de determinação (r^2) são mostrados na Tabela 44.

No caso da *Thalassiosira* sp, não ficou tão evidente a diferença entre a separação obtida com os dois géis. Comparando os coeficientes de degradação de cada fração (Tabelas 42 e 44), pode-se perceber que a fração de menor massa molecular (“B”) apresentou um padrão mais acelerado em comparação com a fração de maior massa molecular (“A”). Em *Thalassiosira* sp foram observadas marcantes diferenças entre os padrões de degradação dos diferentes monossacarídeos componentes de cada fração. Fucose, ramnose e galactose apresentaram, em todas as frações obtidas com os dois géis, um padrão de degradação menos acelerado que glicose e man/xil (manose ou xilose). Tamanha foi a refratabilidade de fucose, ramnose e galactose neste polissacarídeo, que o modelo matemático não reproduziu o mesmo desempenho que o apresentado para os outros polissacarídeos, mesmo no caso do gel A-15 que, nos outros casos, mostrou um melhor ajuste ao modelo de degradação. Essa diferença na degradabilidade dos monossacarídeos componentes do polissacarídeo excretado por

Thalassiosira sp será abordada com mais detalhe adiante na discussão conjunta dos dados referentes às ligações glicosídicas e de padrões de degradação.

Tabela 41: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp em mg/L. O erro corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,926 ± 0,02	0,998 ± 0,03	0,712 ± 0,02	0,892 ± 0,01	0,097 ± 0,005
Ramnose	0,604 ± 0,02	0,750 ± 0,03	0,468 ± 0,004	0,447 ± 0,03	0,046 ± 0,002
Galactose	0,169 ± 0,06	0,248 ± 0,08	0,1 ± 0,009	0,111 ± 0,005	0,046 ± 0,003
Glicose	0,531 ± 0,09	0,312 ± 0,05	0,128 ± 0,01	0,138 ± 0,009	0,057 ± 0,005
Man/xil	1,891 ± 0,06	1,291 ± 0,1	0,444 ± 0,01	0,493 ± 0,01	0,108 ± 0,006
Total	4,127 ± 0,1	3,59 ± 0,23	1,85 ± 0,05	2,07 ± 0,06	0,356 ± 0,03
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,056 ± 0,006	0,034 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,050 ± 0,006	0,023 ± 0,011
Ramnose	0,036 ± 0,007	0,047 ± 0,009	0,026 ± 0,005	0 ± 0,005	0
Galactose	0,138 ± 0,017	0,014 ± 0,0005	0,011 ± 0,002	0,011 ± 0,0005	0
Glicose	0,765 ± 0,041	0,037 ± 0,004	0,060 ± 0,004	0,025 ± 0,001	0,002 ± 0,002
Man/xil	0,190 ± 0,035	0,080 ± 0,005	0,033 ± 0,004	0,033 ± 0,007	0
Total	1,17 ± 0,1	0,214 ± 0,01	0,159 ± 0,01	0,121 ± 0,02	0,043 ± 0,002

Tabela 42: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp, após separação no gel CL6B, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,027	0,60	0,017	0,35
RAMNOSE	0,034	0,70	0,056	0,67
GALACTOSE	0,033	0,59	0,300	0,99
GLICOSE	0,078	0,97	0,400	0,99
MAN/XIL	0,076	0,96	0,110	0,98
TOTAL	0,050	0,92	0,22	0,95

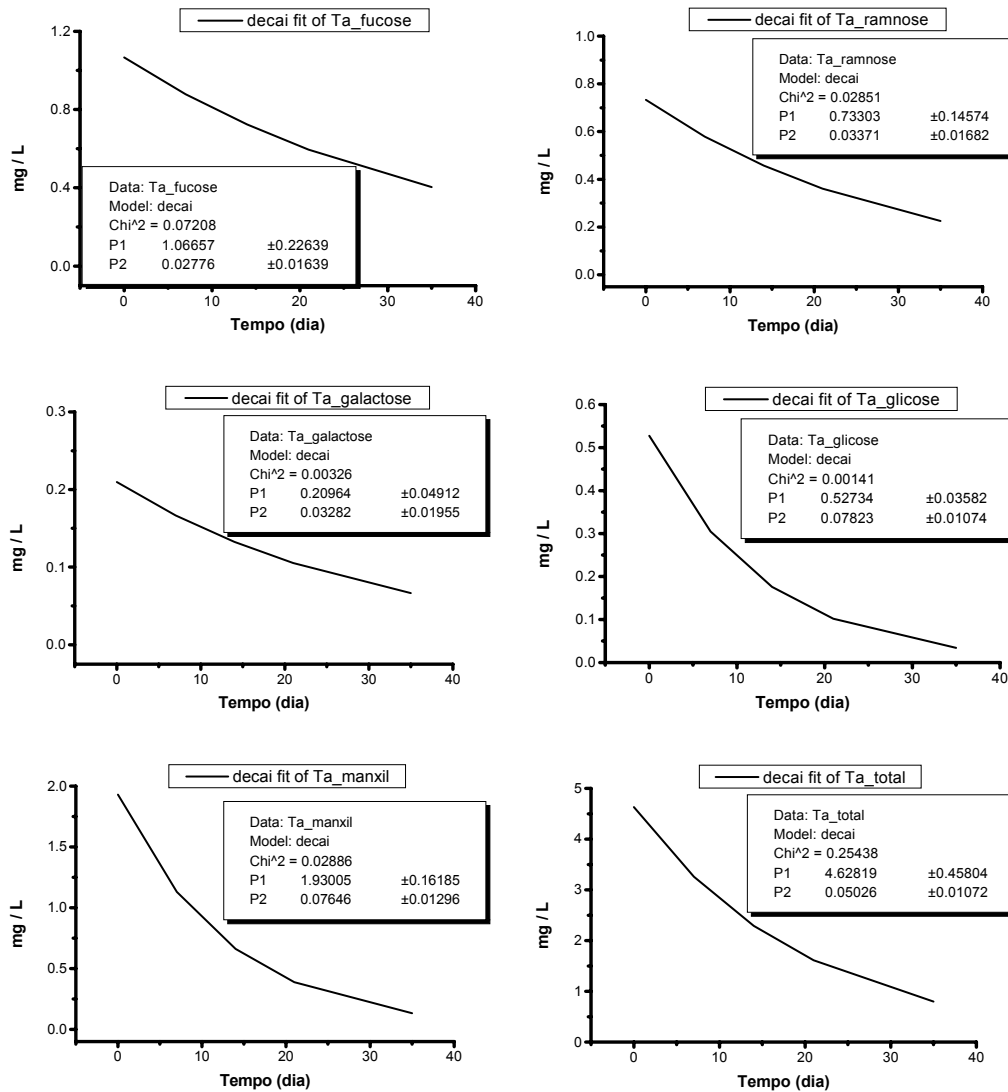


Figura 48: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel CL6B.

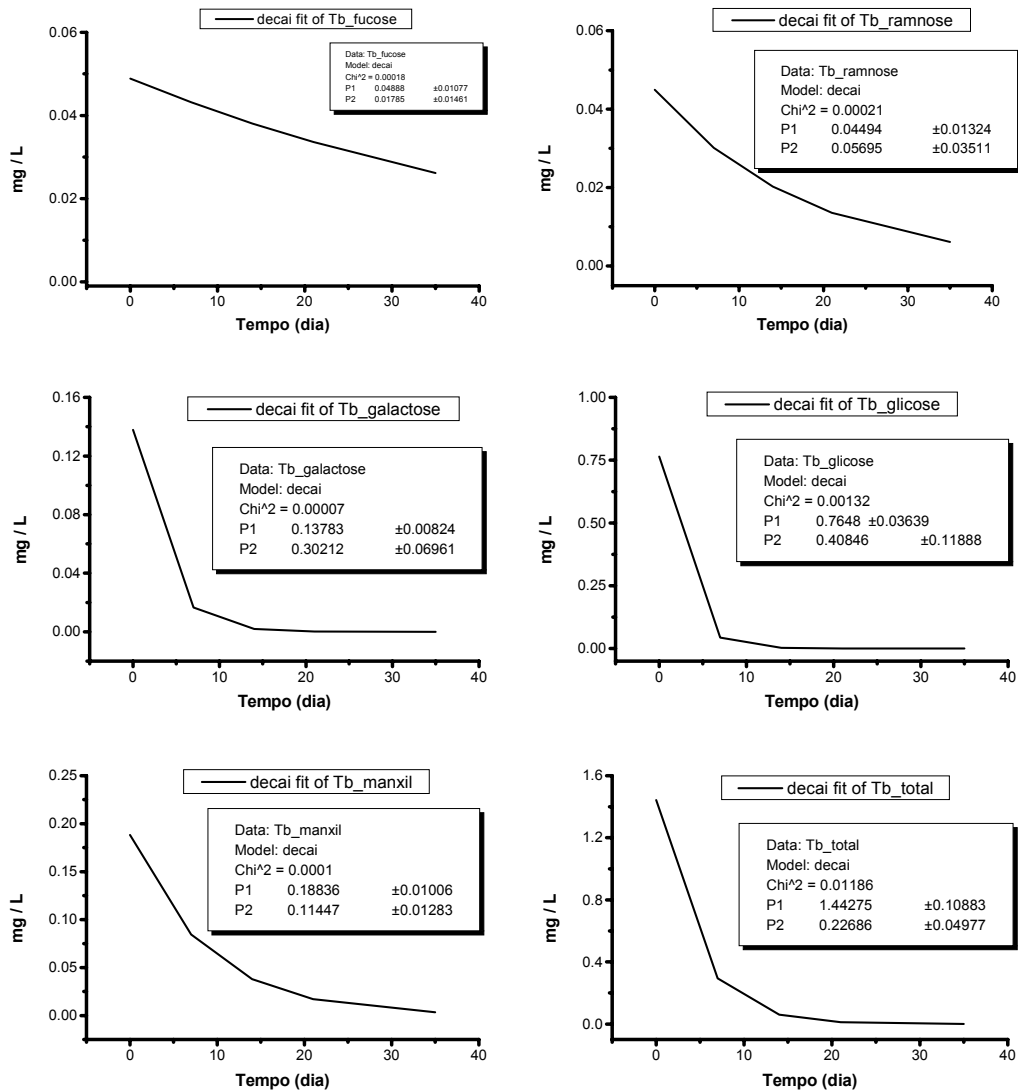


Figura 49: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel CL6B.

Tabela 43: Quantificação dos monossacarídeos componentes da fração “A” e “B”, respectivamente, dos polissacarídeos excretados por *Thalassiosira* sp em mg/L. A separação das frações foi realizada pela cromatografia em coluna de gel A-15. A variação corresponde ao desvio padrão da média (n=3).

A	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,626± 0,03	0,796± 0,026	0,365± 0,098	0,513± 0,021	0,013± 0,0005
Ramnose	0,331± 0,02	0,465± 0,011	0,176± 0,04	0,264± 0,025	0
Galactose	0,057± 0,004	0,072± 0,003	0,025± 0,015	0,043± 0,011	0
Glicose	0,340± 0,2	0,174± 0,007	0,045± 0,01	0,073± 0,014	0
Man/xil	0,925± 0,08	0,487± 0,012	0,078± 0,03	0,150± 0,01	0
Total	2,06± 0,36	1,99± 0,049	0,692± 0,178	1,064± 0,133	0,013± 0,0005
B	Inicial	7 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Fucose	0,039± 0,003	0,044± 0,002	0,033± 0,007	0,027± 0,004	0,020± 0,005
Ramnose	0,052± 0,011	0,066± 0,008	0	0,031± 0,002	0
Galactose	0,036± 0,017	0,012± 0,001	0,020± 0,002	0,015± 0,007	0
Glicose	0,442± 0,071	0,052± 0,004	0,048± 0,012	0,096± 0,021	0
Man/xil	0,200± 0,028	0,075± 0,003	0,042± 0,017	0,083± 0,073	0
Total	0,902± 0,165	0,290± 0,019	0,144± 0,004	0,253± 0,114	0,020± 0,005

Tabela 44: Coeficiente de degradação (k) dos monossacarídeos componentes das frações “A” e “B” do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp, após separação no gel A-15, e o respectivo coeficiente de determinação (r^2).

	Fração “A”		Fração “B”	
	k (dia ⁻¹)	r ²	k (dia ⁻¹)	r ²
FUCOSE	0,036	0,63	0,020	0,83
RAMNOSE	0,038	0,60	0,058	0,53
GALACTOSE	0,041	0,63	0,062	0,75
GLICOSE	0,100	0,96	0,260	0,94
MAN/XIL	0,110	0,96	0,110	0,95
TOTAL	0,054	0,83	0,150	0,95

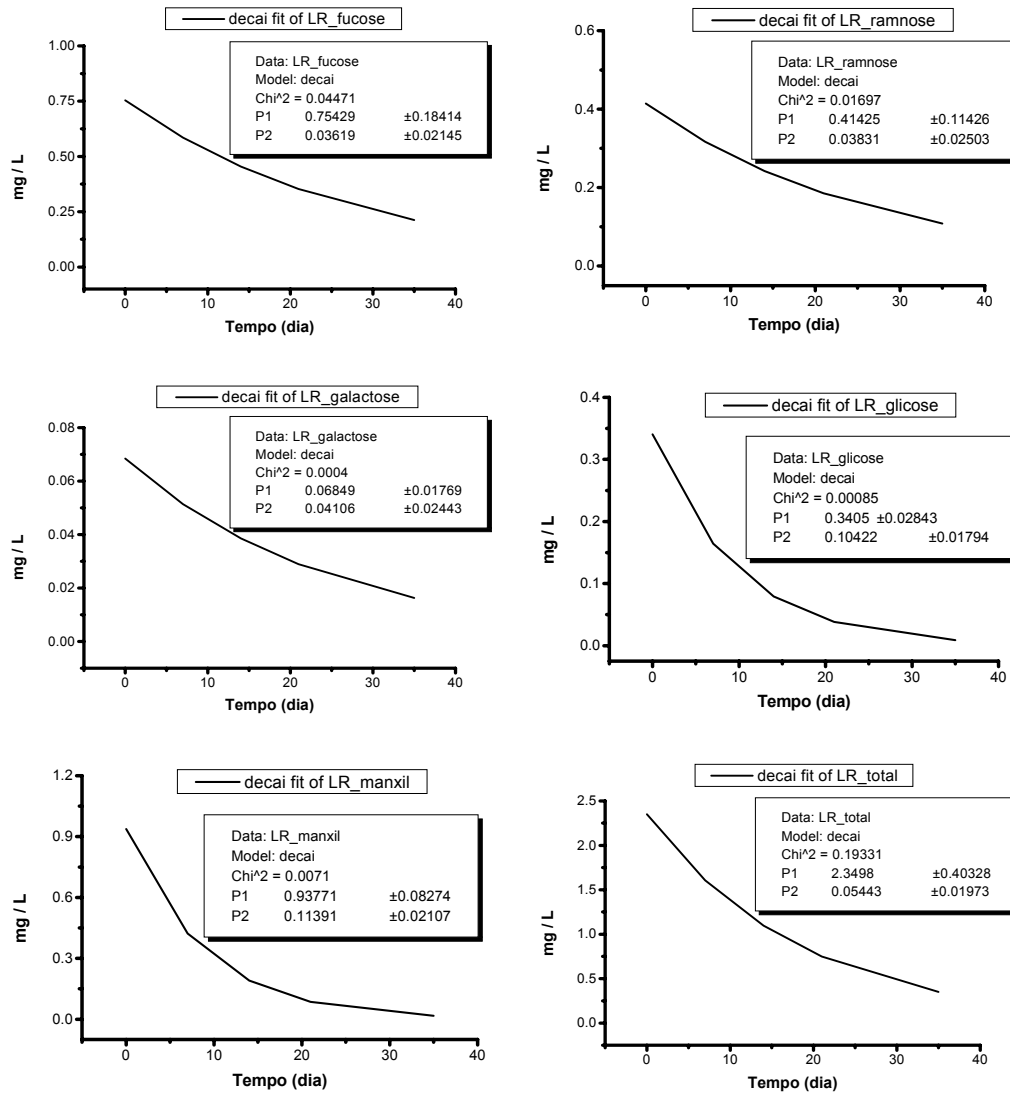


Figura 50: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “A” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel A-15.

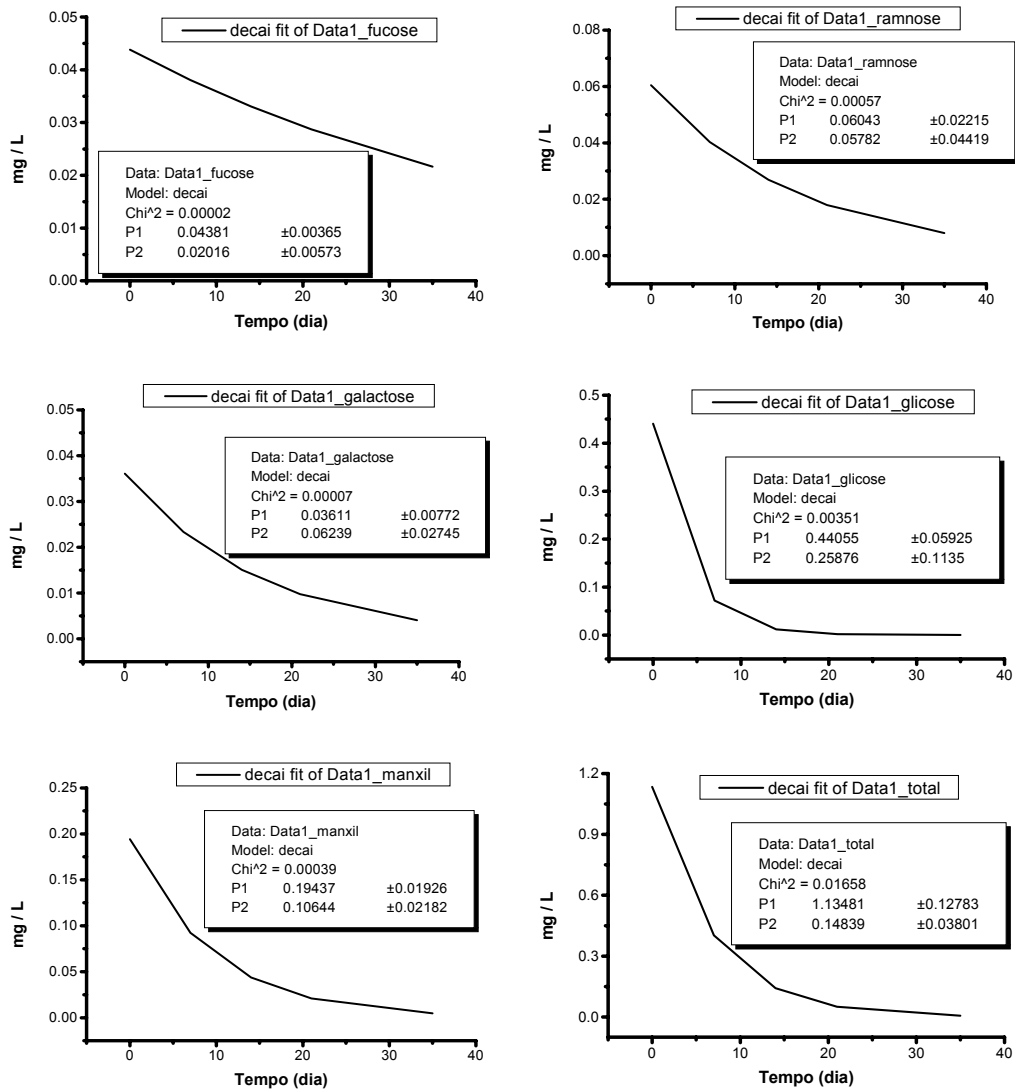


Figura 51: Parametrização da degradação, após análise por HPLC-PAD, da fração “B” (total e cada um dos monossacarídeos) do polissacarídeo excretado por *Thalassiosira* sp. Separação obtida pelo gel A-15.

4.4) ANÁLISE DOS PADRÕES DE DIVERSIDADE BACTERIANA,

A análise dos padrões de diversidade microbiana será aqui mostrada tanto para as amostras do segundo experimento, referentes ao cultivo conjunto alga/bactéria, como do terceiro experimento, referente aos testes de especificidade com substratos de alta e baixa massa molécula.

4.4.1) Amplificação do DNA da comunidade pertencente ao Domínio *Bacteria*.

A Figura 52 mostra a eletroforese em gel de agarose obtida após a amplificação do 16S DNAr da comunidade pertencente ao Domínio *Bacteria*. Nota-se que a amplificação foi bem sucedida, principalmente das amostras integrais das bactérias cultivadas em conjunto com as algas, referentes ao experimento II (linhas 1 a 4), e das amostras diluídas na proporção 1:10 das bactérias desenvolvidas nos excretados de baixa massa molecular (linhas 11, 12 e 13). As amostras integrais das bactérias desenvolvidas nos polissacarídeos não foram bem sucedidas (linhas 5, 6 e 7) e mesmo com a diluição 1:10 na Figura 53 (linhas 1 a 3) e com a purificação do DNA (linhas 4 a 6), os resultados não foram tão satisfatórios como os dos outros dois tipos de substratos. Isso se deve provavelmente à baixa quantidade ou qualidade do DNA extraído ou à presença de contaminantes que podem prejudicar a amplificação. Mesmo assim foram escolhidas as amostras diluídas na proporção 1:10, que obtiveram melhores resultados. O tamanho do fragmento de DNA amplificado esteve de acordo com o esperado, uma vez que a comparação com os padrões indicou aproximadamente 400 pares de bases, como indicado pelas setas.

4.4.2) Análise dos padrões de diversidade bacteriana entre os diferentes substratos.

A Figura 54 mostra o padrão de diversidade bacteriana obtido em cada um dos substratos provenientes das três algas em questão. Os resultados evidenciaram uma drástica mudança na comunidade bacteriana inoculada (linha 1), ou seja, as populações

que não eram dominantes na represa de Barra Bonita, passaram a dominar a partir do contato com os substratos de origem algal. Isso sugere que as populações bacterianas que dominavam a represa estavam adaptadas a outros compostos orgânicos, e aquelas adaptadas especificamente à matéria orgânica excretada pelas algas em questão somente desenvolveram-se quando encontraram estes substratos nos experimentos. Dentre as algas estudadas neste trabalho, *C. tetrapyrenoidosa* destacou-se por sustentar aproximadamente 18 bandas, que podem corresponder a diferentes populações (linha 2), enquanto em *S. orbiculare* encontrou-se aproximadamente 8 bandas (linha 3) e em *Thalassiosira* sp 11 (linha 4). Já nos excretados de baixa massa molecular provenientes de *C. tetrapyrenoidosa* foram encontradas 6 diferentes bandas (linha 5), enquanto em *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp foram encontradas, respectivamente, 4 e 7 bandas distintas (linhas 6 e 7, respectivamente). A diversidade bacteriana desenvolvida nos polissacarídeos das três algas foi mais baixa que nos demais substratos. Nos polissacarídeos excretados por *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp foram encontradas, respectivamente 4, 3 e 3 bandas distintas (linhas 8, 9 e 10). Isso se deve principalmente ao fato da especialização enzimática que a degradação destes compostos requer. Além disso, o excretado de baixa massa molecular é composto por uma variedade de substâncias orgânicas além dos carboidratos, como compostos nitrogenados e lipídeos que também podem sustentar populações bacterianas. Já no caso dos excretados de alta massa molecular, embora haja uma pequena proporção de proteínas, a extensa maioria deste material é formada por polissacarídeos cuja utilização é mais lenta que dos açúcares livres, tornando a degradação destes compostos um processo mais especializado.

Com relação à especificidade das populações bacterianas, foi possível observar algumas bandas específicas a determinados substratos, marcadas com setas número 1 na

Figura 54. Foram observadas também populações que se desenvolveram nas três algas estudadas, bem como populações adaptadas tanto aos polissacarídeos como aos excretados de baixa massa molecular (setas número 2, Figura 54). Pode ser notado também que algumas populações desenvolveram-se com mais vigor quando estavam em conjunto com as algas (setas número 3, Figura 54), enquanto outras se desenvolveram melhor com os excretados sem as algas (setas número 4, Figura 54). Possivelmente as populações que se desenvolveram melhor com as algas dependem delas para suporte mecânico, ou mesmo pela ocorrência de alguns compostos que podem ter sido perdidos no processo de obtenção dos excretados. Já as populações que se desenvolveram melhor sem a presença das células, possivelmente dependeram de uma quantidade de substrato maior do que aquela que estava sendo excretada nos cultivos conjuntos. Quando essas populações foram repicadas nos excretados da respectiva alga, foram expostas a concentrações de substrato maiores do que aquelas encontradas nos cultivos conjuntos, nos quais não houve enriquecimento. É preciso destacar a necessidade de realizar o sequenciamento e a identificação destas populações, o que está sendo providenciado, para reforçar tanto o caráter específico como o generalista das populações, assim como a dependência às altas concentrações de substratos, ou à presença das células. De posse das populações devidamente identificadas, será possível quantificar as variações de diversidade por meio de índices estatísticos. De qualquer forma estes dados possuem um grande valor científico por serem inéditos, tanto na água salgada como na água doce, e por comprovarem o caráter específico e generalista de espécies adaptadas aos excretados algais.

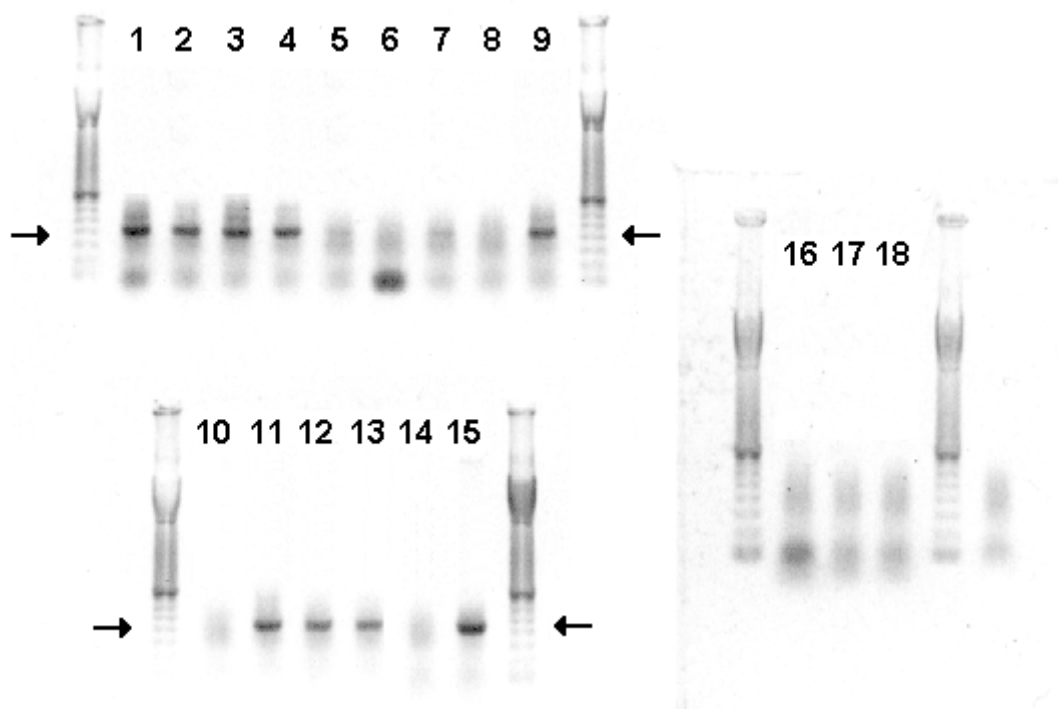


Figura 52: Imagem negativa do gel de agarose 1% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio *Bactéria*. As setas mostram o tamanho do fragmento de DNA amplificado pelos “primers” utilizados (400 pares de bases). **1:** bacterioplâncton da represa de Barra Bonita (inóculo); **2; 3 e 4:** bactérias desenvolvidas respectivamente na cultura de *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp; **5:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **6:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **7:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos; **8:** bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **9:** bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular, **10:** bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; **11:** amostra 8 diluída 1:10 vezes; **12:** amostra 9 diluída 1:10 vezes; **13:** amostra 10 diluída 1:10 vezes; **14:** Água destilada; **15:** Controle positivo *Burkeria* sp; **16, 17 e 18:** Controles negativos *Sarcina* sp.

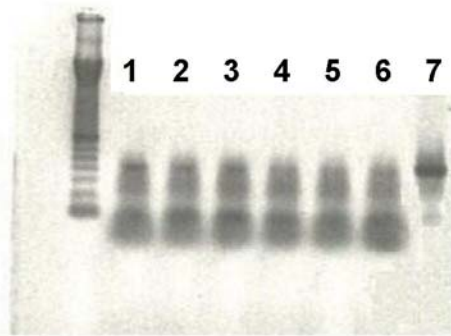


Figura 53: Imagem negativa do gel de agarose 1% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio *Bactéria*. **1:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **2:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **3:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos - diluição 1:10; **4:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado **5:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado; **6:** Bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos - DNA purificado; **7:** Controle positivo - *Burkeria* sp.

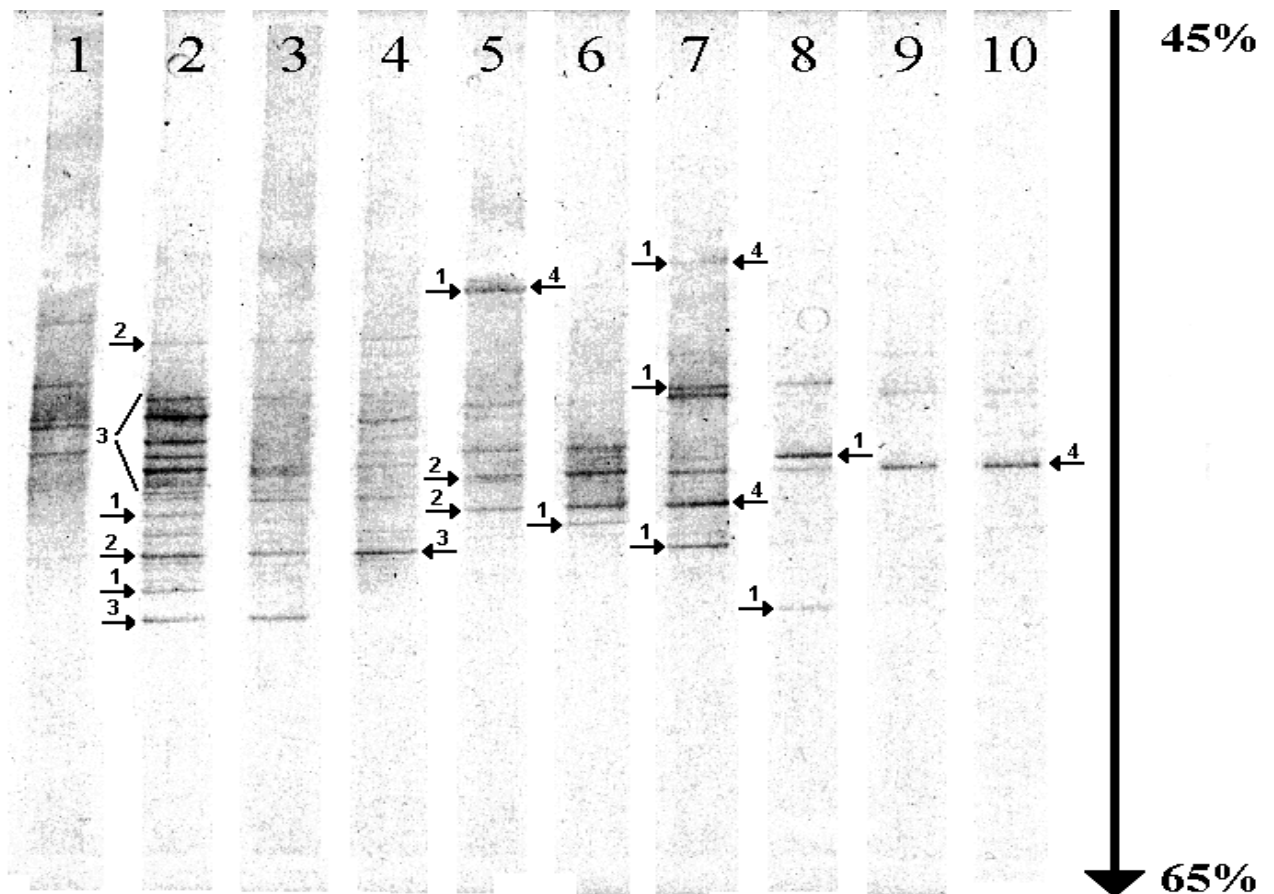


Figura 54: Imagem negativa mostrando o padrão de bandas obtido por meio do DGGE para os produtos amplificados pelo PCR. 1: inóculo de Barra Bonita; 2; 3 e 4: bactérias desenvolvidas respectivamente nas culturas de *C. tetrapyrenoidosa*, *S. orbiculare* e *Thalassiosira* sp; 5: bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; 6: bactérias desenvolvidas na cultura de *S orbiculare* e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular, 7: bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos excretados de baixa massa molecular; 8: bactérias desenvolvidas na cultura de *C. tetrapyrenoidosa* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; 9: bactérias desenvolvidas na cultura de *S. orbiculare* e repicadas nos respectivos polissacarídeos; 10: bactérias desenvolvidas na cultura de *Thalassiosira* sp e repicadas nos respectivos polissacarídeos. **Setas 1:** Bactérias específicas a algum dos substratos. **Setas 2:** Bactérias capazes de degradar diferentes tipos de substrato. **Setas 3:** Bactérias que se desenvolveram melhor com a presença das algas. **Setas 4:** Bactérias que se desenvolveram melhor sem a presença das algas.

5) DISCUSSÃO.

Na discussão deste trabalho serão abordados, inicialmente, alguns aspectos em separado dos resultados obtidos em cada experimento; porém, como os mesmos são complementares no entendimento das associações fitoplâncton/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados pelas algas, far-se-á necessária a interligação dos dados para melhor discutir as hipóteses propostas nesta tese. Em relação ao crescimento axênico das espécies fitoplanctônicas é importante mencionar que o crescimento mais acelerado de *Thalassiosira* sp e *C. tetrapyrenoidosa* já era esperado, pois a maioria das espécies planctônicas de Cryptophyceae (Klaveness 1985) e Bacillariophyceae (Alcoverro *et al.* 2000) apresentam crescimento rápido, além do fato das células de *S. orbiculare* serem consideravelmente maiores (Figura 1). Segundo Banse (1976) e Sheldon (1984), a taxa de crescimento é inversamente proporcional ao tamanho das células. No entanto as taxas de crescimento absolutas aqui obtidas não devem ser inferidas para populações naturais, considerando-se que os objetivos principais do cultivo em condições axênicas foram a obtenção e caracterização dos carboidratos extracelulares, principalmente polissacarídeos, e o conhecimento do tempo levado pela cultura para atingir a fase senescente, portanto sob condições nutricionais, parâmetros de luz e temperatura diferentes daqueles encontrados no ambiente natural.

Embora a excreção de carboidratos tenha sido mais intensa em *S. orbiculare*, em todas as espécies em questão ocorreu um aumento significativo na taxa de excreção por célula com a entrada da cultura na fase estacionária de crescimento. Isso pode ser relacionado diretamente com a hipótese do "excesso de carbono fotoassimilado" proposta por Fogg (1983), ou seja, condições ambientais que limitam a divisão e a estruturação celular, mas não a fotossíntese (Vieira & Mykkestad 1986, Vieira *et al.* 1994), causariam um excesso de carbono fotoassimilado que seria então desviado para a

excreção de carboidratos. Constatou-se também que a maioria dos carboidratos excretados pelas espécies em questão é representada por polissacarídeos, assim como Vieira *et al.* (1998), Giroldo & Vieira (1999, 2002), evidenciando a especialização do fitoplâncton na excreção deste tipo de composto, um processo ativo que envolve a participação de vesículas do complexo de Golgi (Domozych & Domozych 1993). A heterogeneidade monomérica e estrutural dos polissacarídeos excretados pelas espécies envolvidas neste trabalho é comum a quase todos os gêneros de algas de água doce (Paulsen & Vieira 1994) e evidencia a complexidade metabólica do processo de produção e excreção de polissacarídeos pelo fitoplâncton. Espécies muito próximas taxonomicamente podem produzir polissacarídeos extracelulares completamente diferentes, como no caso de uma espécie de solo pertencente ao gênero *Cryptomonas* (Paulsen *et al.* 1992), em comparação à *Cryptomonas obovata* (Giroldo & Vieira 2002) e *C. tetrapyrenoidos* apresentada nesta tese. Por este motivo, as funções extracelulares dos polissacarídeos secretados pelo fitoplâncton há tanto intrigam a comunidade científica, uma vez que um processo com tal complexidade metabólica, dificilmente poderia ser explicado como uma produção de “luxo”, ou como uma perda natural, como já foi proposto para a excreção de carboidratos de baixa massa molecular (Bjørnsen 1988).

Pela ótica da ecologia evolutiva, é difícil imaginar que a seleção natural mantenha tal complexidade metabólica sem vantagens reprodutivas para o fitoplâncton, e o que aparenta ser um gasto energético desperdiçado, poderia ser fixado geneticamente às populações via seleção de grupo (Pianka 1994). Axelhold & Hamilton (1981) definem seleção de grupo como um tipo especial de seleção agindo em parentes muito próximos para produzir cooperação. A reprodução assexuada, predominante no fitoplâncton, facilitaria este tipo de seleção e mesmo que poucas células sobrevivessem

ao "stress" imposto pela limitação nutricional característico da fase estacionária de crescimento, estas poderiam conter o "pool" genético responsável pela excreção de polissacarídeos. Assim, toda a jovem população que seria beneficiada pela excreção realizada outrora por células em limitação nutricional, seria portadora do conjunto gênico responsável pela excreção de polissacarídeos nestas condições em que a divisão e a estruturação celular seriam limitadas (Giroldo 1998). Esse mecanismo funcionaria como um comportamento pseudo-altruístico (Pianka 1994), como em abelhas operárias morrendo na defesa da colméia e outros exemplos já bem conhecidos na literatura, definido também como seleção de parentesco. Ou seja, o genótipo responsável pelo comportamento de morrer em defesa da colméia seria selecionado positivamente porque passaria às próximas gerações pelas sobreviventes ao ataque. As formas pelas quais o fitoplâncton seria beneficiado pela excreção de carboidratos ainda são obscuras e não necessariamente obedecem a um mecanismo de retorno energético nutricional, pois provavelmente as funções extracelulares destes compostos foram extremamente diversificadas pela evolução e evoluíram em habitats distintos com características específicas (Giroldo & Vieira 2002).

As associações do fitoplâncton com bactérias planctônicas já foram bastante discutidas na literatura, inclusive em termos de especificidade, embora vinculadas ao excretado total e não aos carboidratos especificamente (Bell & Mitchell 1972, Bell & Sakshaug 1980, Falowfield & Daft 1988); porém, não ficou definitivamente comprovado se as associações seriam comensais ou se existiria algum grau de reciprocidade caracterizando uma relação mutualista. Nos resultados apresentados nesta tese, as associações das espécies fitoplanctônicas com bactérias do plâncton provenientes do reservatório de Barra Bonita, e o vínculo destas com a produção de carboidratos extracelulares pelas algas, ficaram bastante evidentes. A análise

comparativa dos carboidratos extracelulares produzidos nas culturas axênicas e contaminadas revelou dados importantes, mostrando que mesmo em concentrações muito baixas (< 1 mg/L), eles podem sustentar densas populações bacterianas (10^6 Bact/mL), como foi preconizado por Wood & Van Valen (1990). Os experimentos mostraram com clareza que tanto os carboidratos livres, como os poliméricos, foram degradados pela comunidade bacteriana e podem funcionar como substrato para o estabelecimento de associações, cuja especificidade foi comprovada pela análise dos padrões de diversidade bacteriana em cada uma das espécies fitoplanctônicas em questão.

No caso de *C. tetrapyrenoidosa* e *S. orbiculare* não foi observado nenhum tipo de benefício nem prejuízo do crescimento algal em função do estabelecimento de populações bacterianas crescendo conjuntamente às algas, possivelmente devido ao curto período experimental associado às baixas concentrações de excretados. Já em *Thalassiosira* sp ficou bastante evidente o prolongamento da fase exponencial e o aumento da biomassa algal na cultura contaminada com as bactérias planctônicas. Este fato pode ter relação com a utilização seletiva dos carboidratos excretados por esta espécie, uma vez que a fucose e a ramnose, ambos deoxy açúcares de natureza reconhecidamente hidrofóbica, foram degradados em padrões mais lentos causando o seu aumento relativo durante a degradação microbiana. Passow *et al.* (1994) apresentou uma hipótese relacionando o papel dos polissacarídeos excretados pelas diatomáceas na formação de agregados no ambiente marinho. Segundo os autores, os polissacarídeos liberados pelas algas seriam importantes formadores de agregados e forneceriam superfície mecânica para a fixação de bactérias, além de fonte de carbono de alta qualidade. As bactérias, por sua vez, crescendo nas imediações das diatomáceas agregadas, promoveriam o crescimento algal pela remineralização de nutrientes

essenciais neste microhabitat, fato já comprovado pela literatura (Gotschalk & Alldredge 1989).

Sabe-se que a ramnose é um açúcar de característica bastante hidrofóbica, assim como a fucose, devido ao carbono 6 estar ligado a um radical metil que altera a polaridade do açúcar. Se a porcentagem destes monossacarídeos aumenta com a degradação inicial do polissacarídeo, este se torna cada vez mais hidrofóbico e mais facilmente poderia formar agregados, o que por sua vez facilitaria a fixação das bactérias e poderia trazer a remineralização de nutrientes para a alga. Estudos futuros devem ser direcionados para comprovar a maior formação de agregados em função do aumento da hidrofobicidade dos polissacarídeos produzidos por espécies fitoplanctônicas, não só diatomáceas.

Essa degradação seletiva ficou também bastante evidente, pois a posição terminal ou em cadeias destes monossacarídeos na estrutura do polissacarídeo não foi fator preponderante na aceleração ou diminuição da degradação. Em *C. tetrapyrenoidosa*, a degradação mais acelerada foi observada principalmente na galactose, que possui 30 % de suas ligações glicosídicas em cadeias do tipo 1,3; enquanto ramnose, que possui 90 % de suas ligações glicosídicas em posição terminal, teve a degradação mais lenta entre todos os constituintes deste polissacarídeo. Em *S. orbiculare*, glicose e fucose tiveram a degradação mais acelerada e contam com, respectivamente, 66 e 48,4 % de suas ligações glicosídicas em cadeias do tipo 1,4 e 1,3; enquanto ramnose teve a degradação mais lenta e conta com 72,5 % de suas ligações glicosídicas em posição terminal. O mesmo ocorreu em *Thalassiosira* sp, na qual a degradação mais acelerada foi de manose e glicose, que também contam com porcentagens significativas de ligações em cadeias, enquanto galactose, com uma degradação bastante lenta, conta com a maioria de suas ligações glicosídicas em posição

terminal. Ou seja, as bactérias atacaram sítios específicos dos polissacarídeos e, inclusive, sítios diferentes entre os diferentes polissacarídeos estudados.

A análise do padrão de diversidade das bactérias pelo DGGE confirmou bandas específicas e estudos futuros serão dirigidos para identificar estas populações. Também ficou bastante clara a tendência geral de maior refratabilidade da ramnose, mesmo quando esta contava com 90% de suas unidades em posição terminal como em *C. tetrapyrenoidosa*, ou 70%, como em *S. orbiculare*, o que pode estimular a discussão acima apresentada no que tange à possibilidade da degradação seletiva estimular a formação de agregados em outras espécies fitoplanctônicas.

Embora a identificação das populações bacterianas não tenha sido completa, a especificidade das associações alga/bactéria no plâncton, hipótese central deste trabalho, foi demonstrada pelo padrão de diversidade bacteriana observado nas diferentes espécies fitoplânctônicas e nos seus respectivos excretados, bem como a vinculação dessas relações à excreção de carboidratos pelo fitoplâncton. No curso da comprovação desta hipótese, diversos foram os aspectos inéditos observados nesta tese, entre outros mais óbvios, como a própria caracterização de carboidratos excretados por espécies nunca antes estudadas: a caracterização de um padrão de degradação microbiana seletiva dos polissacarídeos excretados pelas espécies em questão; a demonstração de uma associação recíproca entre *Thalassiosira* sp e as bactérias planctônicas do reservatório de Barra Bonita com vantagens para ambas as classes de organismos e a demonstração da seleção imposta por diferentes substratos de origem algal à diversidade de populações bacterianas. Apesar disso, inúmeros foram os apontamentos para estudos futuros que não puderam, por uma questão de tempo, ser abordados neste trabalho. Entre eles destacam-se: a análise da diversidade bacteriana em função da incubação, ou seja, se as diferentes populações observadas ao final dos experimentos atuaram em

conjunto ou se elas se sucederam em diferentes etapas da degradação; a comprovação da maior formação de agregados em função da degradação seletiva, bem como o efeito dessa agregação na remineralização de nutrientes, além do estudo das alterações estruturais e das propriedades físico-químicas dos polissacarídeos em função da atuação das diferentes populações bacterianas nestes compostos. A excreção de carboidratos pelo fitoplâncton é, sem dúvida, um processo de extrema complexidade que vai continuar intrigando muitas gerações de pesquisadores.

6) CONCLUSÕES.

⇒ As associações específicas alga/bactéria vinculadas à excreção de carboidratos pelo fitoplâncton foram comprovadas, destacando também a existência de associações generalistas;

⇒ Os carboidratos excretados pelas espécies fitoplanctônicas estudadas constituiu-se uma importante fonte de carbono para o estabelecimento de populações bacterioplanctônicas a elas associadas;

⇒ As associações alga/bactéria somente mostraram reciprocidade com vantagens para ambos os organismos para a espécie fitoplanctônica *Thalassiosira* sp;

⇒ A excreção de carboidratos pelas espécies fitoplanctônicas em estudo foi maior com a entrada das culturas na fase estacionária de crescimento;

⇒ A composição dos carboidratos excretados pelas espécies fitoplanctônicas em questão foi profundamente heterogênea, evidenciando liberação de carboidratos extracelulares pelo fitoplâncton como um processo espécie-específico.

7) BIBLIOGRAFIA

ALCOVERRO, T.; CONTE E.; MAZZELLA L. Production of mucilage by the Adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. **J. Phycol.**, v. 36, p. 1087-1095, 2000.

AXELROLD, R.; HAMILTON, W. D. The evolution of cooperation. **Science.**, v. 211, p. 1390-1396, 1981.

BANSE, K. Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as related to cell size: a review. **J. Phycol.**, v. 12, p. 135-140, 1976.

BARSETT, H.; PAULSEN, B. S.; HABTE, Y.. Further characterization of polysaccharides in seeds from *Ulmus glabra* Huds. **Carboh. Polymer.**, v. 18, p. 125-130, 1992.

BELL, W. H.; MITCHELL, R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. **Biol. Bull.**, v. 143, p. 265-277, 1972.

BELL, W.H.; SAKSHAUG, E. Bacterial utilization of algae products. Parte 2: a kinetic study of natural population. **Limnol. Oceanogr.**, v. 19, p. 833-839, 1980.

BONEY, A. D. Mucilage: the ubiquitous algal attribute. **Br. Phycol. J.**, v. 16, p. 115-132, 1981.

BJØRNSEN, P. K. Phytoplankton exudation of organic matter: why do healthy cells do it. **Limnol. Oceanogr.**, v. 33, p. 151-154, 1988.

CALIJURI, M. C. 1999. **A comunidade fitoplanctônica em um reservatório tropical (Barra Bonita, SP)**. 1999. 211 p. Tese (Livre Docência) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 1999.

COVENEY, M. F. Bacterial uptake of photosynthetic carbon from freshwater phytoplankton. **Oikos**, v. 38, p. 8-20, 1982.

DOMOZYCH, D.S.; DOMOZYCH, C.R. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium*. Parte 2: ultrastructure and immunocytochemistry. **J. Phycol.**, v. 29, n. 5, p. 659-667, 1993.

DUBOIS, M.; GUILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITHS, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356. 1956.

FALLOWFIELD, H. J.; DAFT, M. J. The extracellular release of dissolved organic carbon by freshwater Cyanobacteria and algae and the interaction with *Lysobacter* CP-1. **Br. Phycol. J.**, v. 23, p. 317-326, 1988.

FOGG, G. E. **Algae Cultures and Phytoplankton Ecology**. Wiscosin, Londres: The University of Wiscosin press, 1975, 175 p.

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Bot. Mar.**, v. 26, p. 3-14, 1983.

FREIRE-NORDI, C. S.; VIEIRA, A. A. H. Utilization of extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae) by heterotrophic bacteria. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 27-32, 1996.

FREIRE-NORDI, C. S.; VIEIRA, A. A. H. Degradability of polysaccharides compounds excreted by *Ankistrodesmus densus* Kors (Chlorophyceae) in cultures of natural bacterial communities. **Verh. Internat. Verein. Limnol.**, v. 26, p. 1685-1688, 1998.

GIROLDO, D. **O Efeito da Irradiância e da Disponibilidade de nitrato na excreção de carboidratos por *Cryptomonas obovata* (CRYPTOPHYCEAE)**. 1998. 82 p. Dissertação (Mestrado em ecologia e recursos naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H. Assimilation and release of ^{14}C in a tropical strain of *C. obovata* (Cryptophyceae) exposed to several irradiances. **J. Plankton Res.**, v. 21, n. 10, p. 1911-1921, 1999.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H. An extracellular sulphated fucose-rich polysaccharides produced by a tropical strain of *C. obovata* (Cryptophyceae). **J. Applied Phycology**, v. 14, n. 3, p. 185-191, 2002.

GOTSCHALK, C. C.; ALLDREDGE, A. L. Enhanced primary productions and nutrient regeneration within aggregated marine diatoms. **Mar. Biol.**, v. 102, p. 1-11, 1989.

GREMM, T. J.; KAPLAN, L. A. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC-PAD and pulse amperometric detection. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, n. 2, p. 385-393, 1997.

GUILLARD, R. R. L.; WANGERSKY, P. J. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. **Limnol. Oceanogr.**, v. 3, p. 449-454, 1958.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **J. Phycol.**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HELLEBUST, J. A. Extracellular products. In: STEWART, W.D.P. (Ed.). **Algal Physiology and Biochemistry**. Botanical Monographs v. 10. Blackwell Scientific, Oxford, p. 838-863, 1974.

JENSEN, L. M. Phytoplankton release of extracellular organic carbon, molecular weight and bacterial assimilation. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 11, n. 1, p. 39-48, 1983.

JØRGENSEN, N. O. G. Assimilation of free monosaccharides and amino acids relative to bacterial production in eutrophic lake water. **Arch. Hydrobiol. Beith.**, v. 34, p. 357-362, 1990.

JØRGENSEN, N. O. G.; JENSEN, R. E. Microbial fluxes of free monosaccharides and total carbohydrates in freshwater determined by PAD-HPLC. **Microb. Ecol.** v. 14, p. 79-94, 1994.

KLAVENESS, D. Ecology of Cryptomonadida: a first review. In: SONDGREN, C. D. (Ed.). **Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton.** p. 105-133, 1985.

KIM, J. B.; CARPITA, N. C. Changes in esterifications of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongations of maize coleoptiles. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 646-653, 1992.

LARSSON, U.; HANGSTRÖM, A. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria. **Mar. Biol.**, v. 52, p. 199-206, 1979.

LEWIN, R. A. Extracellular polisaccharides of green-algae. **Can. J. Microbiol.**, v. 18, p. 418-426, 1956.

LINDBERG, B. Methylation Analysis of Polysaccharides. In: GINSBURG, V. (Ed.). **Methods in enzymology – complex carbohydrates.** Academic Press, 1972, p. 178-195.

MERRET, M. J.; LORD, J. M. Glycollate formation and metabolism by algae. **New Phytol.** v. 72, p. 751-67, 1973.

MOPPER, K.; SCHULTZ, C. A.; CHEVOLOT, L.; GERMAIN, C.; REVUELTA, R.; DAWSON, R. Determination of sugar in unconcentrated seawater and other natural waters by liquid chromatography pulse amperometric detection. **Environ. Sci. Technol.** v. 26, p. 133-38, 1992.

MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; MASSANA, R.; TAYLOR, L.T.; BLAKIS, A.; WU, K.; DELONG, E. F. Seasonal and spatial variability of bacterial and archae assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 7, p. 2585-2595, 1998.

MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA: a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular microbial ecology manual**, v. 3.4.4, p. 1-23. 1996.

MYKLESTAD, S. M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. **Sci Total Environ.**, v. 165, p. 155-164, 1995.

ØVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromitic lake Sælnvanet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PAERL, H. W. Role of bacteria in promoting N₂ fixation by *Anabaena* sp in aquatic habitats. **Microbial Ecol.**, v. 4, p. 215-231, 1978.

PASSOW, U.; ALLDREDGE, A. L.; LOGAN, B. E. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. **Deep-Sea Res. J.**, v. 41, n. 2, p. 335-357, 1994.

PAULSEN, B. S.; VIEIRA, A. A. H.; KLAVENESS, D. Structure of extracellular polysaccharides produced by a soil *Cryptomonas* sp. (Cryptophyceae). **J. Phycol.**, v. 28, p. 61-63, 1992.

PAULSEN, B. S.; VIEIRA, A. A. H. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polysaccharides produced by *Spondylosium panduriforme*. **J. Phycol.**, v. 30, n. 4, p. 638-641, 1994.

PHARMACIA. Ion Exchange Chromatography: principles and methods. 3. ed. ISBN 91 970490-3-4, 1991.

PIANKA, E. R. **Evolutionary Ecology**. Harper Collins College Publishers. 222 p., 1994.

PORTER, K.G.; FEIG, Y. The use of DAPI for identification and enumeration of bacteria and blue green algae. **Limnol. Oceanogr.**, v. 25, p. 943-948, 1980.

PRESS, W.H.; TEUKOLSKY, S.A.; VETTERLING, W.T.; FLANNERY, B. P. *Numerical recipes in C: the art of scientific computing*. New York: Cambridge Univ. Press, 1993, 994 p.

REINHOLD, V. N. Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. **Methods Enzimol.**, v. 25, p. 244-249, 1972.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Freshwater Phytoplankton**. New York: Cambridge University Press. 1984, 384 p.

RIEMANN, B.; BELL R. T.; JØRGENSEN, N. O. G. Incorporation of thymidine, adenine and leucine into natural bacterial assemblages. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 65, p. 87-94, 1990.

RIETZLER, A. R. **Alimentação, ciclo de vida e análise de coexistência de espécies de *Cyclopoidea* na represa de Barra Bonita, São Paulo**. 1995. 385 p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, USP-São Carlos. 1995.

SAMUELSEN, A. B.; PAULSEN, B. S.; WOLD, J. K.; OTSUKA, H.; YAMADA, H.; ESPEVIK, T. Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. **Phytother. Res.** v. 9, p. 211-218, 1995.

SHELDON, R. W. Phytoplankton growth rates in tropical ocean. **Limnol. Oceanogr.**, v. 29, p. 1342-1346, 1984.

SIMEK, K.; PERNTHALER, J.; WEINBAUER, M. G.; HORNAK, K.; DOLAN, J. R.; NEDOMA, J.; MASIN, M.; AMANN, R. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rate associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. **Appl. Environ. Microb.**, v. 67, n. 6, p. 2723-2733, 2001.

SIMS, I. M.; BACIC, A. Extracellular polysaccharides from suspension-cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. **Phytochem.** v. 38, p. 1397-1405, 1995.

SWEeley, C. C.; BENTLEY, R.; MAKITA, M.; WELLS, W. W. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugar and related substances. **J. Am. Chem. Soc.** v. 85, p. 2497-2507, 1963.

TALLING, J. F.; DRIVER, D. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. Proc. In: CONFERENCE ON PRIMARY PRODUCTIVITY MEASUREMENTS, MARINE AND FRESH WATER, 1961, Univ. Hawai. Proceedings...1961, p. 142-146.

THERON, J.; CLOETE, T. E. Molecular Techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 37-57, 2000.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Limnology and eutrophication of Barra Bonita reservoir, S. Paulo state, Southern Brazil. **Arch. Hydrobiol. Beih.**, v. 33, p. 661-76, 1990.

VIEIRA, A. A. H. Purification of phytoplankton cultures with Dakin solution. **Rev. Microbiol.**, v. 14, n. 3, p. 202-203, 1983.

VIEIRA, A. A. H.; MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus*. **J. Plankton Res.** v. 8, p. 985-994, 1986.

VIEIRA, A. A. H.; NASCIMENTO O. R.; SARTORI A. L. Release of extracellular polysaccharide by *Spondylosium panduriformis* (Desmidiaceae). **Rev. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 6-10, 1994.

VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI A. T.; SARTORI A. L. Release of dissolved organic matter in a tropical strain of *Synura petersenii* (Chrysophyceae) grown under high irradiances. **Phycologia**, v. 37, n. 5, p. 357-362, 1998.

WOOD, A. M.; VAN VALLEN, L. M. Paradox Lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. **Marine microbial foods webs**, v. 4, n. 1, p. 103-116, 1990.

WICKS, R. J.; MORAN, M. A.; PITTMAN, L. J.; HODSON, R. E. Carbohydrates signatures of macrophytes and their dissolved degradation products as determined by a sensitive high-performed ion chromatography method. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 57, p. 3135-3143, 1991.

WRIGHT, R. T.; SHAH, N. M. The trophic role of glycollic acid in coastal sea water. I. Heterotrophic metabolism in seawater and bacterial cultures. **Mar. Biol.**, v. 33, p. 175-183, 1975.