

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

**Estudos sobre a ocorrência e caracterização das Partículas de Exopolímeros
Transparentes (TEP) no Reservatório de Barra Bonita e sua colonização
por bactérias**

Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello

SÃO CARLOS - SP

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA



**Estudos sobre a ocorrência e caracterização das Partículas de Exopolímeros
Transparentes (TEP) no Reservatório de Barra Bonita e sua colonização
por bactérias**

Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello

Orientador: Prof. Dr Armando A. H. Vieira

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. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS - SP

2005

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

F253eo

Fatibello, Silvia Helena Saboya Arruda.

Estudo sobre a ocorrência e caracterização das Partículas de Exopolímeros Transparentes (TEP) no reservatório de Barra Bonita e sua colonização por bactérias / Silvia Helena Saboya Arruda Fatibello. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

128 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Ecologia microbiana. 2. TEP. 3. Polissacarídeos. 4. Bactérias. 5. Barra Bonita (SP). I. Título.

CDD: 576.15 (20^a)

ORIENTADOR

Prof. Dr Armando A. H. Vieira

Que flore o Saber,
Que flore num intenso embriagar,
Qual borripar dum sereno êxtase.
Que firme a composta coluna o firmamento;
Que sobre erga o sustentáculo sapiente o excelso.

Que reflore o Saber

- Maurício Arruda Fatibello

02 de dezembro de 2005

Dedico este trabalho:

À minha família: Orlando (companheiro e esposo), Márcio, Maurício e Marcel (nossos filhos) pelo amor e sacrifícios sempre devotados.

Ao meu pai (*in memória*, pois esteve sempre muito presente), à minha mãe e ao meu irmão, Sérgio, por terem me ensinado tudo e pelo apoio de sempre.

Obrigado pelo amor de vocês e por entenderem minha necessidade de buscar um lugar. Principalmente por terem sempre acreditado nos meus sonhos e me ajudado a realizá-los. Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Essa tese de doutorado foi possível graças à ajuda e a participação direta ou indireta de diversas pessoas; assim sendo agradeço a todos e, especialmente:

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pela orientação segura, dedicação e confiança em mim depositada e pelos muitos ensinamentos, principalmente pela paciência e amizade;

Ao meu esposo Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pelo apoio, pelo auxílio no desenvolvimento do procedimento espectrofotométrico para quantificação das TEP, pela leitura do texto original, ensinamentos, incentivo constante e paciência;

À minha amiga Ju (Dra Juliana C. Araújo), pela constante ajuda no trabalho, pelo auxílio com os protocolos da parte molecular e com o DGGE e, principalmente pelas palavras amigas;

À minha amiga Profa Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza pela amizade, ensinamentos e ajuda com o PCR e por ser também uma pessoa cativante;

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi e Dra. Cristina Freire Nordi pela amizade e ajudas constantes;

À Profa. Dra Maria Inês Salgueiro Lima pela utilização do microscópio, pelos incentivos, paciência e amizade;

Ao Prof. Dr. Marcos Arduin pelos ensinamentos de microscopia e utilização do microscópio;

Aos Profs. Drs. Takako Matsumura Tundisi e. José Galizia Tundisi por terem aberto o IIE (Instituto Internacional de Ecologia), pelo uso do microscópio de fluorescência, pelas conversas e ensinamentos constantes e também pela amizade;

Ao Dr Donato Seiji Abe pelo auxílio com a microscopia de fluorescência;

A todos do IIE pelas agradáveis horas do cafezinho;

Ao Prof. Dr. René Peter Schneider por ter possibilitado a realização de parte deste trabalho. Pela amizade e discussões.

Ao Prof. Dr. Glaucius Oliva por ter aberto o seu laboratório para a realização do PCR;

Ao Prof. Dr. Mário Basílio de Matos pelos ensinamentos com a parte estatística;

Aos Profs. Drs. Otavio Henrique Thiemann, Flavio Henrique da Silva, Mirna Helena Regali Seleglim, Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo, Irineu Bianchini Júnior e Odete Rocha, pelas discussões profícuas, esclarecimentos e valiosas sugestões;

Aos Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria e Dr. Oldair Donizete Leite pelo fornecimento e ajuda com o programa de pesquisa e organização das referências bibliográficas;

À Meire Rodrigues pela ajuda com o inglês;

Às doutorandas Maria José e Vanessa pelo fornecimento de alguns resultados experimentais empregados nesta tese;

Aos técnicos Luiz Aparecido Joaquim e Antonio Luiz Sartori pela ajuda nos trabalhos de campo e laboratoriais;

Ao pessoal do Laboratório de Ficologia: Danilo, Maria, Mariana, Pedro, Roseli, Sandrinha, Sebastião, Thais, Vanessa e Zezé pelos trabalhos e momentos de descontração;

À CAPES pela bolsa concedida;

Aos amigos e colegas de dentro e de fora do nosso ambiente de trabalho que sempre fizeram o dia-a-dia mais ameno e agradável;

À minha família pela tolerância, apoio ajuda constante e principalmente pelo carinho constante. Obrigado por entenderem.

Sobretudo a Deus por guiar a minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE	1
1.1 Significado das TEP (Transparent exopolymer particles)	3
1.2 Formação das TEP	4
1.3 Agregados	7
1.4 Importância das TEP no ciclo biogeoquímico da matéria orgânica	8
1.5 TEP e crescimento bacteriano	11
2 OBJETIVOS	17
3 HIPÓTESE	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Local de Estudo	19
4.2 Coleta das amostras de água	20

4.3 Filtração das amostras de água	20
4.3.1 Filtração tangencial das amostras de água	21
4.4 Preparo e acondicionamento das amostras	22
4.5 Quantificação espectrofotométrica das TEP (método comparativo de Passow & Alldredge, 1995)	23
4.6 Desenvolvimento de nova metodologia para a determinação das TEP	24
4.7 Enumeração das TEP por microscopia de campo claro	26
4.7.1 Distribuição das TEP por tamanho	27
4.7.2 Determinação da colonização de bactérias nas TEP empregando microscopia de fluorescência	28
4.7.2.1 Preparação dos corantes	29
4.7.2.2 Preparação das lâminas	29
4.8 Técnicas moleculares para a caracterização de bactérias aderidas as TEP	31
4.8.1 Procedimentos para a extração de DNA	31
4.8.2 Amplificação de DNA por PCR	33
4.8.2.1 Programa usado na amplificação por PCR	35
4.8.3 Método do DGGE	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Procedimento espectrofotométrico para determinar a concentração das TEP	42

5.2	Quantificação e caracterização das TEP por microscopia de campo claro	46
5.3	Relação das TEP com o fitoplâncton presente no reservatório de Barra Bonita	52
5.4	Distribuição sazonal das TEP	57
5.5	Distribuição e abundância das TEP na coluna d'água	68
5.6	Distribuição das TEP por tamanho na coluna d'água	78
5.7	Colonização das TEP por bactérias	91
5.8	Adequação das técnicas de biologia molecular ao estudo de bactérias aderidas às TEP	107
5.8.1	Extração de DNA	107
5.8.2	Amplificação do DNA da comunidade microbiana agregada pela técnica de PCR e DGGE	108
5.8.3	Dados preliminares sobre a diversidade de bactérias aderidas às TEP empregando a técnica do DGGE	111
6	CONCLUSÕES	116
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
ANEXO 1		128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema das etapas experimentais realizadas no presente estudo.	18
Figura 2 -	Mapa do reservatório de Barra Bonita, SP., obtido por GPS, em fevereiro de 2004. Fonte: Pereira Cabral, 2003.	19
Figura 3 -	Par-iônico formado entre as TEP e o Alcian blue.	41
Figura 4 -	Efeito da concentração da solução de Alcian blue (♦: $1,5 \times 10^{-3}$; □: $3,0 \times 10^{-3}$; +: $6,0 \times 10^{-3}$ e ●: $9,0 \times 10^{-3}$ % m/v) sobre a curva analítica para soluções de goma de xantana variando de 0,50 a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH igual a 4,0 e a 25°C .	43
Figura 5 -	Fotomicrografias das TEP, tingidas com o corante Alcian blue e oriundas do reservatório de Barra Bonita, SP. Obtidas um mesmo campo (a) sem o filtro laranja e (b) com o filtro laranja, microscopia de campo claro (aumento 400 x).	47
Figura 6 -	Fotomicrografias das TEP tingidas com o corante Alcian blue, provenientes do reservatório de Barra Bonita, SP., coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004, nas profundidades de 1 m, 3 m, 5 m, 10 m e fundo, obtidas por microscopia de campo claro utilizando o filtro laranja e com aumento de 400X.	49-51
Figura 7 -	Fotomicrografia de agregados (a) uma matriz gelatinosa com adesão de algumas células de <i>Cyclotella</i> sp, (b) e (c) matriz gelatinosa que é tingida com Alcian blue formando um macroagregado, com muitas células de <i>Aulacoseira granulata</i> (aumento de 400X), oriundas do reservatório de Barra Bonita, SP.	52
Figura 8 -	Fotomicrografias das microalgas, registradas na microscopia de luz clara (aumento 400 vezes), (a) <i>Microcystis</i> sp, (b) <i>Anabaena</i> sp, (c) <i>Aulacoseira</i> sp e (d) <i>Cyclotella</i> sp. Amostras provenientes do reservatório de Barra Bonita, SP.	54
Figura 9 -	Variação sazonal das espécies fitoplanctônicas dominantes, na água do reservatório de Barra Bonita no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Fonte: doutoranda Maria José Dellamano de Oliveira.	56
Figura 10 -	Concentrações das TEP obtidas pelo emprego das duas diferentes metodologias (A) espectrofotometria e (B) microscopia de campo claro.	58
Figura 11 -	(a) Reprodução da Figura 9; (b) variação das concentrações médias das TEP _{espectr} e (c) análise estatística dos resultados encontrados das concentrações das TEP _{espectr} no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.	64

- Figura 12 - (a) Variação das concentrações médias das TEP_{microsc} e (b) análise estatística dos resultados encontrados das concentrações das TEP_{microsc} no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. 65
- Figura 13 - Comparação entre os métodos: microscopia de campo claro (eixo Y) e espectrofotométrico (eixo X) utilizados na determinação das concentrações das TEP para amostras coletadas no reservatório de Barra Bonita, SP, no período de março de 2003 a janeiro de 2004. 66
- Figura 14 - Variação na coluna d'água das TEP; concentração das TEP; abundância das partículas; volume das partículas, temperatura; e pH. 68-72
- Figura 15 - Variação sazonal da concentração volumétrica das TEP, do reservatório de Barra Bonita no período de setembro de 2003 a janeiro de 2004. 75
- Figura 16 - Variação sazonal de carboidratos dissolvidos na água do reservatório de Barra Bonita no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. 76
- Figura 17 - Concentrações das TEP em função da distribuição por tamanho das partículas (em diâmetro equivalente das TEP (DEE)), para as amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP. 80-88
- Figura 18 - Fotomicrografias de um mesmo campo (a) microscopia de luz clara e (b) microscopia de fluorescência, aumento de 1000X. Amostra coletada no reservatório de Barra Bonita, SP. 94
- Figura 19 - Fotomicrografias obtidas de um mesmo campo de amostra de água coletada na profundidade de 1m em setembro de 2002, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência. 94
- Figura 20 - Fotomicrografias obtidas de amostra de água coletada na profundidade de 3 m em setembro de 2002, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de fluorescência mostrando TEP com bacilos e (b) microscopia de campo claro mostrando TEP colonizada por bactérias na região em destaque. 94
- Figura 21 - Fotomicrografia de um mesmo campo, obtidas por microscopia de fluorescência (a) sem o filtro verde e (b) com o filtro verde, amostra de outubro de 2002 a 5 m. 96
- Figura 22 - Fotomicrografia feitas de um mesmo campo com amostra coletada no reservatório de Barra Bonita, SP., em outubro de 2002, a 3 m, obtidas por microscopia de fluorescência (a) sem o filtro verde e (b) com o filtro verde. 96
- Figura 23 - Fotomicrografia das TEP aderidas a microalgas planctônicas, por microscopia de fluorescência. Amostras coletadas no reservatório de Barra Bonita, SP. 96

- Figura 24 - Fotomicrografias das TEP, por microscopia de fluorescência, amostras coletadas em novembro de 2002 a 1 m, , no reservatório de Barra Bonita, SP. 100
- Figura 25 - Fotomicrografias das TEP, (a) microscopia de fluorescência e (b) microscopia de campo claro uma TEP com aspecto fibrilar que não possui bactérias, amostra coletada em dezembro de 2002 a 1 m, no reservatório de Barra Bonita, SP. 100
- Figura 26- Fotomicrografias das TEP, por microscopia de fluorescência, de amostra de água coletada em março de 2003 a 10 m, no reservatório de Barra Bonita, SP 100
- Figura 27- Fotomicrografias obtidas de um mesmo campo de amostra de água coletada na profundidade de 5 m em abril de 2003, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência. 101
- Figura 28 - Fotomicrografias de microscopia de fluorescência obtidas de amostras de água coletadas a 5m (a) e fundo (b) em maio de 2003, proveniente do reservatório de Barra Bonita, SP. 101
- Figura 29 - Fotomicrografias de um mesmo campo, microscopia de campo claro (a) e microscopia de fluorescência (b). Amostra coletada em junho de 2003 (3 m), no reservatório de Barra Bonita, SP. 101
- Figura 30 - Fotomicrografias de um mesmo campo, (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência, amostra coletada a 10 m em outubro de 2003, no reservatório de Barra Bonita, SP. 101
- Figura 31- Número médio de bactérias aderidas a cada TEP em amostras do reservatório de Barra Bonita, SP. (valor médio) no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. 103
- Figura 32- Variação sazonal do número médio de bactérias aderidas por volume das TEP em mL, em amostras do reservatório de Barra Bonita, SP., no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. 104
- Figura 33 - Variação sazonal no número de bactérias de vida livre e o número de bactérias aderidas as TEP na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. 106

- Figura 34 - Imagem do gel de agarose 2% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio Bactéria
Linha A: coluna **L** ladder; coluna **01**: set. 02; coluna **02**: out. 02; coluna **03**: nov. 02; coluna **04**: dez. 02; coluna **05**: jan. 03; coluna **06**: fev. 03; coluna **07**: mar. 03; coluna **08**: abr. 03; coluna **09**: mai. 03; coluna **10**: jun. 03; coluna **11**: jul. 03; coluna **12**: ago. 03; coluna **13**: set. 03; coluna **14**: out. 03. **Linha B:** coluna **01**: nov. 03; coluna **02**: dez. 03; coluna **03**: jan. 04; coluna **04**: 1 m mar. 03; coluna **05**: 3 m mar. 03; coluna **06**: 5 m mar. 03; coluna **07**: 10 m mar. 03; coluna **08**: fundo mar. 03; coluna **09**: controle positivo 1 (10 µL de *E. coli* BL21); coluna **10**: controle positivo 2 (30 µL de *E. coli* BL21); coluna **11**: controle negativo e coluna **L**: ladder. 110
- Figura 35 - Gel de poliacrilamida (45-60 %), mostrando a dinâmica de diversidade bacteriana aderidas às TEP, resultado da técnica do DGGE. (a) gel de poliacrilamida e (b) gel com traços manuais. Coluna 1 – out 03; coluna 2 – set 03; coluna 3 – jul 03; coluna 4 – jun 03; coluna 5 – mai 03; coluna 6 – abr 03; coluna 7 – mar 03; coluna 8 – jan 03 e coluna 9 – dez 02. 114
- Figura 36 - Gel de poliacrilamida (45-65 %), mostrando a dinâmica de diversidade bacteriana aderidas às TEP, resultado da técnica do DGGE. (a) gel de poliacrilamida e (b) gel com traços manuais. Coluna 1 – jan 04, coluna 2 – dez 03, coluna 3 – out 03, coluna 4 – set 03, coluna 5 – jul 03, coluna 6 – jun 03, coluna 7 – mai 03, coluna 8 – abr 03, coluna 9 – mar 02, coluna 10 – jan 03 e coluna 11 – dez 02. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração final dos reagentes para execução do PCR.	34
Tabela 2 -	Concentração final dos reagentes para a preparação das soluções estoque desnaturante 0% e 100%.	37
Tabela 3 -	Volumes das soluções desnaturantes (0% e 100%) necessários para a confecção do gradiente de desnaturação no gel de DGGE.	38
Tabela 4 -	Equações das curvas analíticas obtidas para solução de Alcian blue $3,0 \times 10^{-3}$ % m/v em diversos valores de pH em função da concentração de goma de xantana a 25 °C.	42
Tabela 5 -	Eficiência de recuperações (em triplicata) de goma de xantana em duas amostras de água natural.	45
Tabela 6 -	Determinação dos teores das TEP em águas naturais do reservatório de Barra Bonita, empregando-se o método espectrofotométrico proposto e o de referência (PASSOW & ALLDREDGE, 1995).	46
Tabela 7 -	Gêneros de algas encontrados aderidos às TEP na água do reservatório de Barra Bonita, SP e observados durante a microscopia de campo claro.	55
Tabela 8 -	Abundância das TEP (número de partículas mL ⁻¹) em águas naturais.	62
Tabela 9 -	Valores de β encontrados no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP.	89
Tabela 10.	Valores de log k encontrados no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP.	91
Tabela 11.	Variação das populações de bactérias de vida livre e de bactérias aderidas. Amostras do reservatório de Barra Bonita, SP., no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.	105

RESUMO

TEP (Transparent Exopolymer Particles) têm grande importância nos processos microbiológicos, no ciclo do carbono e na dinâmica da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos. Essas partículas são compostas por uma matriz gelatinosa formada principalmente por polissacarídeos ácidos, dissolvidos e/ou coloidais oriundos da excreção de microrganismos fitoplanctônicos. As TEP são abundantes nos oceanos e em água doce e têm dimensão que varia de algumas micras até milímetros. O presente trabalho teve por objetivo quantificar e estudar a distribuição por tamanho das TEP presentes na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita, no rio Tietê, SP, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. Ademais, foram quantificadas as bactérias aderidas às TEP, bem como foram estabelecidos protocolos iniciais para análise de biologia molecular (extração de DNA, PCR e DGGE) das bactérias aderidas às TEP. Durante este estudo, a concentração das TEP ($> 1 \mu\text{m}$), determinadas por um método espectrofotométrico desenvolvido neste estudo, variou de 0,02 a 3,10 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e por microscopia de luz clara de $5,4 \times 10^3$ a $1,6 \times 10^5$ partículas mL^{-1} . No entanto, durante o período em estudo, as concentrações médias não sofreram variações significativas devido à natureza instável de um sistema dinâmico e com constantes mudanças do reservatório de Barra Bonita. A abundância das TEP por tamanho decresceu com o aumento do diâmetro das partículas como previsto pela equação do tipo $N = kd_p^{-\beta}$ empregada em estudos dessa natureza. Nesta equação o k está relacionado com a concentração das partículas e o β com a distribuição das partículas por classe de tamanho. Neste trabalho o valor de k variou de $2,40 \times 10^4$ a $3,86 \times 10^6$ partículas mL^{-1} e o valor de β de 0,2 a 2,5, indicando uma predominância de partículas de menor tamanho no reservatório. Em relação às bactérias aderidas às TEP as mesmas foram encontradas na superfície e no interior das partículas em concentrações médias variando de 9 a 45 bactérias $(\text{TEP})^{-1}$, sendo que nem todas as TEP estavam colonizadas por bactérias. O número de bactérias aderidas por TEP não pode ser relacionada com a superfície ou com o volume das partículas. Considerando o total de bactérias enumeradas por microscopia por fluorescência, a percentagem de bactérias aderidas às TEP variou de 6,9 a 80,3%. A adequação dos protocolos para a extração e amplificação do DNA r 16S das bactérias aderidas às TEP das amostras de água foi conseguida com sucesso e utilizando as técnicas de PCR/DGGE nessas amostras, foi evidenciada uma ampla diversidade na comunidade bacteriana aderidas às TEP.

ABSTRACT

TEP (Transparent Exopolymer Particles) have a great importance in the microbiological processes, in the carbon cycle and in food chain dynamics of the aquatic ecosystems. These particles are composed by a gel matrix formed mainly by acid polysaccharides dissolved and/or colloidal those are released by phytoplankton microorganisms. TEP are abundant in the oceans and in fresh waters and they have a dimension that varies from some micra to millimeters. This current work has the main objective of quantify and study the distribution per range of the TEP present in Barra Bonita reservoir water column in the Tietê River in the period between September of 2002 and January of 2004. Further the bacteria attached to TEP were quantified as well as preliminary protocols were established to the biological molecular analysis (DNA extraction, PCR e DGGE) of the bacteria attached to the TEP. During this study, the TEP concentration ($> 1 \mu\text{m}$), determined by a spectrophotometric method developed in this thesis, varied from 0.02 to 3.10 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ and by light microscopy from 5.4×10^3 to 1.6×10^5 particles mL^{-1} . Although, during the study period, the average concentrations did not suffer significant variations because of the unstable and dynamic system with constant changes of the Barra Bonita reservoir nature. The abundance of TEP size decreased with the increase of the particles diameter show by the equation $N = kd_p^{-\beta}$ used in studies of this nature. In this equation k is related to particles concentration and β is to particles distribution per class size. In this work the k value varied from 2.40×10^4 to 3.86×10^6 particles mL^{-1} and β value from 0.2 to 2.5, indicating a predominance of particles of smaller size in the reservoir. Regarding bacteria attached to TEP, they were found on the surface and in the interior of the particles in average concentrations varying from 9 to 45 bacteria $(\text{TEP})^{-1}$, showing that not all TEP were colonized by bacteria. The number of bacteria attached to TEP can not be related to the particle surface or volume. Considering the total of bacteria numbered by fluorescence microscopy, the percentage of bacteria attached to TEP varied from 6.9 to 80.3%. The adequation of protocols to the extraction and amplification of the DNAr 16S of the bacteria attached to TEP from the water samples were performed with success and the use of PCR/DGGE techniques in these samples showed high diversity of bacteria community attached to TEP.

1 INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

O carbono é reciclado em todos ambientes (atmosfera, solo, oceanos, ambientes aquáticos, sedimentos e rochas) sendo o oceano o seu maior reservatório (KEPKAY, 2000), bem como as rochas e sedimentos, porém, o tempo de reposição de carbono nesses ambientes é tão longo que é desprezível na escala de tempo dos seres humanos. Uma análise de diferentes processos sugere que uma das vias mais importantes do retorno de carbono para a atmosfera é via decomposição de matéria orgânica por microrganismos e o principal e mais rápido caminho para a transferência do carbono é por meio da fotossíntese, que retira da atmosfera o CO₂, sendo que o seu retorno à atmosfera se dá pela respiração de organismos. Através da fotossíntese, produtores primários são capazes de fixar 10¹¹ toneladas de CO₂ por ano para produzir matéria orgânica (ODUM, 1988). Em corpos de água-doce naturais profundos e eutrofizados com constantes florescimentos algais, a principal fonte de carbono orgânico é aquela oriunda da fotossíntese de microalgas (VIEIRA, 1999). Segundo VIEIRA *et al.* (1994), o carbono excretado pelo fitoplâncton na forma de matéria orgânica dissolvida (DOM) corresponde em média a 5 % do carbono fotoassimilado, e o carbono na forma de carboidrato pode representar até 90 % da matéria orgânica dissolvida excretada por uma população em bom estado fisiológico.

A DOM constitui o mais amplo “pool” de carbono orgânico nos oceanos e o conhecimento do mecanismo pelo qual essas substâncias são convertidas em matéria orgânica particulada (POM) é uma ferramenta para o entendimento dos ciclos biogeoquímicos aquáticos tanto marinhos (PASSOW, 2002a) quanto em água doce.

A matéria orgânica particulada tem grande importância nos processos microbiológicos, no ciclo do carbono e na dinâmica da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos (ALLDREDGE & SILVER, 1988; GROSSART & SIMON, 1993; GROSSART *et*

al., 1997). É constituída por organismos, detritos, matéria fecal, exúvia, exoesqueleto ou partes mais duras de organismos planctônicos visíveis ao microscópio (ALLDREDGE *et al.*, 1993). Além dos organismos e detritos orgânicos a matéria orgânica particulada dos ambientes aquáticos ocorre também como TEP (do inglês: transparent exopolymer particles) e agregados gelatinosos, classes de partículas distintas relacionadas com a atividade do fitoplâncton e também com a participação de outros organismos.

TEP são definidas como partículas transparentes formadas por polissacarídeos ácidos e que podem ser observadas ao microscópio quando tingidas com o corante Alcian Blue (ALLDREDGE *et al.*, 1993; PASSOW *et al.*, 1994; PASSOW *et al.*, 2001; PASSOW, 2002a). Essas partículas são abundantes, ubíquas e transparentes, e são formadas principalmente por polissacarídeos excretados por microrganismos (PASSOW, 2000).

Muitas espécies do fitoplâncton e também as bactérias podem excretar polissacarídeos dissolvidos, importantes para a formação das TEP (DECHO, 1990). As TEP são descritas ainda como a matriz precursora de agregados gelatinosos, descritas como “marine snow” em ambientes marinhos e “lake snow” em ambientes lacustres ou de água doce (PASSOW *et al.*, 2001). Os agregados gelatinosos são partículas de tamanho entre 300 µm a muitos centímetros, até 4 m, encontrado na Califórnia (STEINBERG *et al.*, 1997) e no Mar Adriático do norte (HERNDL, 1992). A abundância dos agregados gelatinosos varia de <1 a ~ 100 L⁻¹ e estes podem exibir uma estrutura muito complexa e serem densamente colonizados por vários microrganismos (*e.g.* bactérias, microalgas, protozoários) cuja função é formar e/ou decompor essa estruturas. Os organismos eucariontes heterotróficos se alimentam desses particulados, assim como as bactérias heterotróficas que os transformam em matéria orgânica dissolvida (LIND & DAVALOSLIND, 1991; GROSSART & SIMON, 1993; SIMON *et al.*, 2002).

As partículas transparentes de exopolímeros e os agregados gelatinosos podem contribuir significativamente com o fluxo vertical da matéria orgânica particulada na coluna d'água, dependendo da velocidade com que percorrem essa coluna, fornecendo assim energia

para organismos heterotróficos que vivem no sedimento e/ou ambientes aquáticos sem luz (GROSSART & SIMON, 1993; PASSOW *et al.*, 1994; LOGAN *et al.*, 1995; GROSSART *et al.*, 1997). Em alguns estudos (GROSSART & SIMON, 1993; GROSSART *et al.*, 1997), tem-se confirmado que os agregados lacustres têm um papel similar àquele desempenhado por agregados marinhos.

1.1 Significado das TEP (Transparent exopolymer particles)

Segundo ALLDREDGE *et al.* (1993), Gorden em 1970 foi quem pioneiramente notificou a existência de partículas de carboidratos transparentes. Segundo este autor, essas partículas foram observadas com a utilização do método rotineiro de Schiff com ácido periódico, embora não se tenha conseguido quantificá-las. Posteriormente, EMERY *et al.* (1984) descreveram filmes transparentes associados a diatomáceas ou a fragmentos utilizando microscopia eletrônica. Empregando essa técnica, foi possível também obter as áreas dessas partículas. ALLDREDGE *et al.* (1993) e PASSOW *et al.* (1994) consideraram que essas partículas transparentes, descritas anteriormente por Gorden e Emery, poderiam ser as mesmas partículas chamadas de TEP e foram os pioneiros a identificá-las nas águas da Califórnia. Desde então, muitos pesquisadores (PASSOW *et al.*, 1994; LOGAN *et al.*, 1995; SCHUSTER & HERNDL, 1995; GROSSART *et al.*, 1997; WORM & SØNDERGAARD, 1998; BERMAN & VINER-MOZZINI, 2001; BRACHVOGEL *et al.*, 2001; MARI *et al.*, 2001; SIMON *et al.*, 2002a) têm descrito as TEP como uma classe ubíqua de micro-partículas presentes em outros ambientes aquáticos, inclusive de água doce.

Segundo ALLDREDGE *et al.* (1993) e LOGAN *et al.* (1994) a visualização das TEP foi possível após o tingimento das mesmas com um corante apropriado (Alcian Blue). O emprego dessa técnica permitiu então a visualização e a determinação da concentração (abundância) dessas partículas no ambiente.

As TEP podem ser vistas nos filtros com o emprego de um microscópio, e se parecem com folhas de duas dimensões ou como partículas soltas. Em três dimensões, as TEP são como pacotes de pequenas microfibras e colóides assemelhando-se a um “gel” (ALLDREDGE *et al.*, 1993). Embora as formas das TEP nem sempre sejam bem definidas, muitas dessas partículas assemelham-se a esferas, gotas, nuvens, filamentos, fibras, lâminas e algumas vezes podem conter partículas inorgânicas, células e/ou restos de células (PASSOW *et al.*, 1994; PASSOW & ALLDREDGE, 1994).

TEP é um grupo de partículas quimicamente diverso e heterogêneo. Essas partículas formadas por exopolímeros não têm a sua composição química definida, porque tal composição química depende das espécies que excretam os exopolímeros e das condições ambientais. As condições ambientais também influem nas características físicas das TEP (*e.g.* estabilidade e volume) (MOPPER *et al.*, 1995). Outras características dessas partículas é que elas se assemelham a géis, são flexíveis (ALLDREDGE *et al.*, 1993) muito reativas e pegajosas (ENGEL, 2000).

As TEP têm sido encontradas com comprimento variando <0,45 a 100 μm e a sua abundância varia entre 10^2 a 10^7 L^{-1} , sendo que a abundância dessas partículas pode estar correlacionada com a biomassa do fitoplâncton. Essas partículas são mais abundantes durante as fases: exponencial e senescente do fitoplâncton, período de maior exudação. Tem sido observado que na natureza a quantidade das TEP é alta durante o período de florescimento de diatomáceas (SIMON, *et al.*, 2002; PASSOW, 2002a).

1.2 Formação das TEP

A formação das TEP depende da ampla variedade de organismos que liberam substâncias orgânicas com características de muco ou “gelatina”. O precursor das TEP parece ser secretado pelo fitoplâncton durante a fase de crescimento exponencial e/ou da fase

senescente de crescimento (PASSOW, 2002a). Apesar do fitoplâncton liberar uma ampla quantidade de substâncias orgânicas (DECHO, 1990), cuja composição química pode variar de acordo com as espécies e estágio fisiológico, os monômeros precursores das TEP parecem ser mais homogêneos e permanecem constantes, mesmo que haja mudanças na comunidade de algas.

PASSOW (2002b) estudou e concluiu que a taxa de formação das TEP em algas cultivadas em laboratório varia amplamente entre as espécies e a variabilidade interespecies de diatomáceas foi tão ampla quanto entre as espécies pertencentes a diferentes classes ou divisões. A concentração das TEP durante a fase de crescimento em culturas de algas em experimento com “mesocosmos” ou em “bloom” de fitoplâncton natural variou significativamente em função da clorofila a, confirmando a importância do fitoplâncton na formação das TEP.

A produção das TEP em corpos d'água envolve dois processos: (a) biótico e (b) abiótico. A formação biótica das TEP depende da existência de envoltório mucilaginoso nas células ou colônias fitoplanctônicas, que são constituídos por polissacarídeos transparentes e gelatinosos. As TEP são formadas pela liberação de parte ou de todo esse envoltório pela morte celular ou qualquer outro processo que resulte na liberação do envoltório mucilaginoso (HONG et al. 1997).

A formação abiótica das TEP depende de algumas variáveis ambientais como: turbulência, densidade de íons e concentração de colóides inorgânicos, bem como do tipo e concentração dos precursores presentes. Esses precursores, os polissacarídeos extracelulares, são liberados por organismos aquáticos presentes no ambiente, assim a sua abundância e propriedades não dependem apenas da composição da comunidade, mas também do estado fisiológico de cada indivíduo e das complexas funções da condição de crescimento (PASSOW, 2002a). Esses processos abióticos compreendem: (a) adsorção na superfície, (b) colapso de bolhas, (c) movimento de cisalhamento da água e (d) sedimentação.

Nos processos envolvendo adsorção na superfície das TEP (a), há um aumento do material particulado a partir do material coloidal presente na água por varredura (PASSOW & WASSMANN, 1994) que depende da dimensão fractal, tamanho, concentração, velocidade de “varrer” a coluna d’água enquanto afundam, ou seja, da velocidade em agregar partículas e concentração dos colóides. Esse processo altera o tamanho das partículas, tornando-as maiores, embora não aumente a sua concentração (LI & LOGAN, 1997).

Os processos abióticos em que as TEP novas são formadas por coagulação na superfície das bolhas (b), envolvem os precursores com o diâmetro de 0,45 a 1,0 μm . Nesse processo, as TEP são formadas a partir de borbulhamento do material filtrado em filtro de porosidade \leq a 0,45 μm , esse material possui uma composição química mais rica do que os formado a partir do borbulhamento de material pré-filtrado em filtro de porosidade $>$ 1,0 μm (MOPPER *et al.*, 1995; ZHOU *et al.*, 1998).

As TEP podem ser formadas também abióticamente por cisalhamento num movimento horizontal das camadas de água (c) (PASSOW, 2000) ou por turbulência (ENGEL & PASSOW, 2001). Nesse processo, as partículas próximas podem colidir formando partículas maiores quando a direção dos fluxos tem sentido contrário. Esse mecanismo domina as interfaces de correntes descontínuadas na coluna d’água, ou nas camadas mais fundas ou nas marés em estuários. Ainda em regiões pelágicas o mecanismo de cisalhamento é um dos principais fatores de agregação das partículas (SIMON, *et al.*, 2002a). Esse processo de cisalhamento é muito eficiente para a formação das TEP e talvez de outras partículas orgânicas (PASSOW, 2000) utilizando precursores menores que 0,2 μm .

No processo de sedimentação (d) das TEP a propriedade físico-química destas partículas de serem géis com alta capacidade de aderirem umas às outras torna mais lento o fluxo vertical destas partículas (ENGEL, 2000; SIMON *et al.*, 2002a). Essa capacidade de duas partículas permanecerem juntas após colidirem, leva a formação de partículas maiores

bem como de agregados gelatinosos, favorecendo a sedimentação dessas partículas (LOGAN *et al.*, 1995).

1.3 Agregados

Os grandes agregados encontrados na água no mar são conhecidos como “marine snow” ou em água doce como “lake snow”. Esses agregados macroscópicos são muito frágeis e facilmente se quebram por isso há certa dificuldade em coletá-los, possuem diâmetros variando de 1 mm até >1 m e a sua formação depende da concentração das partículas, da densidade, da distribuição por tamanho e também do formato das mesmas (SIMON, *et al.*, 2002a).

Duas são as hipóteses propostas para avaliar a formação de intensa precipitação e sedimentação de agregados na natureza durante um “bloom” do fitoplâncton. Segundo o modelo de JACKSON (1990), a primeira considera que os grandes agregados são formados por colisões de células do fitoplâncton durante um “bloom”. A outra hipótese da coagulação das TEP compara três sistemas distintos (águas doces, zonas costeiras e de mar aberto). Nesse estudo foi comparada a abundância das TEP em cada sistema com a concentração do fitoplâncton, fluxo do sedimento e abundância de agregados grandes.

Em trabalho realizado no Lago Constance, Alemanha, por LOGAN *et al.* (1995), foi determinada uma concentração elevada das TEP ($8,6 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$). Esses mesmos autores constataram que o alto fluxo de matéria orgânica particulada em direção ao fundo do lago coincidia com o desaparecimento da abundância dos agregados.

1.4 Importância das TEP no ciclo biogeoquímico da matéria orgânica

As TEP têm um importante papel na sedimentação e no ciclo biogeoquímico da matéria orgânica. Como essas partículas são pegajosas, seu tamanho e velocidade de sedimentação podem ser alterado. De acordo com a teoria da coagulação, a formação de agregados e/ou microagregados depende da possibilidade de colisão dessas partículas e da interação entre as mesmas (ENGEL, 2000; PASSOW *et al.*, 2001; PASSOW, 2002a). A sedimentação direta das TEP foi representada por um mecanismo seletivo de seqüestro de carbono em águas profundas, uma vez que a razão de carbono e nitrogênio (C:N) das TEP ficou posicionada acima da razão de Redfield. A razão molar de C:N de Redfield de 6,6 é um valor estabelecido para os particulados orgânicos produzidos na superfície da água. Assim, quando há um fluxo de material orgânico da superfície para o interior de um corpo d'água, há um aumento da razão molar entre carbono e nitrogênio (PASSOW, 2002a). A razão molar de C:N de Redfield das TEP é muito maior quando comparada a essa mesma razão em outras partículas (*e. g.* detritos) ou plâncton.

MARI *et al.* (2001) trabalhando em mar aberto onde monitoravam a distribuição das TEP, no noroeste do Mar Mediterrâneo, determinaram a razão molar de C:N de Redfield. Essa razão foi medida nas TEP produzidas no laboratório, por borbulhamento de material orgânico dissolvido coletado no campo e o valor determinado foi de aproximadamente 20, taxa que excede em muito o valor determinado pelo modelo de Redfield (6,6). Ainda nesse trabalho, estimou-se que a concentração das TEP aumenta no verão e que a produção das TEP pode ser o principal caminho do carbono em ambiente oligotrófico quando a demanda está acima da quantidade de carbono disponível e o nitrato está escasso. Assim, as TEP podem ser um importante reservatório no ciclo do carbono em oceano.

ENGEL *et al.* (2002a), acompanharam o fluxo dos principais elementos biogeoquímicos (C, N, P, Si) e das TEP em um “mesocosmo” (1 m³), durante um “bloom”

natural de diatomáceas marinhas nas águas do Canal de Santa Bárbara, USA. Esses pesquisadores encontraram uma razão molar de C:N de Redfield nas TEP igual a 26 e concluíram que a maior parte de carbono utilizada para a formação de “marine snow” foi proveniente das TEP.

ENGEL *et al.* (2002b), também realizaram um estudo em junho de 1999, no Mar Báltico, um ambiente permanentemente estratificado e com predominância de cianobactérias e diatomáceas. Nesse experimento foi feita uma comparação da taxa de Redfield com a concentração de carbono orgânico particulado, nitrogênio e fósforo [POC]:[PON]:[POP] e concluíram que houve um aumento do carbono principalmente nos agregados. Estes pesquisadores concluíram também que as TEP contribuem substancialmente para um aumento da concentração de POC.

Alguns dos elementos biogeoquímicos têm influenciado a concentração e produção das TEP. CORZO, *et al.* (2000) estudaram o efeito da concentração de nitrato em culturas de diatomácea marinha *Chaetoceros calcitrans*. Neste experimento, *Chaetoceros calcitrans* cresceu em culturas contendo concentrações de nitrato iniciais de 25, 75, 150, 250 e 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e os autores concluíram que o ânion nitrato afeta diretamente a produção das TEP e, que durante a fase exponencial de crescimento da cultura, a produção das TEP foi maior quando o nitrogênio era limitado no meio.

MARI *et al.* (2005) monitoraram as concentrações das TEP em três mesocosmo, durante “blooms” de *Phaeocystis globosa*, mostraram que as concentrações de TEP permaneceram relativamente baixas até o esgotamento de nitrato ou fósforo, após o qual foi registrado um aumento abrupto da concentração das TEP.

SCHNEIDER *et al.* (2004) investigaram o fluxo de carbono no oceano e a troca de CO_2 entre a atmosfera e a água do mar e empregaram um modelo global para o ciclo do carbono no oceano (AAMOC). Nesse modelo foi mostrado experimentalmente que as TEP têm contribuído com um aumento relativo de 5% na exportação de partículas no fluxo global

do CO₂, desde a época pré-industrial até os dias atuais. Esses autores concluíram que o efeito da emissão antropogênica de CO₂ pode causar efeitos diretos e indiretos na mudança das taxas dos elementos da matéria orgânica particulada (POM). As conseqüências diretas ocorrem na superfície das águas, gerando um aumento da concentração de CO₂ atmosférico e um decréscimo do pH, levando a uma acidificação do meio, como conseqüência dessas mudanças pode ocorrer uma alteração da composição das espécies presentes nos ambientes e um aumento da produção das TEP que podem acarretar em uma mudança nas taxas dos elementos na matéria orgânica particulada. O efeito indireto das emissões de CO₂ pelo homem, que tem como conseqüência o aquecimento global, pode resultar em um aumento da estratificação dos oceanos. Isso, por sua vez poderia reduzir os movimentos da coluna d'água do fundo para a superfície, promovendo assim uma limitação dos nutrientes. Esse cenário poderia ocasionar um aumento da produção das TEP acarretando uma mudança nas taxas dos elementos na matéria orgânica particulada (ENGEL, 2002a; ENGEL *et al.* 2004).

Há poucos trabalhos descritos na literatura relacionando as TEP com os elementos metálicos. A dinâmica e/ou transporte das TEP em águas de oceano foram estudadas por meio de enriquecimento das TEP com ferro (II), pela adição inicial de sulfato ferroso (FeSO₄) (RAMAIAH *et al.* 2005) e também com tório radioativo (²³⁴Th) (AZETSU-SCOTT & NIVEN, 2005). Nesses dois estudos, foi possível então monitorar e estudar a dinâmica das TEP em águas de mar, empregando aqueles cátions metálicos como marcadores.

As TEP são importantes na rede de agregação de partículas, na cadeia alimentar e no "Microbial Loop". Para um melhor entendimento dessas interações é importante conhecer a movimentação descendente e ascendente dessas partículas na coluna d'água. No trabalho de AZETSU-SCOTT & NIVEN (2005) foi verificadas movimentações verticais descendentes e ascendentes das TEP na coluna d'água, sendo que a densidade estimada das TEP variou de 0,70 a 0,84 g mL⁻¹. Em vista disso, AZETSU-SCOTT & PASSOW (2004) sugerem que as TEP tendem a flutuar sobre a superfície dos corpos de água.

As partículas de géis são abundantes e importantes no “microbial loop”, nos processos de sedimentação, nos ciclos biogeoquímicos e na dinâmica das partículas e na química dos carboidratos (VERDUGO *et al.*, 2004).

1.5 TEP e crescimento bacteriano

O fluxo do carbono do fitoplâncton para a bactéria pode acontecer através da exudação de algas (com um predomínio de monômeros), lise celular (com predomínio de macromoléculas) (JONES & LOCK, 1993), predação do zooplâncton, lise ou degradação de algas senescentes, colonização de bactérias e formação de amplos agregados. A importância relativa desses caminhos varia com as taxas de predomínio dos processos biológicos na geração de substrato bacteriano (MIDDELBOE *et al.*, 1995).

Resultados da literatura relacionando florescimento do fitoplâncton e o aumento da biomassa bacteriana mostra que a hidrólise de polímeros gera o principal substrato para o controle do crescimento bacteriano, resultando em um retardo na produção da biomassa bacteriana em relação ao desenvolvimento do fitoplâncton. Esse período é determinado pela fase “lag” entre o início e o fim da florescência. Nesse modelo, a degradação de partículas orgânicas via bactérias aderidas é uma relação específica entre os polímeros e as bactérias (MIDDELBOE *et al.*, 1995).

Recentemente foi demonstrado que: a) as bactérias aderidas às partículas têm uma maior diversidade filogenética; b) as bactérias aderidas são diferentes das bactérias morfológicamente semelhantes de vida livre e c) considerável fração das bactérias de vida livre está presente nos agregados. Ademais, foram encontradas bactérias filogeneticamente diferentes das bactérias de vida livre aderidas em partículas. As partículas são colonizadas por bactérias do próprio ambiente aquático, como indicado pelo aumento progressivo da abundância de bactérias nos agregados marinhos desde suas formações até o seu

desaparecimento. Ainda foi constatado que a mesma linhagem bacteriana altera a sua fisiologia, dependendo da disponibilidade de partículas para colonizar. Desse modo, não só a diferença genotípica como também a fenotípica foi detectada em comunidades de bactérias que colonizam partículas (AGIS *et al.*, 1998).

As bactérias aderidas representam de 10% a 20% do total das bactérias presentes nas regiões pelágicas, e de 11 a 14% em regiões costeiras (AZAM *et al.*, 1983). Muitas vezes essas bactérias que estão agregadas às partículas são consideradas menos importantes para o estoque anual de carbono nas regiões pelágicas ou na coluna d'água. No entanto, em muitas observações tem-se mostrado que as bactérias aderidas podem desempenhar um papel dominante na ciclagem de carbono, dependendo da época do ano (ALLDREDGE & GOTSCHALK, 1990). Geralmente bactérias aderidas têm uma maior importância para a ciclagem de carboidratos monoméricos e aminoácidos do que as bactérias de vida livre, indicando assim uma alta especificidade celular enzimática (SIMON, 1985).

ALLDREDGE & GOTSCHALK (1990) estudaram a água marinha no sul da Califórnia no período de abril a setembro de 1987. Esses pesquisadores encontraram que a abundância de bactérias em agregados de diatomáceas depende da época do ano e das condições do meio e que as mesmas variaram de $2,0 \times 10^6$ a $1,5 \times 10^7$ células por agregados, sendo a média no período estudado de $5,8 \times 10^6$ células por μg de agregados.

WEISS *et al.* (1996) estudaram amostras de água do Lago Constance (Alemanha) coletadas durante o período de 23 de junho a 23 de agosto de 1994. No período em estudo foi encontrada uma abundância variando de $5,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ células por agregado.

A liberação de carboidratos extracelulares leva a formação de TEP e pode promover o crescimento bacteriano, pelo fornecimento de uma superfície apropriada à adesão de bactérias. As bactérias quando crescem ao redor de diatomáceas, podem promover o crescimento destas pelo aumento da concentração de nutrientes naquele local. Durante o declínio do florescimento de diatomáceas, a concentração de nutrientes na água é escassa, ao

contrário da abundância das TEP que é alta. Fornecer TEP como meio de crescimento para bactérias pode suprir a necessidade de nutrientes de diatomáceas, ao mesmo tempo em que preservam ou protegem células bacterianas (PASSOW *et al.*, 1994).

As bactérias podem estar aderidas à superfície das TEP formando um biofilme, um microagregado ou um macroagregado, pois as mesmas podem produzir uma grande quantidade de exopolissacarídeos (DECHO, 1990 e HEISSENBERGER *et al.*, 1994). Alguns estudos têm mostrado os mecanismos de colonização das TEP por bactérias. RAMAIAH *et al.* (2000) descreveram uma relação entre a abundância de bactérias com a produção, o tamanho e concentração das TEP encontradas no Mar da Arábia durante o verão de 1996.

KREMBS & ENGEL (2001) determinaram a distribuição e a abundância das TEP nos blocos de gelo no Mar Laptev (Ártico), no período de julho a setembro de 1995. Esses autores encontraram que a concentração das TEP decresce com o aumento do tamanho dessas partículas, em todas as amostras estudadas. Ademais, constataram que a relação das TEP com a comunidade de microrganismos é diferente na água marinha e nos blocos de gelo, podendo estar relacionada com a presença de bactérias e diatomáceas na fase de gelo e na água do mar com a ausência de flagelados heterotróficos. Ainda neste estudo, os resultados indicaram que a maioria das TEP encontradas na interface gelo-água foi produzida por diatomáceas.

Bacterioplâncton pode liberar quantidades significativas de material capsular que são a mais proeminente fonte de carbono orgânico dissolvido (DOC), em ecossistemas aquáticos, e o carboidrato dissolvido pelo processo de coagulação pode ser o precursor das TEP. Estimou-se a concentração das TEP em $4 \text{ amol C cel}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, o que representa cerca de 25% do carbono orgânico dissolvido liberado pelo bacterioplâncton e previamente determinado (STODEREGGER & HERNDL, 1999).

CARRIAS *et al.* (2002) estudaram dois lagos temperados em diferentes estados de trofia: o primeiro Lago Pavin, um lago oligomesotrófico, que foi estudado durante a primavera, e o segundo Lago Aydat, na França, um lago eutrofizado. Neste estudo, os autores

determinaram a abundância das partículas DYP (DAPI- stained yellow particles), CSP (Coomassi-stained particles) e TEP por microscopia de epifluorescência, e constataram que a abundância dessas partículas pode variar de acordo com a produtividade do lago. Esses autores também determinaram a distribuição das partículas por tamanho e a colonização de cada partícula por bactérias.

Nas últimas décadas muito se tem evoluído no sentido de identificar e isolar os microrganismos. Estudos envolvendo as comunidades de microrganismos têm procurado encontrar e/ou entender a composição, estrutura e estabilidade dessas comunidades, bem como a atividade e função dos microrganismos. Muitas das bactérias de amostras naturais não podem ser vistas com o uso de microscopia convencional, por estarem aderidas ao solo ou a outras partículas que as tornam invisíveis. Corantes (*e.g.* DAPI ou laranja de acridina) têm sido empregados para quantificar os microrganismos. No entanto, pouca informação em relação às espécies presentes tem sido acrescentada. A atividade das bactérias no ambiente tem sido descrita embora não se possam precisar quais espécies são responsáveis por essa atividade (FERRIS *et al.*, 1996).

Nesse sentido se encontra o estudo da filogenética molecular e por intermédio desses estudos muito se tem esclarecido sobre a biodiversidade de microrganismos em seu habitat. Estima-se que apenas uma pequena fração ($\leq 1\%$) dos microrganismos que existem na natureza tenha sido cultivada utilizando-se técnicas microbiológicas de rotina (TORSVIK, 1998; HUGENHOLTZ *et al.*, 1998). Em estudos de simbioses, biofilme e comunidades microbiológicas em geral, microbiologistas têm sido obrigado a recorrer a métodos tradicionais (cultivo e/ou microscopia) que, apesar de essencial para o entendimento da biologia de comunidades microbiológicas, não é o suficiente para compreender a diversidade microbiológica *in situ* (GILLAN *et al.*, 1998).

TESKE *et al.* (1996) descrevem a técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) /DGGE (do inglês: denaturing gradient gel electrophoresis) como uma nova estratégia molecular para a análise da diversidade genética de uma comunidade microbiana.

As populações naturais têm sido caracterizadas por seqüências de DNA (ou de seus genes) diretamente isolados de amostras ambientais (STAHL *et al.*, 1985). Isolar organismos tem sido facilitado com a aplicação de PCR que é um método básico utilizado na clonagem e sequenciamento de gene, por resultar em uma rápida e eficiente amplificação exponencial de uma seqüência específica do DNA, idêntica à seqüência do DNA alvo (AMANN *et al.*, 1992).

Outra técnica baseada na eletroforese dos fragmentos do gene ribossomal (DNAr 16S) é a técnica do DGGE que permite a separação de fragmentos de mesmo tamanho, porém com seqüência de nucleotídeos diferentes, em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uréia e formamida) de DNA. Essa técnica permite esclarecer questões relacionadas à diversidade genética das populações microbianas nos mais diferentes ambientes, as relações entre diferentes comunidades e os organismos que a compõem, bem como a dinâmica de uma população. A técnica do DGGE tem sido utilizada por diferentes pesquisadores, em diferentes objetivos como descrito a seguir.

As técnicas de biologia molecular têm sido usadas para determinar a diversidade genética de uma comunidade microbiana em partículas (TEP) ou agregados orgânicos (lake snow) (WEISS *et al.*, 1996).

Em um trabalho, em que utilizou a técnica PCR/DGGE, HUMAYOUN *et al.* (2003), pode analisar a variação vertical na composição da comunidade do domínio *Bacteria*, em amostras de Lago Mono, na Califórnia. Esse é um lago meromítico, alcalino e hipersalino. Essa mesma técnica foi utilizada anteriormente por um outro de estudo, no mesmo local HOLLIBAUGH *et al.* (2001), para estudo e das mudanças sazonais na estrutura vertical durante o período em que o Lago Mono é polimítico, nesse estudo constatou-se a significativa

diferença na comunidade bacteriana associada à profundidade sobre condições de estratificação embora não tenha sido descrita sua composição filogenética.

TAYLOR *et al* (2004) discute a importância de se entender a biodiversidade ecológica de eucariontes e procariontes. Neste trabalho explorou-se a relação entre a diversidade microbiológica e a especificidade de um hospedeiro, estudando-se a associação entre esponjas marinhas e bactérias.

GROSSART *et al.* (2005) tentou entender e descrever a dinâmica de uma comunidade de bactérias em uma cultura de laboratório de duas comunidades de diatomáceas marinhas (*Thalassiosira rotula* e *Sketonema costatum*).

Há pouco mais de uma década alguns grupos de pesquisa vêm estudando a formação das TEP, sua composição e função, bem como interações com microrganismos. Apesar da posição de destaque da limnologia no Brasil, pouco se conhece sobre essas partículas transparentes. Nesse sentido, os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica são pioneiros e de extrema importância para o entendimento das relações entre as TEP e os organismos no reservatório de Barra Bonita, SP.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho é um sub-tema do projeto temático "Produção e Destino dos Polissacarídeos Extracelulares de Origem Algal em um Reservatório Eutrofizado do Rio Tietê", sob a coordenação do Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, do Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos. É de extrema importância conhecer os processos que visam esclarecer as relações entre os organismos e o ambiente, produção, destino e/ou função dos produtos orgânicos gerados pelos organismos, como por exemplo, a formação das TEP, sua colonização pela comunidade do bacterioplâncton e também a sua utilização pela comunidade.

O presente trabalho teve como objetivos investigar a ocorrência e concentração, a distribuição e frequência por tamanho das partículas de exopolímeros transparentes (TEP), em diferentes profundidades da coluna d'água do reservatório de Barra Bonita. Além disso, foi também investigada a colonização das TEP e a dinâmica da relação de bactérias/TEP.

3 HIPÓTESE

Em um ambiente hipereutrófico como o do reservatório de Barra Bonita, com grande florescimento de cianobactérias e de outras espécies de outras Divisões, produtoras de grandes concentrações de exopolissacarídeos, espera-se encontrar a ocorrência das TEP nas diferentes profundidades do corpo d'água. Nesse sentido o presente trabalho teve como hipótese entender a dinâmica de produção e as relações entre as TEP e os organismos naquele reservatório.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 1 resume as etapas experimentais realizadas no presente trabalho. Após coleta mensal e tratamento das amostras foram investigadas a ocorrência, a concentração, a distribuição, a frequência por tamanho e a colonização por bactérias das partículas de exopolímeros transparentes (TEP), em diferentes profundidades da coluna d'água do Reservatório de Barra Bonita. Além disso, foram determinadas as condições preliminares para a caracterização molecular (PCR e DGGE) da comunidade bacteriana que colonizam as TEP.

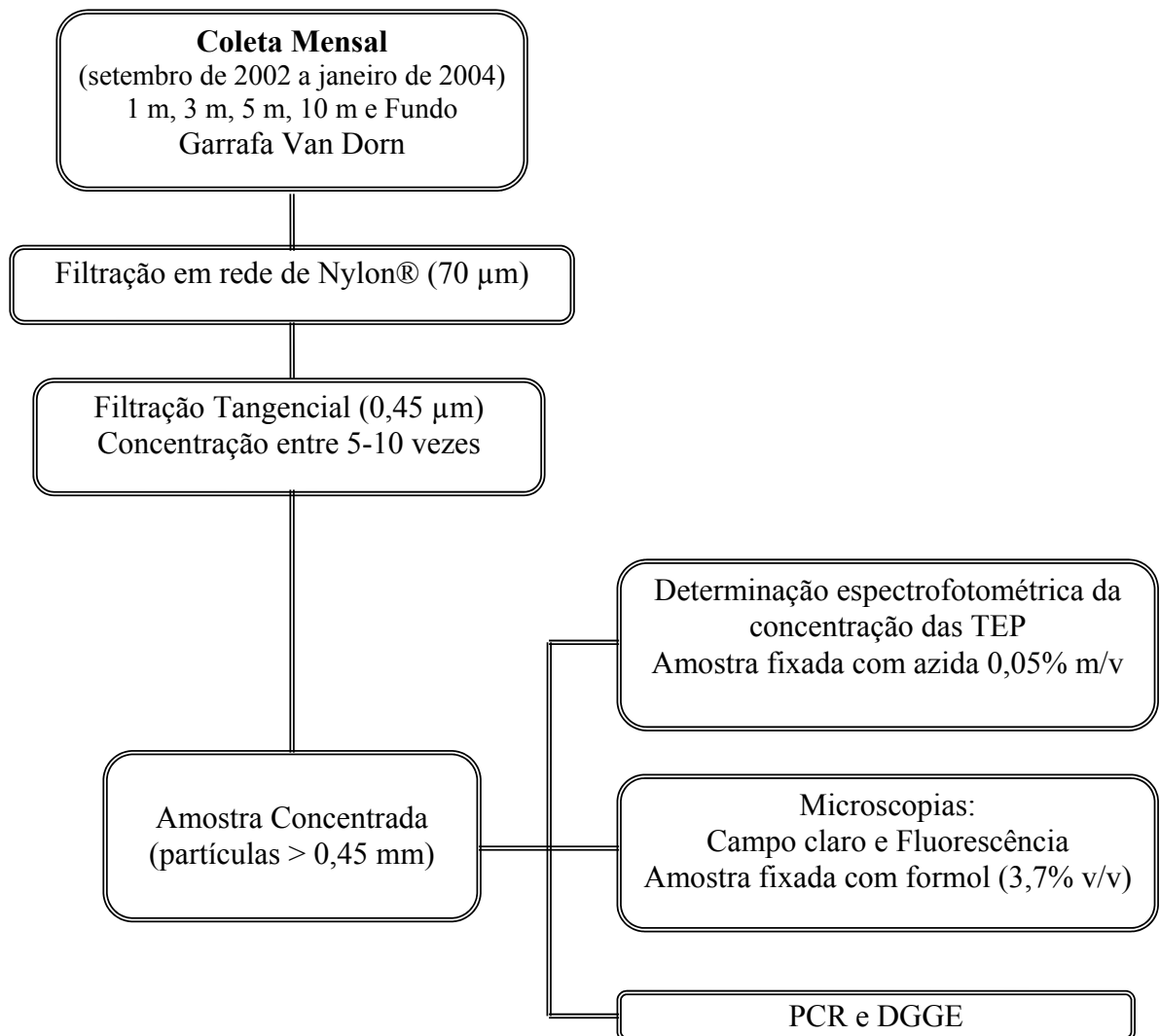


Figura 1 - Esquema das etapas experimentais realizadas no presente estudo.

4.1 Local de Estudo

O material utilizado no presente estudo foi coletado no reservatório de Barra Bonita (Figura 1), localizado a 22° 29' S e 48° 34' W na região central do Estado de São Paulo. Esse reservatório fica próximo às áreas urbanas dos municípios de Barra Bonita e Igarapu, a uma altitude de 430 m, e recebe as águas dos rios Tietê e Piracicaba, ambos eutrofizados. A importância desse reservatório eutrófico, está no fato deste ser o primeiro reservatório do sistema do médio Tietê, fazendo parte de uma bacia hidrográfica situada em uma região com intensa atividade urbana e agroindustrial (VIEIRA, 1999).

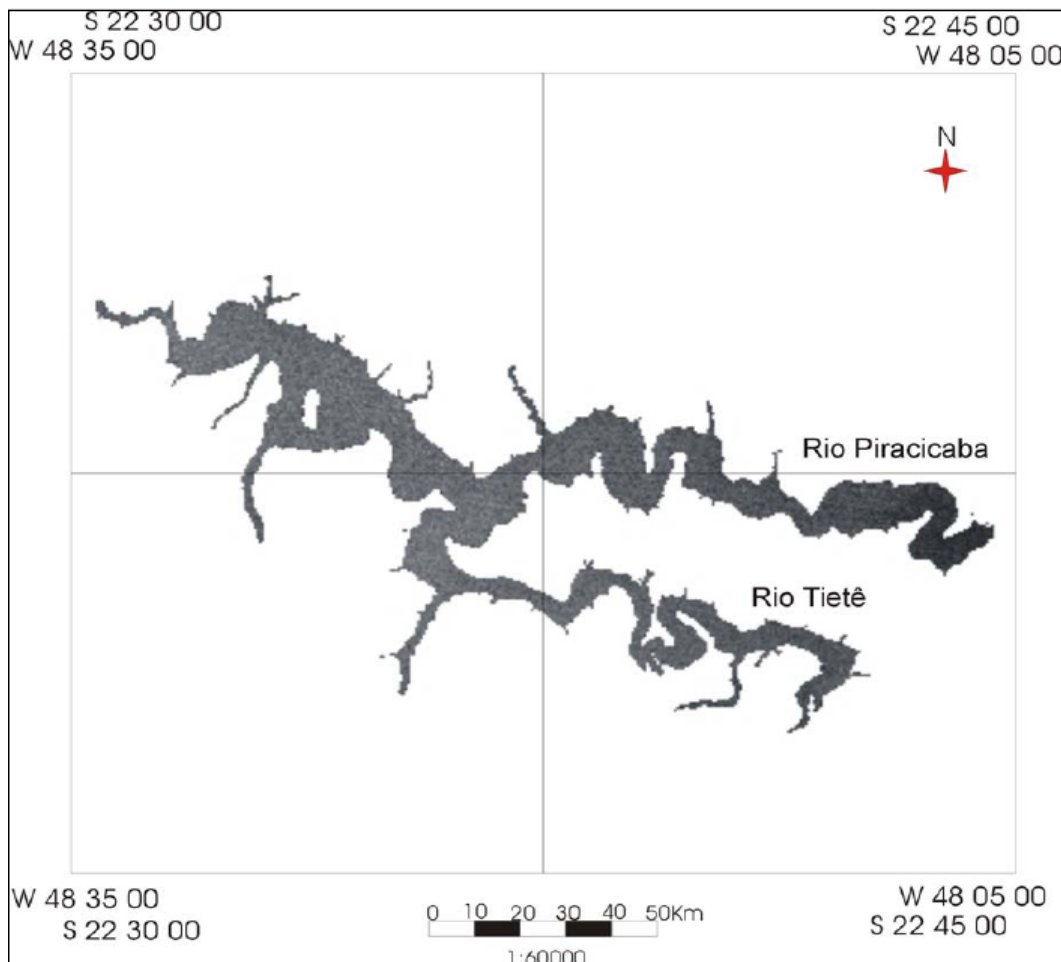


Figura 1 - Mapa do reservatório de Barra Bonita, SP., obtido por GPS, em fevereiro de 2004.
Fonte: Pereira Cabral, 2003.

4.2 Coleta das amostras de água

Foram realizadas coletas mensais de amostras de água do reservatório de Barra Bonita, no ponto definido como estação 2, localizada a cerca de 3,0 km da montante da barragem, nas seguintes profundidades: 1 m, 3 m, 5 m, 10 m e fundo (15 a 20 m), durante o período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. No mês de fevereiro de 2002 foi realizada uma amostragem preliminar para reconhecimento do local de coleta, adequação dos procedimentos e técnicas experimentais, bem como escolha dos intervalos de concentrações de cada uma das variáveis que foram estudados no presente trabalho. Outras quatro coletas foram realizadas entre maio de 2002 a agosto de 2002 para desenvolvimento do método espectrofotométrico para a quantificação das TEP empregando-se Alcian Blue como reagente cromogênico.

As amostras foram coletadas utilizando-se uma garrafa de coleta de 8 litros tipo Van Dorn construída em PVC e com as partes metálicas recobertas, ou substituídas por Teflon[®], e acondicionadas em um recipiente de polietileno de 5 L; esse recipiente foi previamente lavado com água da represa da mesma profundidade da amostra.

Os parâmetros físico-químicos determinados durante a coleta foram: pH e temperatura (°C). Nessas determinações foi empregado um aparelho multisonda Horiba, U-23, nas profundidades supramencionadas.

4.3 Filtração das amostras de água

Imediatamente após a chegada ao laboratório, 3 L de água homogeneizada, de cada profundidade, foi filtrado com uma rede de Nylon[®] de 70 µm, para separação de material em suspensão como restos de vegetais, de animais, grandes colônias de *Microcystis* sp e também substâncias inorgânicas. As amostras foram então transferidas para frascos âmbar de 3 L e

acondicionadas em refrigerador a 4°C, temperatura que permite reduzir o metabolismo bacteriano sem causar grandes danos aos organismos.

4.3.1 Filtração tangencial das amostras de água

A filtração tangencial é uma técnica usual para separar e/ou concentrar partículas presentes em amostras de água para análise (HOFFMANN *et al.*, 2000 e GUÉGUEN *et al.*, 2002). Essa técnica foi utilizada por BARTHEL *et al.* (1989) para concentrar o picoplâncton e nanoplâncton, uma vez que a concentração da biomassa era baixa e dificultava a obtenção das medidas de seu metabolismo. Assim, utilizando-se essa técnica de filtração foi possível concentrar a amostra de água sem causar prejuízos ou danos às células. Ademais, os autores desse trabalho sugerem para estudos ecológicos envolvendo amostras ambientais, um fator de concentração da ordem de 5 a 10 vezes, a fim de evitar problemas de lise celular.

Para a quantificação das TEP, as amostras foram concentradas 5 ou 10 vezes através da técnica de filtração tangencial, utilizando-se um aparelho Advanced Mid Jet™ System e cartuchos de fibra oca (0,45 µm), Mid Gee™ MM Cartridge, A/G Technology Corporation, USA. Antes e após cada filtração das amostras de água provenientes de Barra Bonita, o cartucho foi lavado com: água desionizada, solução de hidróxido de sódio 0,5 mol L⁻¹, água desionizada, solução de hipoclorito de sódio 5 a 6 % e finalmente com água desionizada em abundância. Quando não em uso, o cartucho foi armazenado em ambiente seco. Com a filtração tangencial, as partículas > 0,45 µm (TEP + células) foram concentradas e separadas daquelas menores do que 0,45 µm (colóides + material dissolvido). A presença de carboidratos (polissacarídeos e monossacarídeos) no filtrado (< 0,45 µm) foi monitorada para averiguar a eficiência dessa lavagem, empregando-se o método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

A eficiência de separação/recuperação foi testada com Dextran-2000K (n^o D-5376) Sigma/USA, segundo o seguinte procedimento: 100 mL de solução de Dextran 200 µg L⁻¹ foram colocados no filtrador tangencial sendo o volume reduzido para 30 mL. Esse volume (o concentrado) foi “lavado” várias vezes com 30 mL de água desionizada. A cada lavagem, 10 mL foram retirados para determinar a concentração de carboidratos pelo método de Dubois (1956); do concentrado filtrado (> 0,45 µm) depois de realizada a filtração em 0,45 µm para a retirada das partículas e do filtrado (< 0,45 µm). Depois de repetidas “lavagens”, a eficiência de remoção/recuperação foi suficiente para reduzir em 95-98 % a concentração inicial de Dextran.

4.4 Preparo e acondicionamento das amostras

Cada amostra filtrada por filtração tangencial foi dividida em 3 subamostras:

(a) uma subamostra de 500 a 700 mL foi concentrada para um volume final de 70 a 50 mL, essa foi utilizada nas determinações da concentração das TEP por espectrofotometria em comprimento de onda de 602 nm, segundo metodologia discutida no Anexo 1. A subamostra que foi empregada posteriormente na determinação espectrofotométrica das TEP, foi fixada com solução de azida de sódio em concentração final de 0,05 % m/v. Essa fixação evita o crescimento de microrganismos e também a liberação de material orgânico envolvido com a formação das TEP. Essas amostras foram acondicionadas em refrigerador a 4 °C.

(b) uma subamostra de 250 mL a 400 mL foi concentrada para um volume final de 50 mL e utilizada para a enumeração das TEP em determinações microscópica de campo claro e de fluorescência. Esta subamostra foi fixada com solução de formol à concentração final 3,7 % m/v, e acondicionado em frasco âmbar em refrigerador, a 4 °C.

(c) uma subamostra de 1000 mL a 1500 mL foi concentrada para um volume final de 100 mL. Essa subamostra concentrada foi subdividida e acondicionada em 4 frascos com 25 mL cada, e armazenados no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para ser utilizada nas determinações de PCR e DGGE. Posteriormente, a subamostra utilizada nas técnicas moleculares (PCR e DGGE) para a caracterização de bactérias aderidas às TEP foi filtrada em filtro estéril de polycarbonato com poros de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore) e cada filtro foi acondicionado em placa de petri estéril. A placa de petri etiquetada foi vedada com fita adesiva e armazenada em a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O manuseio das amostras para serem utilizadas nas técnicas do PCR e DGGE foi executado em câmara de fluxo laminar.

4.5 Quantificação espectrofotométrica das TEP (método comparativo de Passow & Alldredge, 1995)

Segundo PASSOW & ALLDREDGE (1995), as TEP são visíveis quando tingidas com Alcian Blue 8GX C.I. 74240 (Polyscience), um indicador hidrofílico catiônico que complexa os grupos aniônicos carboxílicos ou grupos sulfatos dos polissacarídeos ácidos. A cadeia lateral desse indicador ao reagir com o grupo carboxílico do polissacarídeo produz um complexo não iônico insolúvel e que pode precipitar. A seletividade do tingimento, ou do procedimento espectrofotométrico para a determinação quantitativa das TEP nas amostras de água, pode ser controlada variando-se, tanto o pH, como a concentração dos sais na solução desse reagente cromogênico.

Nesse procedimento, alíquotas de 5, 10, 20, 30 e 40 mL de água nas diferentes profundidades foram filtradas, em triplicatas, em um filtro de polycarbonato (Isopore, Millipore) de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ com o auxílio de uma bomba a vácuo sob pressão reduzida (150 mm Hg). O material retido nos filtros foi então processado para a quantificação das TEP. As TEP retidas no filtro de polycarbonato de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ foram tingidas com uma solução de Alcian Blue

0,02 % m/v em ácido acético 0,06% v/v (pH=2,5). Convém observar que a solução de Alcian Blue foi previamente filtrada em filtro de polycarbonato de 0,2 μm para eliminar a precipitação desse corante no frasco do reagente. Após a filtração, os filtros foram lavados com água destilada para retirar o excesso do corante e então transferidos para béqueres de 10 mL, contendo 6 mL de H_2SO_4 80 % v/v e deixados embebidos por duas horas e agitados manualmente por 3-5 vezes durante esse período. Após esse tempo, uma alíquota de 4 mL foi utilizada na determinação espectrofotométrica das TEP. As concentrações das TEP (expressas em $\mu\text{g L}^{-1}$ de goma de xantana (Gum Xanthan, G 1253, Sigma)) foram determinadas espectrofotometricamente em comprimento de onda de 787 nm, empregando-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8452A.

A curva de calibração foi obtida empregando-se goma de xantana no intervalo de concentrações de 1 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses pesquisadores (*op. cit.*) investigaram 10 carboidratos diferentes e, a goma de xantana foi a que melhor se assemelhou com as TEP, destacando-se a similaridade dos tamanhos das partículas de gel formadas que foram retidas no filtro de polycarbonato de 0,45 μm , levando a uma maior precisão e exatidão do método espectrofotométrico (PASSOW & ALLDREDGE, 1995).

Entretanto, essa metodologia além de trabalhosa, requer um tempo mínimo de 3 - 4 h possui baixa reprodutibilidade, precisão e exatidão. Portanto, desenvolveu-se um novo procedimento espectrofotométrico para determinação das TEP em águas naturais em conjunto com o grupo de Química Analítica do DQ da UFSCar (FATIBELLO et al., 2004) (ver Anexo 1).

4.6 Desenvolvimento de nova metodologia para a determinação das TEP

Inicialmente, um estudo sistemático foi realizado empregando-se alguns corantes (azul de toluidina; azul de astra e Alcian Blue) nas concentrações de 0,02%; 0,03%; 0,04%; 0,06%;

0,09% e 0,012% m/v e soluções tampão diversas (tampão fosfato, tampão ftalato e tampão acetato) em diferentes valores de pH (2,5; 3,3; 4,0; 4,8 e 6,89). Após esses estudos iniciais foi estabelecida a melhor condição experimental para a determinação da concentração das TEP nas amostras de água do reservatório de Barra Bonita.

Uma alíquota de 5 mL da amostra concentrada anteriormente (filtração tangencial) foi adicionada em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida adicionou-se 0,5 mL de Alcian Blue 0,06% m/v em tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,0). Após agitação manual por 1 minuto, completou-se o volume do balão com tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,0). Esse volume foi então transferido para um tubo de ensaio e centrifugado a 3000 rpm, por meia hora, em uma centrífuga FANEN, modelo Baby. Segundo PASSOW & ALLDREDGE (1995), o Alcian Blue reage com as TEP formando um pigmento não iônico de baixa solubilidade que é então sedimentado, formando assim um corpo de fundo no tubo de ensaio. A solução sobrenadante de Alcian Blue que não reagiu é transferida para uma cubeta e sua absorvância é determinada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 602 nm. Na construção da curva analítica empregou-se como substância padrão goma de xantana no intervalo de concentração de 1-15 µg mL⁻¹ em tampão acetato 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,0). As determinações das concentrações das TEP nas amostras e a curva analítica foi feita em triplicata.

O método desenvolvido neste trabalho é mais simples e rápido, mais preciso e exato que o método proposto por PASSOW & ALLDREDGE (1995). Além disso, o método desenvolvido neste trabalho não necessita de etapas preliminares extensas de preparação das amostras.

A introdução da filtração tangencial para a eliminação de colóides e concentração das amostras, bem como a dispensa do uso do filtro de policarbonato (Isopore, Millipore) de 0,45 µm, necessário no método descrito na literatura, além de diminuir significativamente os

custos, elimina também fontes de erros inerentes à pesagem dos filtros e da dissolução das TEP-Alcian Blue por ácido sulfúrico.

No entanto, em ambos os métodos não se consegue separar as TEP das células (principalmente as microalgas) levando assim a super-estimativa da concentração das TEP.

4.7 Enumeração das TEP por microscopia de campo claro

Inicialmente, 2,0 mL da subamostra de água filtrada, concentrada e fixada com uma solução de formol 3,7 % v/v (concentração final) foram transferidos para um tubo de ensaio juntamente com 0,3 mL de solução de Alcian Blue 0,06% m/v. Após agitação manual por 30 s, a solução foi deixada em repouso por 2 h. Em seguida, essa solução foi homogeneizada e filtrada em um filtro de ester de celulose quadriculado de 0,45 μm (Millipore) e com o auxílio de uma bomba a vácuo, sob uma pressão de aproximadamente 150 mm de Hg. O filtro foi lavado com 30 mL de água desionizada para que o excesso de Alcian Blue fosse removido. As preparações entre lâmina e lamínula foram realizadas colocando-se uma gotícula de óleo de imersão sobre a lâmina de vidro, sendo então o filtro de ester de celulose quadriculado transferido para a lâmina. Após a adição de outra gotícula de óleo de imersão, o material foi coberto com uma lamínula e sobre esta se aplicou uma leve pressão. As lâminas preparadas foram armazenadas em caixas próprias, à temperatura ambiente. Todo esse procedimento foi realizado em duplicata.

A abundância e tamanho das TEP foram medidos semi-automaticamente, com sistema de vídeo-câmara Sony CCD IRIS, acoplado a um microscópio Olympus, modelo BX 41 provido de um programa de captura de imagens, Image Pro®-Plus. Essa leitura foi feita utilizando-se uma ampliação de 400X. Sob a fonte de luz do microscópio foi colocado um filtro de cor laranja para que as TEP fossem destacadas do azul mais claro do filtro e assim

facilitasse a sua visualização e distinção de outras partículas inorgânicas e algas. Esse filtro melhorou a qualidade das fotografias, tornando-as mais nítidas.

Vinte campos escolhidos aleatoriamente em dois cortes transversais da lâmina foram considerados, sendo então registradas fotograficamente. Essas fotos foram então calibradas e as TEP delineadas manualmente e suas áreas registradas e armazenadas no computador. O cálculo da distribuição das partículas medidas, em cada profundidade na coluna d'água, foi obtido por meio da transformação da área de cada TEP em diâmetro equivalente de uma esfera perfeita (ESD), que foram agrupados em 10 classes de tamanho (1,0 - 1,50; 1,50 - 2,25; 2,25 - 3,38; 3,38 - 5,06; 5,06 - 7,59; 7,59 - 11,39; 11,39 - 17,09; 17,09 - 25,63; 25,63 - 38,44; 38,44 - 57,67 μm). Cada classe por tamanho, foi normalizada para cada intervalo de 1,5 μm diâmetro da partícula.

Como as amostras foram filtradas em filtros com diâmetro de 16 mm ou raio de 8 mm, a área ($A = \pi r^2$) dos mesmos foi calculada, sendo igual a $2,01 \times 10^8 \mu\text{m}^2$. Como a área de cada campo medida no microscópio foi de $15.453,97 \mu\text{m}^2$, nos 20 campos considerados, foi medida uma área total de $3,09 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. Portanto, no cálculo da concentração das partículas (C_p) um fator de correção igual a 650 foi considerado ($A_{\text{filtro}}/A_{20 \text{ campos}}$). A equação 1 resultante para o cálculo da concentração de partículas é:

$$C_p = 650 \times N_p/V(\text{mL}) \quad \text{(equação 1)}$$

onde C_p é a concentração das partículas; N_p o número de partículas medidas e V o volume de amostra filtrado em mL.

4.7.1 Distribuição das TEP por tamanho

A distribuição das TEP por tamanho é geralmente descrita por uma equação do tipo (MARI & KIØRBOE, 1996; McCAYE, 1984):

$$N = kd_p^{-\beta} \text{ ou } dN/d(d_p) = kd_p^{-(\beta+1)} \quad (\text{equação 2})$$

onde dN representa o número de partículas por unidade de volume (1 mL por exemplo) no intervalo de tamanho de d_p a $(d_p + d(d_p))$. A constante k depende da concentração das partículas e β descreve a distribuição das partículas por tamanho. Assim, quanto menor for o valor de β encontrado, menor será a fração das partículas de menor tamanho. Aplicando-se o logaritmo em ambos os membros da equação 2, tem-se:

$$\log [dN/d(d_p)] = \log k - (\beta + 1) \log [d_p] \quad (\text{equação 3})$$

Assim os valores de β e de k são estimados das regressões (equação 4):

$$\log [dN/d(d_p)] \text{ vs } \log [d_p] \quad (\text{equação 4})$$

desta maneira, o coeficiente linear será igual a $\log k$ e o coeficiente angular igual a $-(\beta + 1)$. A magnitude de β descreve a distribuição das partículas por tamanho em diferentes amostras (MARI & KIORBOE, 1996; McCAYE, 1984).

4.7.2 Determinação da colonização de bactérias nas TEP empregando microscopia de fluorescência

Para a determinação do número de bactérias aderidas às TEP, foram usadas alíquotas de 1,0 ou 2,0 mL de cada amostra de água natural, previamente filtrada em filtração tangencial (cartuchos de fibra oca (0,45 μm)) e fixada com solução de formaldeído 3,7% v/v (concentração final). Nesse procedimento foi feita dupla coloração, empregou-se o corante

4,6- diamidino-2-fenilindole (DAPI), por ser mais específico para a contagem de bactérias, uma vez que esse reagente colorimétrico adere ao DNA, especialmente nos filamentos ricos em adenina e timina (PORTER & FEIG, 1980; PHILLIPS *et al.*, 1999; GROSSART *et al.*, 2003; BERKENHEGER & FISCHER, 2004).

Não foi utilizado o laranja de acridina (AO) para a contagem direta de bactérias devido à falta de seletividade do mesmo, uma vez que este não distingue bactérias de partículas inorgânicas, como detritos, argilas ou colóides, levando assim a um aumento do erro das contagens (BLOEM, 1995).

4.7.2.1 Preparação dos corantes

As seguintes soluções foram preparadas para serem empregadas na microscopia de fluorescência:

a) solução estoque DAPI-I (1000 mg L^{-1}). Essa solução deve ser estocada em freezer a -20°C e no escuro.

b) solução estoque DAPI-II (10 mg L^{-1}), obtida pela diluição da solução estoque DAPI-I — 1:100. Essa solução também foi armazenada nas mesmas condições que a solução do item a.

c) solução de trabalho, foi preparada empregando-se 1 mL da solução estoque DAPI-II (10 mg L^{-1}) com 7 mL de água desionizada, sendo armazenada em refrigerador a -4°C em frasco no escuro..

4.7.2.2 Preparação das lâminas

As lâminas empregadas na microscopia de fluorescência foram preparadas da seguinte maneira. Em um frasco âmbar coberto com papel alumínio foram adicionados 2 mL da

amostra fixada com formaldeído, 0,5 mL de solução de Alcian Blue 0,06% m/v e 20 mL de água desionizada e previamente filtrada em seringa contendo filtro estéril de 0,22 μm . Após repouso de 1 hora e meia no escuro, adicionou-se 1,2 mL DAPI (solução de trabalho), e após 30 minutos, o material foi filtrado empregando-se um sistema de filtração com membrana HA quadriculada preta de 0,45 μm (Millipore), de ester de celulose e com o auxílio de uma bomba a vácuo sob pressão reduzida de 150 mmHg. O filtro foi então lavado com 30 mL de água desionizada e filtrada para a retirada do excesso dos corantes. O filtro foi cuidadosamente transferido para a lâmina contendo uma pequena gota de óleo de imersão sem fluorescência com o auxílio de uma pinça sem ponta. Em seguida, outra gota de óleo de imersão foi adicionada e uma lamínula foi colocada sobre o filtro e, manualmente aplicada uma pequena pressão. Após o espalhamento do óleo na lamínula, a mesma foi selada com esmalte incolor e estocada no escuro a -4°C . As lâminas foram preparadas em duplicata.

Em cada lâmina, no mínimo 20 campos ou 20 TEP associados a bactérias foram registrados, utilizando-se um microscópio de fluorescência Zeiss (Jena, Alemanha) modelo Axioplan, acoplado a um sistema de câmara fotográfica Spot Diagnostic Instrument Inc. e sistema analisador de imagem Image Pro[®]-Plus, utilizando-se um aumento de 1000X. A área de cada TEP foi medida manualmente e, as bactérias associadas a elas contadas. Esse procedimento foi possível permutando-se a iluminação entre a luz branca e UV. Como as partículas são tri-dimensionais, para se examinar todo o volume das mesmas e as bactérias associadas a elas, alterava-se o campo focal através do botão de ajuste micrométrico.

Como as amostras foram filtradas em filtros com diâmetro de 16 mm ou raio de 8 mm, a área ($A = \pi r^2$) dos mesmos foi calculada, sendo igual a $2,01 \times 10^8 \mu\text{m}^2$. Como a área de cada campo medida no microscópio foi de $13125,23 \mu\text{m}^2$, nos 20 campos considerados, foi medida uma área total de $2,62 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. Portanto, no cálculo da concentração das partículas (C_p), um

fator de correção igual a 767 foi considerado ($A_{\text{filtro}}/A_{20 \text{ campos}}$). A equação 5 resultante para o cálculo da concentração de partículas é:

$$C_p = 767 \times N_p/V(\text{mL}) \quad (\text{equação 5})$$

Segundo MARI & KIØRBOE (1996), um erro de aproximadamente 4% é verificado na enumeração de bactérias aderidas às TEP com diâmetros menores que 3 μm e de aproximadamente 13% as TEP com diâmetros maiores que 30 μm . Na estimativa dos volumes das TEP, foi considerado que as mesmas são esféricas e sólidas, sendo o volume calculado a partir da equação de uma esfera perfeita, ou seja $V = 4/3\pi r^3$, sendo o r igual à metade do diâmetro da esfera. O volume estimado foi empregado para calcular a concentração de bactérias por volume das TEP

4.8 Técnicas moleculares para a caracterização de bactérias aderidas as TEP

4.8.1 Procedimentos para a extração de DNA

A extração do DNA foi realizada adaptando-se a metodologia descrita para a extração de DNA de microorganismos de água doce (PICKUP *et al.*, 1995).

Alguns protocolos para a extração de DNA de bactérias foram testados com as amostras provenientes do Reservatório de Barra Bonita. Devido à baixa concentração de bactérias aderidas às partículas das TEP, foi necessário reunir as cinco amostras coletadas em diferentes profundidades de uma única coleta, representando essa uma amostra mensal da coluna d'água. No presente estudo, 17 amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 foram analisadas.

Como as amostras do mês de março de 2003 apresentaram as maiores concentrações das TEP e de bactérias aderidas a elas, as cinco amostras desse mês, nas profundidades de 1m; 3m; 5m; 10m e fundo foram também estudadas separadamente pelas técnicas de PCR e DGGE. Por tanto, um total de 22 amostras, além do controle negativo e positivo, foram estudadas.

No controle positivo foi empregada uma linhagem de *Escherichi coli* BL21 (DE 3) e no controle negativo, empregou-se água para injeção da HALEX ISTAR.

Após filtração tangencial das amostras de água natural em filtro com poro de 0,45 μm , para a concentração das TEP e eliminação da maioria das bactérias de vida livre, ou seja, as bactérias que não estavam aderidas às partículas das TEP, um volume de 600 a 900 mL de cada amostra foi filtrado em uma membrana estéril de 0,45 μm , e colocada em placa de Petri estéril, sendo então armazenada em congelador a -20 °C. Esses filtros foram então transferidos com 10 mL de água para injeção HALEX ISTAR para tubo de tipo “falco” de 15 mL. Foram preparados dois outros tubos: em um foi colocado 30 μL de solução da linhagem de *Escherichi coli* BL21 (DE 3) e 10 mL de água para injeção HALEX ISTAR, este foi utilizado como controle positivo e em outro tubo 10 mL de água para injeção HALEX ISTAR para ser utilizado como controle negativo. Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm, por 50 min a 4 °C, em uma centrífuga refrigerada SORVALL, modelo RC 5C plus. Em seguida os tubos foram transferidos para um aparelho de ultra-som BRANSON, modelo 1210, ligado em potência máxima por 50 min. Após esta etapa, os tubos foram novamente centrifugados a 4000 rpm, por 50 min a 4 °C e logo após o filtro e o sobrenadante foram descartados.

No tubo falco os “pellets” contendo as bactérias foram ressuspensos em 100 μL de lisozima 50 mg mL^{-1} em tampão TE (Tris-HCl 10 mmol L^{-1} ; EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8.0), recentemente preparada. Os tubos foram incubados em uma estufa a 37 °C por 3 horas. Logo após, o conteúdo dos tubos foi transferido para tubos Eppendorf, onde foram acrescentados

500 μL de solução de lise celular estéril (solução de tiocianato de guanidina 5 mol L^{-1} ; EDTA 100 mmol L^{-1} e sarcosil 5% m/v). Os tubos Eppendorf foram brevemente agitados em vortex e colocados no freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Em seguida, os tubos Eppendorf foram transferidos para um banho de gelo, sendo adicionados 250 μL de solução de acetato de potássio 7,5 mol L^{-1} ; após 10 min, foram adicionados 500 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e, depois de agitados manualmente, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min. Cuidadosamente cada sobrenadante foi transferido para outros tubos Eppendorf estéreis e então, em banho de gelo, foi adicionado 0,54 volumes de isopropanol gelado. Novamente as amostras foram centrifugadas a 6500 rpm, por 5 min, sendo acondicionadas por 13 horas no freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No dia seguinte, as amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm, por 20 min, o sobrenadante foi descartado e, os “pellets” contendo DNA foram lavados com etanol 70 % v/v, centrifugados por 3 min a 13000 rpm, e colocados em uma estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a evaporação do etanol (30-40 min). O DNA foi ressuscitado em 20 μL de tampão TE e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8.2 Amplificação de DNA por PCR

Para a amplificação do DNA utilizou-se a metodologia da reação de polimerização em cadeia (PCR). Essa reação permite que se obtenha o fragmento “alvo” (específico) do DNA através de sua duplicação de modo exponencial (SILVA-PEREIRA 2003).

Os “primers” ou oligonucleotídeos sintéticos são os iniciadores da reação de polimerização e, para a amplificação do fragmento do DNAr 16S do Domínio *Bacteria* foram os seguintes:

- **968f-[5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA CCT TAC 3'] (NUBEL *et al* 1996)**
- **1401r-[5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'] (HEUER *et al* 1997).**

Devido à diversidade de aplicações da reação de polimerização em cadeia, o protocolo padrão foi adaptado para a otimização dos resultados. Todos os procedimentos envolvidos nesta etapa foram realizados em câmara sob fluxo laminar e em banho de gelo, com o cuidado da utilização de material novo previamente esterilizado, ponteiros com proteção de aerossol, água estéril para injeção HALEX ISTAR, microtubos Eppendorf de 0,5 mL próprio para o termociclador.

Uma reação de PCR é constituída por: dNTP's (desoxirribonucleotídeos trifosfato), uma mistura equimolar de cada nucleotídeo dATP, dCTP, dGTP e dTTP, que devem ser mantidos armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; os “primers” 968f com gc clamp e 1401r que foram os oligonucleotídeos iniciadores da reação; enzima *Taq* DNA polimerase e o seu tampão que no caso já veio acrescido de solução de MgCl_2 15 mmol L^{-1} , DNA e a água estéril. Toda a reação foi preparada para um volume final de $25\text{ }\mu\text{L}$. A Tabela 1 apresenta a concentração final de cada reagente, bem como os volumes empregados na reação de PCR.

Tabela 1 - Concentração final dos reagentes para execução do PCR.

Reagentes	Estoque	Vol. para uma reação de $25\text{ }\mu\text{L}$	Concentração final em cada reação
Solução tampão da <i>Taq</i> , contendo MgCl_2 15 mmol L^{-1}	10 X	$2,5\text{ }\mu\text{L}$	1 X
dNTP's	10 mmol L^{-1}	$0,2\text{ }\mu\text{L}$	$200\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$
Primer 968f	$20\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$	$0,25\text{ }\mu\text{L}$	$0,2\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$
Primer 1401r	$20\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$	$0,25\text{ }\mu\text{L}$	$0,2\text{ }\mu\text{ mol L}^{-1}$
<i>Taq-polimerase</i>	$5\text{ U}/\mu\text{L}$	$0,2\text{ }\mu\text{L}$	1 U
DNA	--	$2\text{ }\mu\text{L}$	10-30 ng
H_2O	--	$19,6\text{ }\mu\text{L}$	--

Inicialmente, foram transferidos $2\text{ }\mu\text{L}$ da solução de DNA extraído e a ser amplificado de cada uma das 25 amostras nos microtubos Eppendorf previamente rotulados. Em um outro

tubo Eppendorf, foi preparada uma mistura (mix) contendo 509,6 μL de água estéril, 65 μL de solução tampão da Taq contendo MgCl_2 15 mmol L^{-1} , 5,2 μL de solução de dNTP's 10 mmol L^{-1} , 6,5 μL do Primer 968f, 6,5 μL do primer 1401r e por último 5,2 μL da solução da enzima *Taq DNA polimerase*. Então, 23 μL dessa solução preparada (mix) foram rapidamente transferidos para cada um dos 25 microtubos Eppendorf contendo o DNA a ser amplificado, sendo em seguida colocados no termociclador Programmable Thermal Controller, PTC - 100™, M J Research, Inc. Considerando-se as características da enzima *Taq DNA polimerase* empregada, houve necessidade de processar rapidamente todas as amostras, uma vez que o poder catalítico dessa enzima muda com a temperatura e sua meia-vida é relativamente baixa.

4.8.2.1 Programa usado na amplificação por PCR

O protocolo sugerido por ZOETENDAL *et al* (1998) e descrito a seguir, foi utilizado na amplificação por PCR, do fragmento de DNAr 16 S do *Domínio Bacteria*, produto da extração feita anteriormente com as 22 amostras provenientes da Represa de Barra Bonita, o controle negativo e 2 controles positivos (*Escherichi coli* BL21 (DE 3)).

- passo 1 1º ciclo 94 °C por 3 minutos (desnaturação inicial)
- passo 2 2º ciclo 94 °C por 30 segundos (desnaturação do DNA)
- passo 3 3º-ciclo 56 °C por 30 segundos (anelamento dos primers)
- passo 4 4º ciclo 68 °C por 1 minuto (extensão dos primers)
- passo 5 repetir passo 2; 3; 4 por 30 vezes
- passo 6 8º ciclo 68° C por 7 minutos (extensão final)
- passo 7 9º ciclo resfriamento a 4 °C.

A qualidade dos produtos do PCR foi confirmada em gel de agarose 2 % m/v. O gel de agarose foi preparado em tampão TAE 1X (TAE (25X)) 121 g TRIS base; 28,55 mL de ácido acético glacial; 18,6 g Na₂EDTA em pH 8,4. Após dissolução utilizando-se forno de microondas, aguardou-se o resfriamento deste até 60 °C, o gel foi colorido com 2 µL de solução de brometo de etídio 10 mg mL⁻¹, sendo então o gel de agarose vertido na cuba de eletroforese Eletroforesis Systems mid-horizontal systems, FB – SB – 1316, Fisher Scientific, Pittsburgh,PA, tomando-se o cuidado para não formar bolhas. O gel deve ter uma espessura aproximada de 4 mm e deve ser coberto com solução tampão TAE. Em um pedaço de Parafilm, 8 µL de amostra foram misturados com 3 µL de solução tampão da amostra (glicerol 50% v/v; Azul de bromofenol 0,25% m/v; em TE) e então aplicados nos poços do gel. A corrida foi feita aplicando-se uma corrente elétrica de voltagem constante de 90 V por aproximadamente 1 hora e meia. A fonte utilizada foi uma Electrophoresis Power Supply, EPS 300, Pharmacia Biotech.

O gel então foi cuidadosamente transferido para um mini transiluminador UV (Bio-Rad) e documentado com câmara fotográfica Kodak, e registrada em Kodak Digital Science dS, Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Kodak Digital Science ID.

4.8.3 Método do DGGE

O resultado da amplificação do 16S DNAr da amostra de água da Represa de Barra Bonita foi analisado utilizando a técnica do DGGE (do inglês Denaturing Gradient Gel Eletroforese), um método utilizado para separar os fragmentos de DNA com o mesmo tamanho, porém com seqüência de nucleotídeos diferentes, baseada na mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA parcialmente desnaturada (TESKE *et al.*, 1996). O

protocolo descrito a seguir está descrito no manual do equipamento da Bio-Rad, The *DCode™* Universal Mutation Detection System.

A solução estoque de Acrilamida/Bis-acrilamida 40% m/v (38,93:1,07 m/m) foi preparada como descrito a seguir. Uma massa de 38,93 g de acrilamida e outra de 1,07 g de bis-acrilamida foram inicialmente solubilizadas em 50 mL de água estéril em vidro Schott. Após transferência dessa solução para um balão volumétrico de 100 mL, o volume deste foi completado com água estéril. Em seguida, essa solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e estocada a 4°C.

Para um fragmento do DNA de 300-1000 pb, a porcentagem de acrilamida/bis-acrilamida utilizada na confecção do gel foi de 6%. Foram preparadas as soluções estoque desnaturante 0% e 100%, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração final dos reagentes para a preparação das soluções estoque desnaturante 0% e 100%.

Reagentes	Solução Desnaturante	Solução Desnaturante
	0%	100%
Acrilamida/Bis-acrilamida 40 %	15 mL	15 mL
Tampão TAE 50X	2 mL	2 mL
Água desionizada	83 mL	
Formamida desionizada	–	40 mL
Uréia	–	42 g
Volume Total	100 mL	qsp 100 mL

A solução desnaturante 0% para preparar o gel 6% de poliacrilamida foi preparada utilizando-se um banho-maria a 37°C e agitação magnética constante. Em um frasco Schott, foram adicionados 15 mL de solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida 40 %, 11 mL de água desionizada e 2mL de solução tampão TAE 50X, sendo então o volume completado para 100 mL com água desionizada. A solução desnaturante 100% foi preparada da mesma maneira que a solução desnaturante 0%, porém adicionou-se a uréia aos poucos, à medida que vai sendo dissolvida e então adicionaram-se 40 mL de formamida desionizada e o volume foi completado com água desionizada. As soluções foram deixadas em repouso por 15 minutos

para desgaseificar e foram então filtradas em membrana 0,45 μm . Essas soluções foram estocadas a 4°C em garrafa âmbar.

A montagem do sanduíche de gel gradiente paralelo (16 x 16 cm e 1 mm de espessura) foi feita em uma superfície limpa, colocou-se a placa de vidro maior, os espaçadores e a placa de vidro menor dentro dos grampos. Após o ajuste dos parafusos dos grampos para manter o sanduíche de placas no lugar, o sanduíche de gel foi colocado na canaleta de alinhamento com a placa de vidro menor para frente e, com o auxílio do cartão de alinhamento, ajustou-se os espaçadores para evitar vazamento do gel durante sua confecção, bem como o vazamento da solução tampão durante a corrida da eletroforese.

A Tabela 3 fornece os volumes de soluções desnaturantes (0% e 100%) necessários para a confecção do gradiente de desnaturação no gel de DGGE. No presente estudo foram confeccionados dois géis: um com gradiente de 45%-65% e o outro com gradiente de 40%-65%, para serem empregados na placa de sanduíche.

Tabela 3 - Volumes das soluções desnaturantes (0% e 100%) necessários para a confecção do gradiente de desnaturação no gel de DGGE.

Concentração de desnaturante	Solução 0%	Solução 100%
40%	9,6 mL	6,4 mL
45%	8,8 mL	7,2 mL
60%	6,4 mL	9,6 mL
65%	5,6 mL	10,4 mL

Em um banho de gelo, os volumes de solução estoque desnaturante de baixa e alta densidade foram pipetados para dois tubos “Falco”, um marcado com LO (solução de baixa densidade) e o outro com HI (solução de alta densidade). Aos tubos, foram adicionados 150 μL de solução de perssulfato de amônio 10% m/v e 14 μL de solução de TEMED (concentração final 0,09% m/v). Os tubos foram invertidos por repetidas vezes para homogeneizar a solução, sendo então as soluções transferidas para seringas de 30 mL acopladas a um tubo Tygon. Uma conexão em forma de “Y” foi ligada a outro tubo Tygon conectado a uma agulha afixada com o auxílio de uma fita crepe no centro superior das placas

de vidro do sanduíche. O gel foi então introduzido com o auxílio de um sistema de roda que empurrava o embolo das seringas, a uma velocidade constante, para a liberação das soluções de gel, formando assim um sistema de gradiente. Este processo não deve ultrapassar 10 minutos, uma vez que a montagem do gel deve terminar antes do início da polimerização do mesmo. Em seguida o pente foi colocado, sendo necessários 3 h para a polimerização do gel.

Na cuba de eletroforese foram colocados 7 L de tampão de corrida (TAE 1X), sendo então feito aquecimento do mesmo a 60°C por um tempo aproximado de 1,5 h.

Passados as 3 h de polimerização do gel, o pente foi removido gentilmente e o sanduíche de placas de vidro contendo o gel foi então colocado no tanque de eletroforese

As amostras foram aplicadas quando o tampão de corrida atingiu a temperatura de 60 °C, com o auxílio de um micropipetador e ponteiras de sequenciamento. As amostras aplicadas no gel com o gradiente foram as que confirmaram a qualidade do produto da amplificação do PCR no gel de agarose 2% m/v. No gel de gradiente de 45%-65%, foram aplicadas as amostras seguintes: dez 02, jan 03, mar 03, abr 03, mai 03, jun 03, jul 03, set 03, out 03, dez 03 e jan 04 e no gel de 40%-65% as amostras: dez 02, jan 03, mar 03, abr 03, mai 03, jun 03, jul 03, set 03, out 03, e jan 04. As amostras de set 02 e fev 03 foram perdidas.

Em um pedaço de parafilm foram misturados 2 µL de solução tampão de amostra (0,25 mL azul de bromofenol 0,05% m/v; 0,25 mL xileno cianol 0,05% m/v; 7,0 mL glicerol 70% v/v e 2,5 mL de água desionizada) e 3 µL de cada amostra coletada nos meses seguintes: abr 03, jun 03, set 03, dez 03 e jan 04; e um volume de 2 µL do tampão de amostra supramencionado com 4 µL de cada amostra coletada nos meses seguintes: dez 02, jan 03, mar 03, mai 03, jul 03 e out 03, no gel com o gradiente de 45%-65%. No gel com o gradiente de 40%-65%, foram aplicados 2 µL do tampão de amostra com 1 µL da amostra coletada em jan 03. Neste mesmo gel, foram aplicados 2 µL do tampão de amostra com 3 µL de cada amostra coletada nos meses seguintes: dez 02, mar 03, abr 03, jun 03, jul 03, set 03, out 03 e

jan 04. Finalmente, aplicaram-se 2 μL da solução tampão de amostra com 4 μL da amostra coletada em mai 03.

Para essa corrida de DGGE, foi aplicada uma corrente de 60 V por 15 horas em uma temperatura de 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados segundo o protocolo descrito por SANGUINETTI *et al.* (1994). Cuidadosamente, cada gel foi transferido para uma assadeira de vidro forrada com um plástico de polipropileno transparente, sendo então adicionado um volume suficiente de solução fixadora (etanol 10% v/v e ácido acético 0,5% v/v) para cobrir todo o gel. Após 3 minutos de encubação, essa solução é trocada pela segunda solução fixadora (etanol 10 %v/v, ácido acético 0,5 %v/v e nitrato de prata 0,2 % m/v), sendo a assadeira de vidro coberta com folha de alumínio. Após 20 min de incubação sob agitação constante, a segunda solução fixadora é retirada, sendo o gel lavado por 2 vezes com água desionizada, por 20 s. Em seguida, o gel foi incubado em uma solução reveladora (NaOH 3% m/v e formaldeído 0,5 %v/v) por aproximadamente 9 min ou até o aparecimento das bandas. Repetir a lavagem anterior, incubar o gel novamente na primeira solução fixadora por 5 min, seguido de lavagem com água destilada por 10 min. Finalmente, toda a água foi retirada da assadeira de vidro e o gel foi colocado no meio de duas transparências de acetato de celulose. A documentação foi feita com um “Scanner” e a foto analisada no computador. Esse gel pode ser preservado em lugar seco por até seis meses para recortar as bandas e seqüência-las.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e a discussão sobre a ocorrência, características, distribuição no corpo d'água das TEP em amostras de água coletadas no reservatório de Barra Bonita no período de julho de 2002 a janeiro de 2004 serão apresentados a seguir. Ademais, estudaram-se neste trabalho as TEP com bactérias aderidas, e os padrões de diversidade bacteriana presente nas TEP do Reservatório de Barra Bonita, empregando-se métodos moleculares como PCR (do inglês: Polymerase Chain Reaction) e DGGE (do inglês: Denature Gradient Gel Electrophoresis). Objetivando-se compreender a ocorrência e distribuição destas partículas de polissacarídeos no reservatório de Barra Bonita, foram também monitoradas no período supramencionado, algumas variáveis como: pH e temperatura.

As TEP podem ser definidas como partículas formadas por polissacarídeos ácidos e que podem se ligar ao corante Alcian Blue (SIMON *et al.*, 2002; PASSOW, 2002a). A eficiência dessa ligação depende da concentração hidrogeniônica da solução (pH) e dos grupos carboxílicos ($-\text{COO}^-$) e sulfatos ($-\text{O}-\text{SO}_3^-$) presentes nos polissacarídeos, para formar o par iônico mostrado na Figura 3.

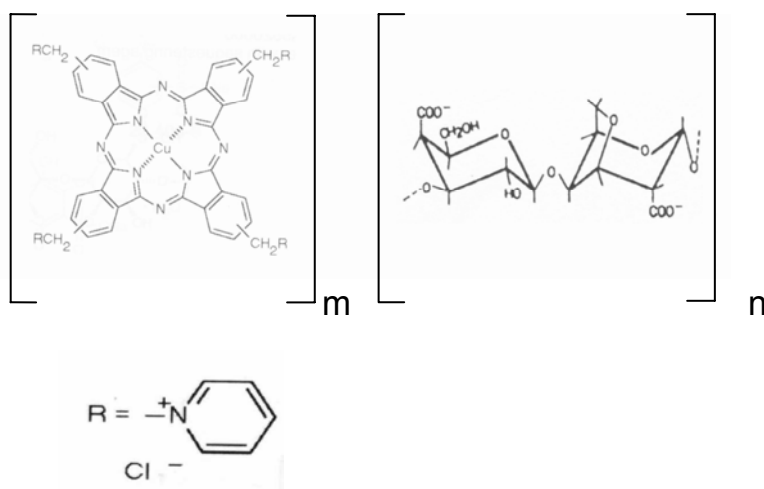


Figura 3 – Par iônico formado entre as TEP e o Alcian Blue.

5.1 Procedimento espectrofotométrico para determinar a concentração das TEP

Objetivando-se encontrar as melhores condições experimentais para determinar a concentração das TEP em águas naturais, um estudo sistemático e descrito na metodologia foi realizado. Neste estudo, foram investigados os reagentes cromogênicos Azul de toluidina, Azul de astra e Alcian Blue nas concentrações de 0,02%; 0,03%; 0,04%; 0,06%; 0,09%; 0,012% m/v e diversas soluções tampão (fosfato, ftalato e acetato) em diferentes valores de pH (2,5; 3,3; 4,0; 4,8 e 6,9), sendo então estabelecidas as melhores condições experimentais para a determinação das TEP nas amostras de água do reservatório de Barra Bonita. O melhor reagente cromogênico encontrado foi solução de Alcian Blue.

No estudo do efeito da concentração hidrogeniônica (pH) sobre o sinal analítico, soluções de tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ nos valores de pH 2,5; 3,3; 4,0; 4,8 e 6,9 foram empregadas. A Tabela 4 apresenta as equações matemáticas das curvas analíticas, r^2 , linearidade e os respectivos limites de detecção (três vezes o desvio padrão do branco/coeficiente angular da curva analítica). Nesse estudo, foram empregadas soluções de GX nas concentrações supramencionadas e solução de Alcian Blue $3,0 \times 10^{-3} \%$ m/v nas soluções tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de pH de 2,5 a 6,9.

Tabela 4 - Equações das curvas analíticas obtidas para solução de Alcian Blue $3,0 \times 10^{-3} \%$ m/v em diversos valores de pH em função da concentração de goma de xantana a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	Equação da curva analítica	r^2	Intervalo linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2,5	$A = 0,58 - 0,019 [\text{GX}]$	0,7816	1,8 – 8,0	1,5
3,3	$A = 0,62 - 0,020 [\text{GX}]$	0,9725	0,80 – 10,0	0,50
4,0	$A = 0,34 - 0,037 [\text{GX}]$	0,9999	0,50 – 10,0	0,10
4,8	$A = 0,24 - 0,027 [\text{GX}]$	0,9847	2,0 – 7,0	1,2
6,9	$A = 0,055 - 0,007 [\text{GX}]$	0,8154	0,50 – 2,5	0,40

LD = limite de detecção

Como pode ser observado nesta tabela, o maior intervalo linear encontrado foi de $0,50 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goma de xantana, a maior sensibilidade foi de $0,037$ e o menor limite de detecção (LD) foi igual a $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de goma de xantana, obtidos em pH 4. Sendo assim, esse valor de pH foi selecionado para ser utilizado nos estudos posteriores. Em seguida, o efeito dos tempos de agitação e de centrifugação sobre o sinal analítico foi também avaliado. Nesses estudos, tempos de agitação variando de 20 a 120 s e tempos de centrifugação de 20 a 40 min foram estudados. O melhor sinal analítico foi obtido para os tempos de agitação e centrifugação de 1 e 30 min, respectivamente. O efeito da concentração da solução de Alcian Blue no intervalo de concentração de $1,5 \times 10^{-3}$ a $9,0 \times 10^{-3} \%$ m/v para soluções de goma de xantana variando de $0,50$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a curva analítica é mostrado na Figura 4.

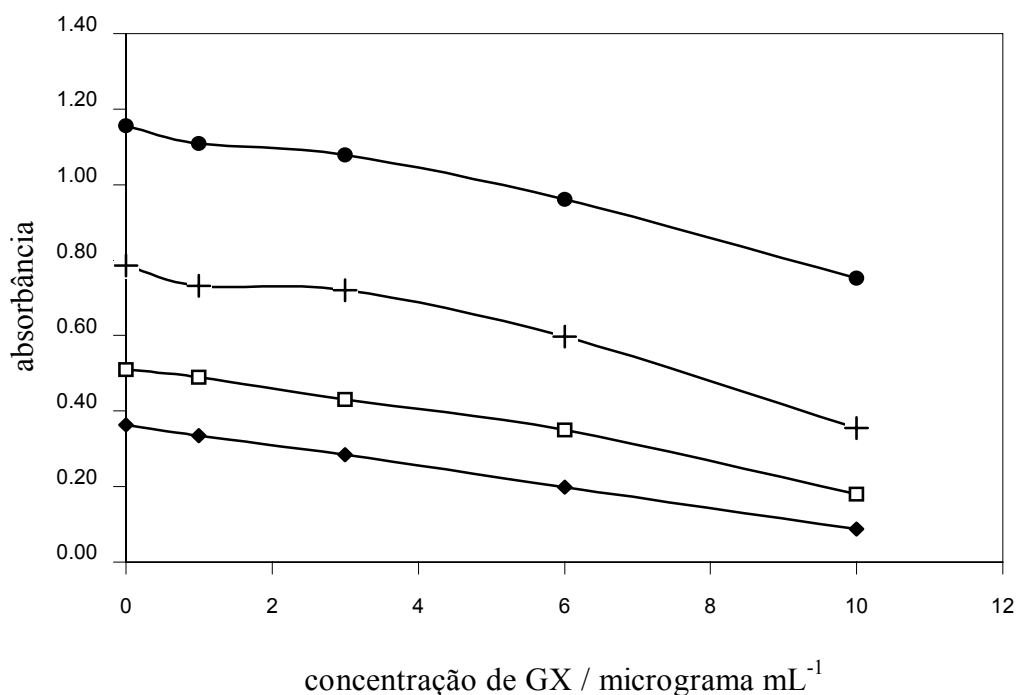


Figura 4 - Efeito da concentração da solução de Alcian Blue (\blacklozenge : $1,5 \times 10^{-3}$; \square : $3,0 \times 10^{-3}$; $+$: $6,0 \times 10^{-3}$ e \bullet : $9,0 \times 10^{-3} \%$ m/v) sobre a curva analítica para soluções de goma de xantana variando de $0,50$ a $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH igual a 4,0 e a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A sensibilidade (inclinação da curva analítica) aumentou com o aumento da concentração de Alcian Blue até $3,0 \times 10^{-3}$ % m/v e, para concentrações maiores desse reagente cromogênico, a sensibilidade foi praticamente constante. Ademais, a melhor repetibilidade e maior linearidade da curva analítica (Tabela 4 e Figura 4) foram obtidas nessa concentração da solução de Alcian Blue, sendo assim selecionada para o desenvolvimento do método.

No estudo da possível interferência da solução de azida de sódio empregada para a preservação das amostras sobre o sinal analítico, foi utilizada uma concentração desse reagente 10 vezes maior que a concentração da solução de goma de xantana e não foi observada nenhuma variação de absorvância, indicando assim ausência de interferência da azida de sódio nesse método espectrofotométrico.

A Tabela 5 apresenta os resultados do estudo de adição e recuperação de goma de xantana nas concentrações de 0,100; 0,300; 0,400; 0,500 e 0,600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para duas amostras de água natural (amostras A e B), provenientes do reservatório de Barra Bonita e que foram previamente filtradas no filtrador tangencial. Recuperações variando de 95,3 a 108% de goma de xantana (número de amostras, $n = 3$) foram obtidas, indicando assim ausência de interferência da matriz dessas amostras sobre o método espectrofotométrico proposto.

Tabela 5 – Eficiência de recuperações (em triplicata) de goma de xantana em duas amostras de água natural.

Amostra	GX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
A	0,100	0,100	100
	0,300	0,286	95,3
	0,400	0,433	108
	0,500	0,505	101
B	2,00	2,09	104
	4,00	4,20	105
	6,00	5,92	98,6

n = número de amostras (n = 3)

No estudo da repetibilidade do método espectrofotométrico, desvios padrões relativos (RSD) menores que 0,8% para soluções de goma de xantana nas concentrações de 1,0 e 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram obtidos (n=8).

Empregando-se as melhores condições experimentais estabelecidas nos estudos anteriores (pH = 4; concentração da solução de Alcian Blue = $3,0 \times 10^{-3}$ % m/v (concentração final), a curva analítica obtida apresentou linearidade no intervalo de concentração de goma de xantana de 0,50 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($A = 0,34 - 0,037 [GX]$; $r^2 = 0,9999$, onde A representa a absorbância e [GX] a concentração de goma de xantana em $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um limite de detecção (LD) de 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A exatidão do método espectrofotométrico desenvolvido foi então verificada analisando-se 5 amostras de água natural do reservatório de Barra Bonita (amostras filtradas e concentradas 5 vezes). Neste estudo as concentrações das TEP obtidas em cada amostra foram comparadas com aquelas obtidas empregando-se o método de PASSOW & ALLDREDGE (1995), adotado como método de referência (Tabela 6).

Tabela 6 - Determinação dos teores das TEP em águas naturais do reservatório de Barra Bonita, empregando-se o método espectrofotométrico proposto e o de referência (PASSOW & ALLDREDGE, 1995).

Amostra	TEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Erro relativo (%)
	Método Referência	Método Espectrofotométrico	
A	$0,24 \pm 0,09$	$0,26 \pm 0,03$	7,7
B	$0,40 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,01$	-5,2
C	$0,32 \pm 0,09$	$0,35 \pm 0,02$	8,6
D	$0,35 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,02$	-5,4
E	$0,24 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,01$	4,0

n = 3

Aplicando-se o test *t* pareado, não foi encontrada diferença significativa entre os resultados encontrados utilizando-se os dois métodos analíticos a um nível de confiança de 95%. Observa-se também que os coeficientes de variação (CVs) foram muito maiores nos teores de TEP encontrados nas amostras quando se empregou o método proposto por PASSOW & ALLDREDGE (1995), indicando assim uma menor precisão desse método.

A determinação da concentração das TEP em amostras de águas naturais foi tremendamente simplificada pela utilização do procedimento espectrofotométrico proposto no presente estudo (FATIBELLO *et al.*, 2004). Este procedimento espectrofotométrico se mostrou útil na determinação da concentração das TEP envolvendo um número elevado de amostras, devido a sua simplicidade e velocidade analítica, além do mesmo apresentar melhor exatidão e precisão.

5.2 Quantificação e caracterização das TEP por microscopia de campo claro

TEP são partículas individuais que podem ser observadas ao microscópio após tingimento com o corante Alcian Blue. Para tal, lâminas foram preparadas como descrito anteriormente na metodologia (no item 4.7 Enumeração das TEP por microscopia de campo

claro), para cada amostra coletada no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. Como descrito na metodologia, foram preparadas duas lâminas de cada uma das 85 amostras, sendo fotografados randomicamente 20 campos em cada uma das lâminas.

A Figura 5 apresenta duas fotos obtidas de um mesmo campo sem e com o emprego de filtro laranja. Como pode ser observado nesta figura, o uso do filtro laranja sob a fonte de luz do microscópio, possibilitou visualizar as TEP com maior nitidez, uma vez que as TEP em verde escuro foram destacadas do fundo esverdeado, tornando assim possíveis a contagem e medidas das áreas das mesmas.

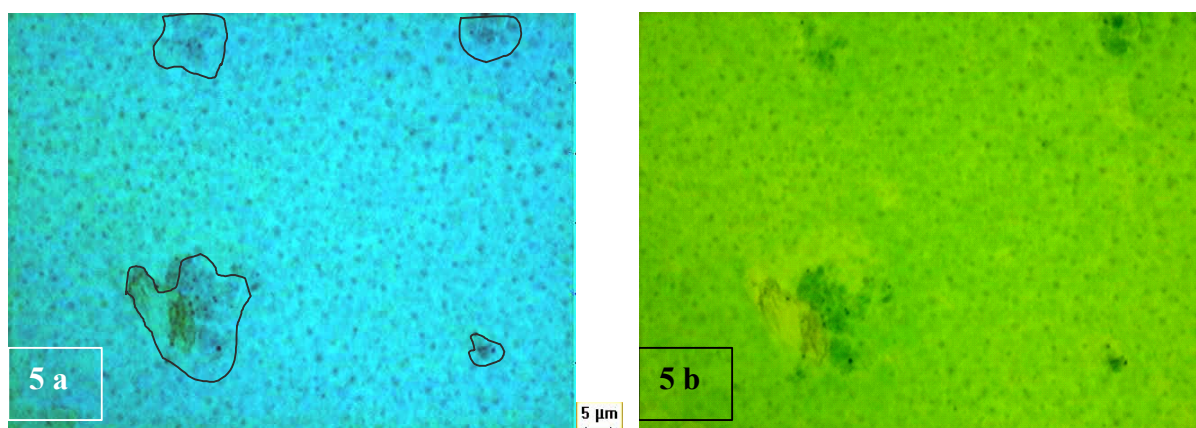


Figura 5 – Fotomicrografias das TEP, tingidas com o corante Alcian Blue e oriundas do reservatório de Barra Bonita, SP. Obtidas um mesmo campo (a) sem o filtro laranja e (b) com o filtro laranja, microscopia de campo claro (aumento 400 x).

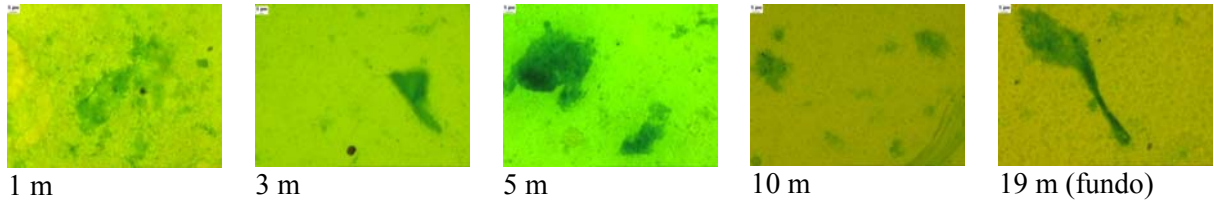
De um total de 3400 fotomicrografias registradas utilizando a técnica de microscopia de campo claro, foram selecionadas algumas das mais significativas para serem apresentadas, objetivando mostrar a diversidade de formas das TEP. A Figura 6 apresenta as fotomicrografias obtidas das TEP, utilizando microscopia de campo claro, aumento de 400X, das amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m, 3 m, 5 m, 10 m e fundo.

Como pode ser observado nessas fotos, o aspecto e/ou formas das TEP são diversificados. As TEP podem apresentar forma esférica, como as registradas e mostradas nas fotomicrografias de outubro de 2002 – 16 m; novembro de 2002 - 1m, abril de 2003 – 3 m, junho de 2003 – 1 m e outubro de 2003 – 5 m. Também foram obtidos registros das TEP na

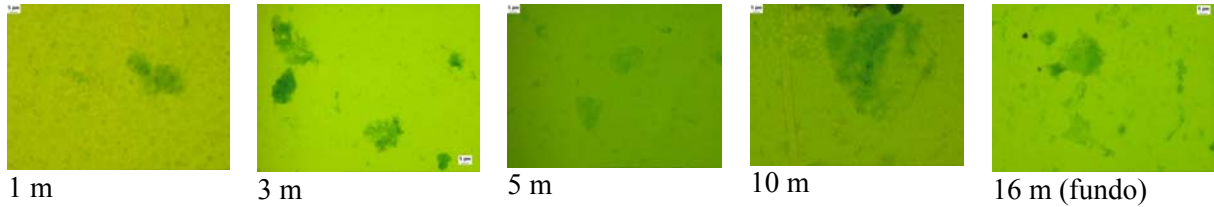
forma de “nuvem” como apresentado nas fotomicrografias de novembro de 2002 a 3 m e 5 m e de setembro de 2003 a 10 m. Podem aparecer ainda na forma de fibras que aqui estão registradas nas fotomicrografias de janeiro de 2003 a 16 m, de novembro de 2003 a 1m e de janeiro de 2004 a 1 m, 5 m e 10 m. Ainda, outras partículas se apresentam na forma retangular, como as registradas nas fotomicrografias de outubro de 2003 – 1 m e de dezembro de 2003 – 3 m. Ademais, há outras partículas que se assemelham a um “rendado”, como as registradas nas fotomicrografias de fevereiro de 2003 – 10 m e 18 m e de março de 2003 – 10 m e 16 m. Finalmente, há registro de partículas com formas mais irregulares, como as registradas nas fotomicrografias de setembro de 2003 – 18 m, de dezembro de 2003 – 10 m e maio de 2003 – 10 m.

Como pode ser observado na Figura 6, há uma diferença na intensidade da coloração das partículas tingidas com o Alcian Blue, sendo atribuída às características físico-químicas das TEP como o número de grupos carboxílicos e sulfatos presentes nos biopolímeros que as formam. Ademais, partículas e/ou espécies químicas inorgânicas e orgânicas aderidas às TEP podem afetar a tonalidade da cor resultante após o tingimento. Na fotomicrografia correspondente ao mês de dezembro de 2003 a 5 m (ver Figura 6), as TEP apresentam áreas equivalentes e com intensidade de cor diferente, sugerindo assim um grau diferenciado de tingimento das partículas. Há também situações em que as partículas não são tingidas por igual, como é o caso das TEP registradas na fotomicrografia correspondente a dezembro de 2002 - fundo. A TEP apresentou intensa cor na superfície, estando sua região central sem cor. A fotomicrografia da amostra de outubro de 2002 - 10 m registraram TEP onde o corante Alcian Blue tingiu apenas uma região lateral da partícula. As fotomicrografias registradas nas diferentes profundidades (1 m, 3 m, 5 m, 10 m e 15,5 m), do mês de novembro de 2002, mostram TEP com intenso tingimento (alta intensidade de cor), já as fotomicrografias do mês de novembro de 2003, nestas mesmas profundidades, apresentam TEP com baixa intensidade de cor, tornando difícil a visualização dessas partículas.

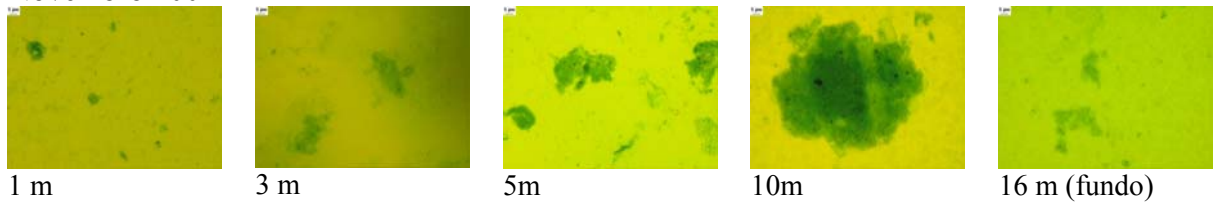
Setembro 2002



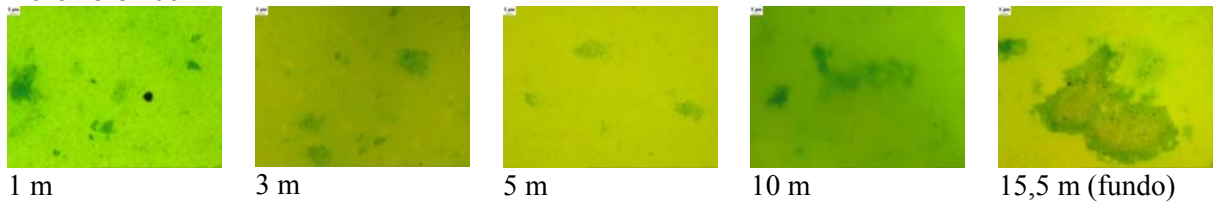
Outubro 2002



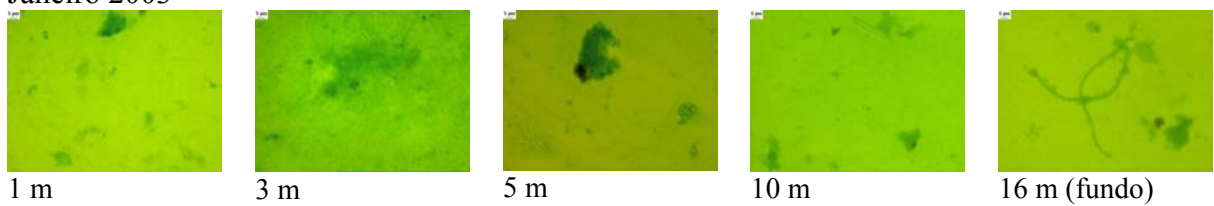
Novembro 2002



Dezembro 2002



Janeiro 2003



Fevereiro 2003

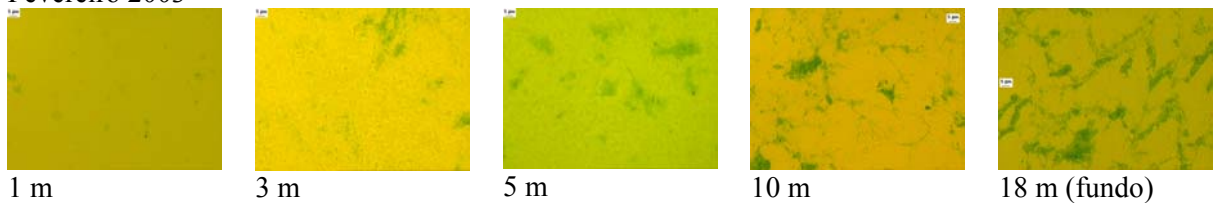
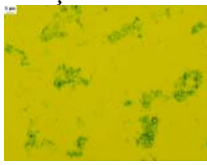
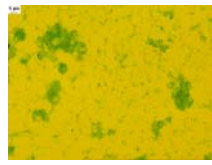


Figura 6 - Fotomicrografias das TEP tingidas com o corante Alcian Blue, provenientes do reservatório de Barra Bonita, SP., coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004, nas profundidades de 1 m, 3 m, 5 m, 10 m e fundo, obtidas por microscopia de campo claro utilizando o filtro laranja e com aumento de 400X.

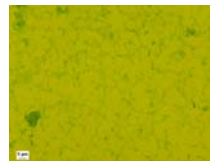
Março 2003



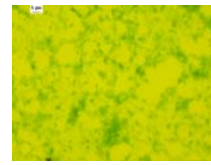
1 m



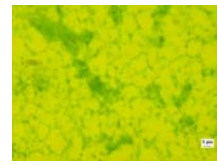
3 m



5 m



10 m

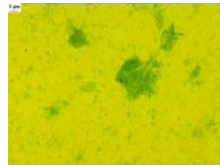


16 m (fundo)

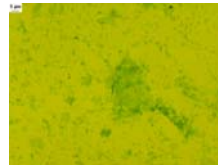
Abril 2003



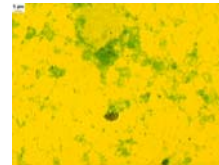
1 m



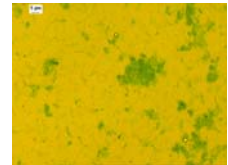
3 m



5 m

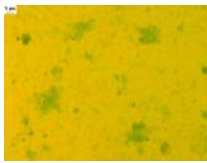


10 m

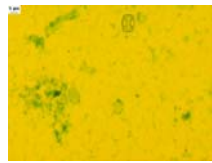


20 m (fundo)

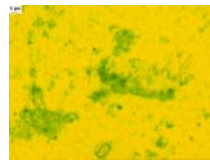
Maio 2003



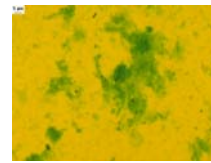
1 m



3 m



5 m

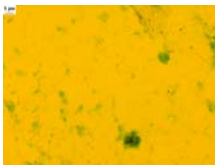


10 m



18,5 m (fundo)

Junho 2003



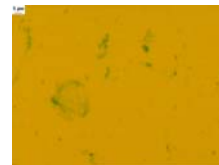
1 m



3 m



5 m



10 m



19 m (fundo)

Julho 2003



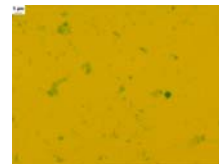
1 m



3 m



5 m

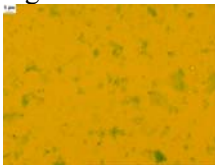


10 m



18 m (fundo)

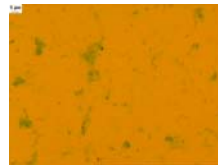
Agosto 2003



1 m



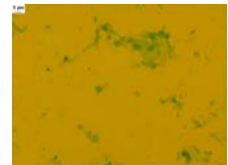
3 m



5 m

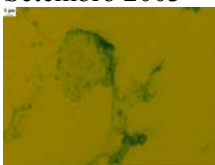


10 m

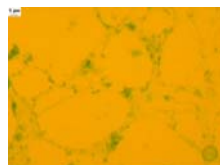


18 m (fundo)

Setembro 2003



1 m



3 m



5 m



10 m



18 m (fundo)

Figura 6 - continuação

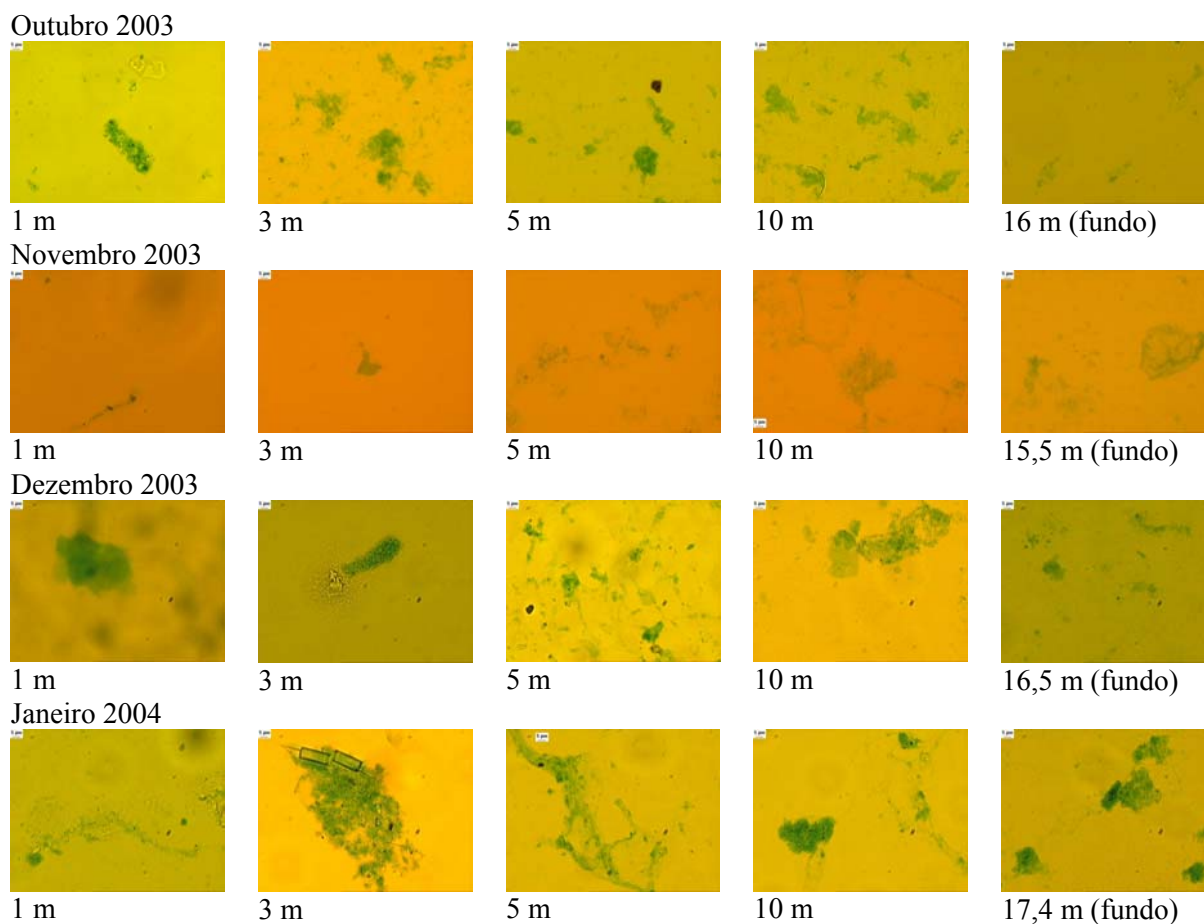


Figura 6 - continuação

No início da formação das TEP, esses biopolímeros apresentam aparência gelatinosa, como pode ser observado na fotomicrografia correspondente ao mês de setembro de 2003 – 10 m. No entanto, devido à sua característica pegajosa (ENGEL, 2000; SIMON, *et al.*, 2002; PASSOW, 2002a), fragmentos ou parte de células podem aderir às TEP, como pode ser observado na fotomicrografia de janeiro de 2004 – 3 m; no caso pode-se observar partes de uma *Aulacoseira granulata*. As TEP também podem agregar partículas inorgânicas (fotomicrografia de janeiro de 2003 – 5 m) e bactérias. A adesão e/ou colonização das TEP por bactérias serão tratados no item 5.7 Colonização das TEP por bactérias, pág. 90.

As TEP são consideradas microagregados (SIMON, *et al.*, 2002), uma vez que agregam partículas inorgânicas e orgânicas, restos de células e bactérias, podendo também servir de matriz para a formação de macroagregado que é conhecido como “lake snow”. A

Figura 7 (a, b e c); retrata macroagregados observados durante este estudo sobre a caracterização das TEP no reservatório de Barra Bonita, SP, onde a matriz gelatinosa tingida de azul por Alcian Blue e com as características morfológicas idênticas às TEP, têm adesão de microalgas (*e. g. Cyclotella* sp e *Aulacoseira granulata*), resto de células e partículas inorgânicas (pontos ou manchas em preto).

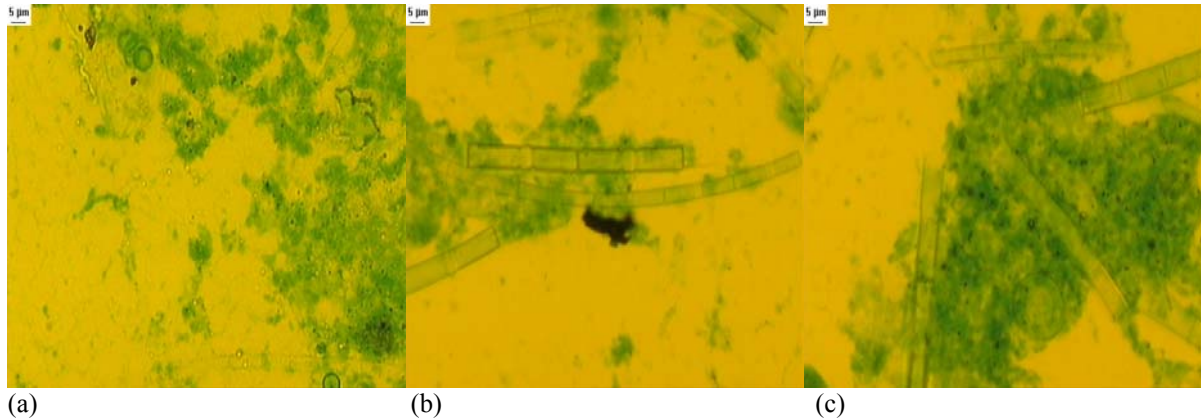


Figura 7 – Fotomicrografia de agregados (a) uma matriz gelatinosa com adesão de algumas células de *Cyclotella* sp, (b) e (c) matriz gelatinosa que é tingida com Alcian Blue formando um macroagregado, com muitas células de *Aulacoseira granulata* (aumento de 400X), oriundas do reservatório de Barra Bonita, SP.

5.3 Relação das TEP com o fitoplâncton presente no reservatório de Barra Bonita

A discussão sobre a composição da comunidade fitoplanctônica é importante, pois a concentração das TEP *in situ* é comumente associada com a fluorescência do fitoplâncton, especialmente quando há domínio de diatomáceas (PASSOW *et al.* 1994, MARI & KIØRBOE, 1996). Além disso, coexistência de uma população dominante de diatomáceas com outro organismo pode aumentar a concentração das TEP, como foi observado durante um “bloom” de dinoflagelados (PASSOW & ALLDREDGE, 1994). Investigações com águas de lago sugerem que muitos gêneros de outros grupos (*eg* cianobactérias como: *Microcystis* sp, *Anabaena* sp, *Planktotrix* sp) de fitoplâncton podem gerar TEP (GROSSART *et al.*, 1997).

Experimentos com diferentes espécies de fitoplâncton (*eg*: dinoflagelados, clorofíceas) têm sido conduzidos para esclarecer a variabilidade da produção das TEP entre

espécies distintas de diatomáceas e entre espécies de outros grupos algais (cianobactérias). Em culturas não axênicas de algas e de bactérias, onde a concentração das TEP foi determinada, foi encontrada uma boa correlação entre as TEP e o fitoplâncton, indicando assim que as TEP são geradas principalmente pelo fitoplâncton dominante. A taxa de produção das TEP é específica para cada espécie e depende do estado fisiológico das células bem como das condições ambientais (PASSOW, 2002a).

A Tabela 7 apresenta algumas das espécies de microalgas fitoplanctônicas visualizadas durante as observações ao microscópio, por microscopia de campo claro, das amostras coletadas no período em estudo (setembro de 2002 a janeiro de 2004). Nesta tabela figuram os gêneros de algas que foram observadas em pelo menos cinco campos distintos em todas as lâminas preparadas. Uma vez que não foram feitas as contagens destas populações, não se pode inferir sobre a dominância ou mesmo abundância desses gêneros. No entanto alguns gêneros como: *Microcystis* sp, *Anabaena* sp, *Aulacoseira* sp e *Cyclotella* sp, foram observados em todas as amostras de água coletadas e em todas as lâminas investigadas. A Figura 8 mostra as fotomicrografias das microalgas planctônicas que foram visualizadas com mais frequência durante o presente trabalho.

VIEIRA & GIROLDO (2005) demonstraram em estudo recente que uma cultura de *Aulacoseira granulata* provenientes do reservatório de Barra Bonita pode contribuir de forma significativa na formação de agregados naturais pela liberação de polissacarídeos extracelulares. Esses autores também verificaram a dominância daquela diatomácea no fitoplâncton desse reservatório, corroborando assim com os resultados encontrados neste trabalho.

GIROLDO *et al* (2005) também estudando outra comunidade de microalgas fitoplanctônica (*Cryptomonas tetrapyrenoidosa*) observaram que polissacarídeos extracelulares liberados devem participar da formação de agregados. No presente trabalho,

essas microalgas foram observadas nos meses de setembro e outubro de 2002, fevereiro, março, julho e setembro de 2003.

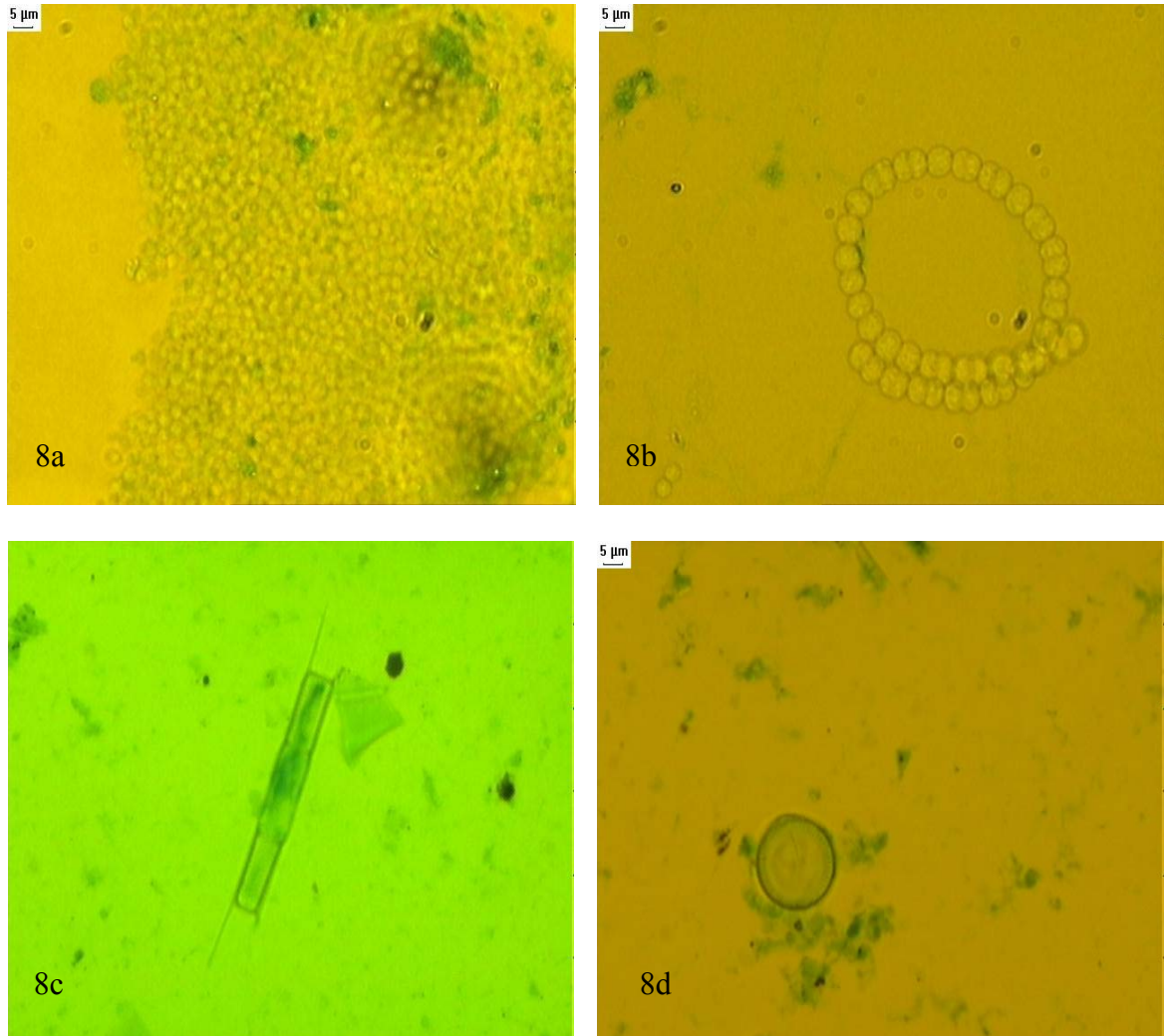


Figura 8 - Fotomicrografias das microalgas, registradas na microscopia de luz clara (aumento 400 vezes), (a) *Microcystis* sp, (b) *Anabaena* sp, (c) *Aulacoseira* sp e (d) *Cyclotella* sp. Amostras provenientes do reservatório de Barra Bonita, SP.

Tabela 7 – Gêneros de algas encontrados aderidos às TEP na água do reservatório de Barra Bonita, SP. e observados durante a microscopia de campo claro.

	Set-02	Out-02	Nov-02	Dez-02	Jan-03	Fev-03	Mar-03	Abr-03	Mai-03	Jun-03	Jul-03	Ago-03	Set-03	Out-03	Nov-03	Dez-03	Jan-04
Cyanophyceae																	
Células livres de <i>Microcystis</i> sp	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Microcystis</i> sp (colônias)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Anabaena</i> sp	x	x			x	x		x	x			x				x	x
<i>Planktothrix</i> sp		x		x	x	x		x			x					x	
<i>Cylindrospermopsis</i> sp					x	x											
<i>Pseudoanabaena</i> sp						x	x										
<i>Coelomoron</i> sp		x												x			x
Bacillariophyceae																	
<i>Aulacoseira</i> sp	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Cyclotella</i> sp	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Navicula</i> sp														x	x		
Zygnematophyceae																	
<i>Staurastrum</i> sp	x																
Chlorophyceae																	
<i>Actinastrum</i> sp	x	x			x	x											
Cryptophyceae																	
<i>Cryptomonas</i> sp	x	x				x	x				x		x				

A Figura 9, cedida pela doutoranda Maria José Dellamano de Oliveira, mostra as espécies de algas fitoplanctônicas dominantes no plâncton do reservatório de Barra Bonita. Essas análises foram feitas utilizando a mesma amostra de água coletada, durante o período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Observando esse gráfico pode-se concluir que houve uma dominância de células livres de *Microcystis* sp e *Microcystis aeruginosa*, indicando “blooms” dessas espécies nos meses de agosto e outubro de 2002, fevereiro, março e abril de 2003 e agosto e setembro de 2003. A outra espécie abundante, a *Aulacoseira granulata*, teve quantificações expressivas nos meses de agosto e novembro de 2002, março, abril, maio, junho e agosto de 2003 e janeiro de 2004.

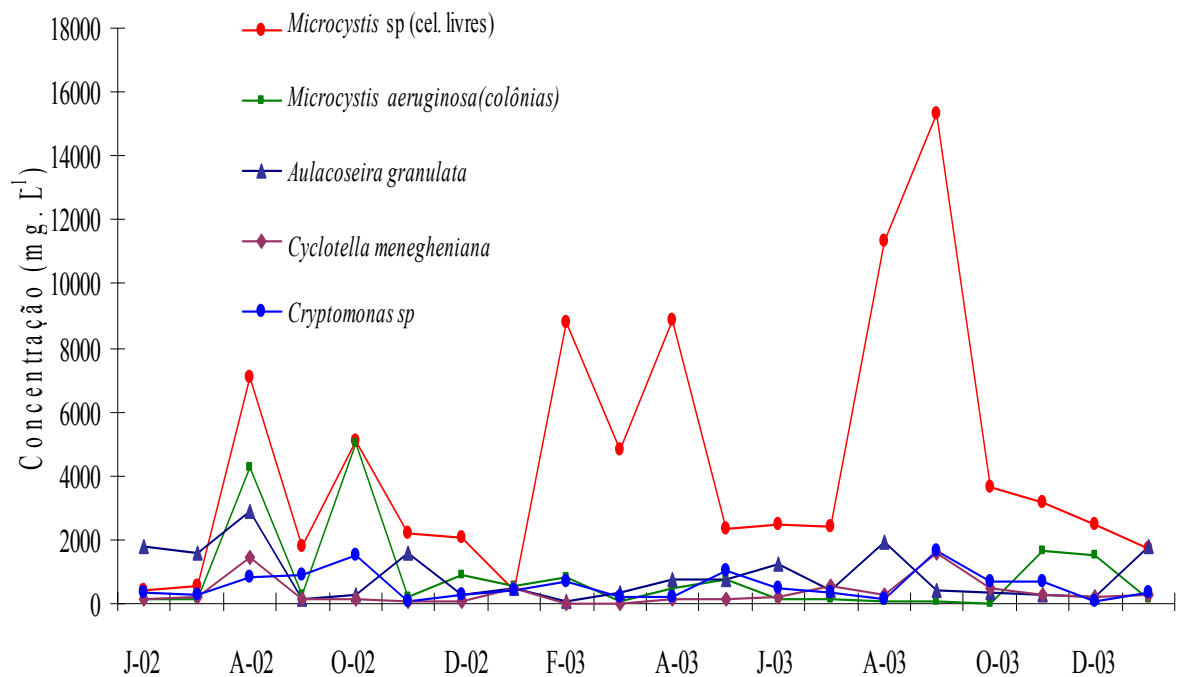


Figura 9 - Variação sazonal das espécies fitoplanctônicas dominantes, na água do reservatório de Barra Bonita no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Fonte: doutoranda Maria José Dellamano de Oliveira.

A quantidade mais expressiva de algas fitoplanctônicas foi determinada em setembro de 2003 (Células livres de *Microcystis* sp $1,5 \times 10^4$, *Cryptomonas* sp $1,7 \times 10^3$ e *Cyclotella* sp $1,7 \times 10^3$). No mês de agosto de 2002 foram encontradas varias espécies abundantes, com densidade de células de $7,08 \times 10^3$ em células livres de *Microcystis* sp; de $4,28 \times 10^3$ em *Microcystis aeruginosa*; de $2,9 \times 10^3$ em *Aulacoseira granulata* e de $1,4 \times 10^3$ em *Cyclotella* sp.

Em outubro de 2002 a densidade de células de *Microcystis* sp e *Microcystis aeruginosa* foi de $5,29 \times 10^3$ respectivamente. Também foram constatados “blooms” de cianofíceas principalmente *Microcystis* sp, nos meses de agosto e outubro de 2002 e durante todo o ano de 2003, onde foram constatados picos de abundância desse gênero de microalgas, nos meses de fevereiro, abril, agosto e setembro. As diatomáceas (*Aulacoseira granulata* e *Cyclotella* sp) foram abundantes em agosto de 2002 e novembro de 2002 e em 2003 nos meses de junho, agosto e setembro e em janeiro de 2004.

5.4 Distribuição sazonal das TEP

A distribuição sazonal das TEP foi estudada no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e é apresentada na Figura 10. As concentrações das TEP em equivalentes de goma de xantana (equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$) estão apresentadas na primeira coluna (Figura 10A) e foram determinadas empregando-se o procedimento espectrofotométrico desenvolvido neste trabalho (FATIBELLO *et al.*, 2004). Na coluna à direita da Figura 10B, são apresentadas as concentrações das TEP (em números de TEP 10^4 mL^{-1}) determinadas por microscopia de campo claro, conforme descrito no item 4.7 (página 26).

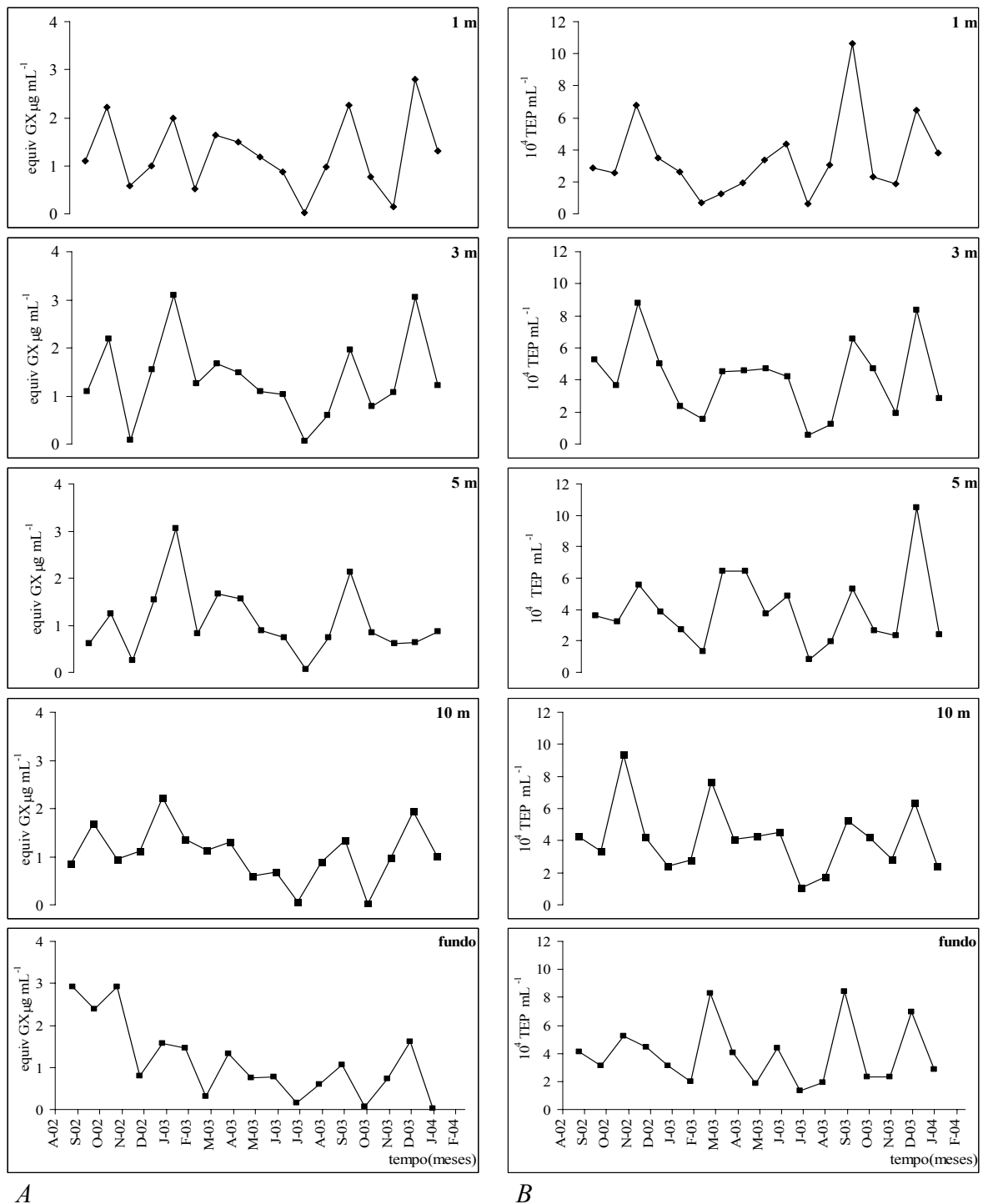


Figura 10 – Concentrações das TEP obtidas pelo emprego das duas diferentes metodologias (A) espectrofotometria e (B) microscopia de campo claro.

Uma comparação direta dos resultados encontrados empregando-se estes dois procedimentos deve levar em consideração que em ambos os métodos foram empregados o Alcian Blue como reagente. No método espectrofotométrico (FATIBELLO *et al.* 2004), após

a reação das TEP com esse corante, o par-iônico insolúvel é separado e, o excesso de Alcian Blue foi determinado em 602 nm. No segundo procedimento, após o tingimento das partículas com o Alcian Blue, as TEP foram contadas empregando-se microscopia de campo claro e os campos foram selecionados randomicamente.

As concentrações das TEP variaram de 0,02 – 3,10 (equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$). As maiores concentrações das TEP encontradas nas diferentes profundidade da coluna d'água foram a 1 m em dezembro de 2003 (2,8 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), a 3 m em janeiro de 2003 (3,10 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), a 5 m em janeiro de 2003 (3,06 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), a 10 m em dezembro de 2003 (1,94 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$) e no fundo em novembro de 2002 (2,93 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$). Por outro lado, as menores concentrações das TEP foram determinadas no mês de julho de 2003, nas profundidades de 1 m (0,02 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$); 3 m e 10 m (0,06 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), a 5 m (0,05 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$) e no fundo no mês de janeiro de 2004 (0,03 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$). As concentrações médias registradas durante o período em estudo (setembro de 2002 a janeiro de 2004) quase não mostraram variação e foram: a 1 m - 1,23 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$; a 3 m - 1,37 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$; a 5 m e 10 m - 1,07 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e no fundo 1,14 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A pequena variação das concentrações média das TEP determinadas durante o período de 17 meses, pode ser atribuída à natureza polimítica desse reservatório, cujo corpo d'água, que é raso e exposto ao vento, pode em curtos intervalos de tempo, apresentar estratificação térmica, ser homogeneizado pelo vento, restabelecer a estratificação, desestratificar novamente e assim por diante.

Como não há registro na literatura das variações das concentrações das TEP em água doce, empregando-se o procedimento espectrofotométrico, uma comparação dos resultados encontrados neste trabalho será feita com os resultados encontrados em trabalhos publicados na literatura referentes às concentrações das TEP em água do mar.

As variações das concentrações das TEP encontrados no reservatório de Barra Bonita estão em boa concordância com aquelas encontradas em água do mar descritos na literatura. Empregando-se o procedimento espectrofotométrico descrito por PASSOW & ALLDREDGE (1994), PASSOW *et al* (2001) encontraram teores das TEP variando de 0,21 a 1,05 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas águas do oceano Pacífico, região costeira da Califórnia, EUA.

RAMAIAH *et al* (2005) determinaram concentrações das TEP variando de 0,90 a 1,89 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ no Subártico, Japão. Esses pesquisadores também empregaram o procedimento espectrofotométrico proposto por PASSOW & ALLDREDGE (1994). Uma concentração média das TEP de $0,036 \pm 0,013$ equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi determinada por ENGEL & PASSOW (2001) em amostras de água de mar do Oceano Atlântico. Teores das TEP variando de 0,14 a 0,33 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ na água do Mar Báltico foram determinadas por ENGEL *et al* (2002b), empregando-se o procedimento espectrofotométrico supramencionado.

Em outro estudo, PASSOW (2002) determinou concentrações das TEP variando de 0,03 a 0,30 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ no Canal de Santa Bárbara, Oceano Pacífico, deve-se ressaltar que não há dados conclusivos sobre influência da salinidade na formação e/ou concentração das TEP.

AZETSU-SCOTT & PASSOW (2004) em experimentos realizados utilizando água proveniente do Canal de Santa Bárbara, Oceano Pacífico, nos meses de março, abril e maio de 1997 e nas profundidades de 1 m, 10 m e 20 m, encontraram uma variação na concentração das TEP de 0,13 - 0,29 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nas determinações das concentrações das TEP, esses pesquisadores também empregaram a metodologia proposta por PASSOW & ALLDREDGE (1994).

MARI *et al* (2005) monitoraram um “bloom” de *Phaeocystis globosa* em um mesocosmo contendo água natural proveniente do Mar do Norte e registraram uma variação

na concentração das TEP de 0,06 a 1,5 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar de serem amostras de natureza distinta, estes teores das TEP encontrados no presente estudo e aqueles reportados na literatura sugerem que as concentrações das TEP em corpos d'água naturais, apesar de variarem com a profundidade, tais variações ocorrem em uma escala surpreendentemente similar, quando são utilizados métodos espectrofotométricos.

A outra metodologia utilizada na determinação da concentração das TEP no reservatório de Barra Bonita foi a microscopia de campo claro e as concentrações determinadas no período em estudo variaram de $5,40 \times 10^3$ a $1,06 \times 10^5$ partículas mL^{-1} . Quase não houve variação pronunciada nas médias sazonais obtidas durante este estudo e os valores encontrados foram a 1 m, de $3,44 \times 10^4$ partículas mL^{-1} ; a 3 m, de $4,17 \times 10^4$ partículas mL^{-1} ; a 5 m, de $3,98 \times 10^4$ partículas mL^{-1} ; a 10 m, de $4,16 \times 10^4$ partículas mL^{-1} e fundo $3,92 \times 10^4$ partículas mL^{-1} .

As menores abundâncias de partículas determinadas foram de: a 1 m, $5,95 \times 10^3$ partículas mL^{-1} ; a 3 m, $5,40 \times 10^3$ partículas mL^{-1} ; a 5 m, $8,10 \times 10^3$ partículas mL^{-1} ; a 10 m, $1,03 \times 10^4$ partículas mL^{-1} e no fundo $1,35 \times 10^4$ partículas mL^{-1} , todas registradas no mês de julho de 2003 e as maiores abundâncias de partículas foram: a 1 m ($1,06 \times 10^5$ partículas mL^{-1}) e no fundo ($8,39 \times 10^4$ partículas mL^{-1}) no mês de setembro de 2003, a 3 m ($8,77 \times 10^4$ partículas mL^{-1}) e a 10 m ($9,34 \times 10^4$ partículas mL^{-1}) no mês de novembro de 2002 e a 5 m ($1,04 \times 10^5$ partículas mL^{-1}), no mês de dezembro de 2003.

A Tabela 8 mostra alguns resultados de abundâncias de partículas em número de partículas mL^{-1} determinadas por diversos pesquisadores em águas naturais de diversas localidades, com variações das concentrações similares às obtidas neste trabalho.

Nesses estudos, as abundâncias apresentadas correspondem à variação do número de partículas registradas (menores e maiores concentrações) em diferentes ambientes, não sendo feita qualquer correlação da abundância das mesmas com a profundidade.

Tabela 8 - Abundância das TEP (número de partículas mL⁻¹) em águas naturais

Local	Prof (m)	Varição do n ^o de partículas mL ⁻¹	Referências
Lago Constance (Alemanha)	5-25	5,0 x 10 ³ – 1,5 x 10 ⁶	GROSSART <i>et al.</i> (1997)
Lago Constance	6-100	7,1 x 10 ⁴ – 2,6 x 10 ⁶	BRACHVOGEL <i>et al.</i> (2001)
Lago Kinneret (Israel)	15-35	1,0 x 10 ⁵ – 7,0 x 10 ⁶	GROSSART <i>et al.</i> (1998)
Lago Kinneret	1-38	4,4 x 10 ⁵ – 2,5 x 10 ⁷	BERMAN & VINER-MOZZINI (2001)
Frederiksborg (Dinamarca)	Slottso 0,5	8,4 x 10 ⁷ – 8,7 x 10 ⁸	WORM & SØNDERGAARD (1998)
Califórnia (sul) (EUA)	10	2,8 x 10 ⁴ – 4,0 x 10 ⁵	ALLDREDGE <i>et al.</i> (1993)
Baía de Monterey (EUA)	5-100	1,5 x 10 ⁵ – 4,9 x 10 ⁶	ALLDREDGE <i>et al.</i> (1993)
Baía de Monterey	5-76	2,5 x 10 ⁵ – 5,2 x 10 ⁶	PASSOW & ALLDREDGE (1994).
Califórnia (sul) (EUA)	10	2,5 x 10 ⁴ – 6,3 x 10 ⁵	PASSOW & ALLDREDGE (1994).
Kattegat (Dinamarca)	0-25	3,0 x 10 ⁶ – 6,0 x 10 ⁷	MARI & KIØRBOE (1996)
Mar Adriático	0-15	<1,0 x 10 ³ – 6,0 x 10 ⁵	SCHUSTER & HERNDL (1995)
Mar Mediterrâneo	0-40	1,0 x 10 ⁴ – 2,2 x 10 ⁵	MARI <i>et al.</i> (2001)
Mar Mediterrâneo	5-130	2,0 x 10 ⁴ – 2,2 x 10 ⁵	BEAUVAIS <i>et al.</i> (2003)
Mar Báltico	0-9	6,0 x 10 ⁴ – 1,3 x 10 ⁵	ENGEL <i>et al.</i> (2002)
Lago Pavin (França)	1-30	6,0 x 10 ⁴ – 5,8 x 10 ⁵	CARRIAS <i>et al.</i> (2002)
Lago Aydat (França)	1-30	1,3 x 10 ⁶ – 2,6 x 10 ⁶	CARRIAS <i>et al.</i> (2002)
Reservatório de Barra Bonita, SP (Brasil)	1-20	5,4 x 10 ³ – 1,06 x 10 ⁵	presente estudo

A abundância das TEP encontradas neste trabalho para as amostras de água do reservatório de Barra Bonita, está de acordo com os valores de abundâncias das TEP determinados em diversos ambientes aquáticos e mostrados na Tabela 8.

A Figura 11a é uma reprodução da Figura 9, que foi incorporada à Figura 11 para melhor visualização das comparações entre as variações das concentrações de TEP com as populações fitoplanctônicas dominantes nas correspondentes datas.

As Figuras 11b e 12a apresentam a variação das concentrações médias das TEP em equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($\text{TEP}_{\text{espectr}}$) (Figura 11b) e em partículas mL^{-1} ($\text{TEP}_{\text{microsc}}$) (Figura 12) das amostras de água coletadas nas diferentes profundidades, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004, e obtidas empregando-se as duas metodologias apresentadas anteriormente.

As Figuras 11c e 12b mostram respectivamente os teores das $\text{TEP}_{\text{espectr}}$ e os teores $\text{TEP}_{\text{microsc}}$ e os desvios padrões obtidos para as amostras de água no período estudado. Como pode ser observado na Figura 11c o teor médio de TEP determinado foi de 1,22 equiv de GX mL^{-1} sendo que o intervalo de confiança de $\pm 50\%$. Para estas condições estabelecidas, pode-se observar que apenas a concentração correspondente ao mês de julho de 2003 está fora do intervalo de confiança, indicando assim que as concentrações das $\text{TEP}_{\text{espectrof}}$ não mostraram variação significativa no período estudado. A mesma observação pode ser feita em relação às concentrações de $\text{TEP}_{\text{microsc}}$ onde as mesmas, com exceção ao mês de julho de 2003, não variaram durante o mesmo período.

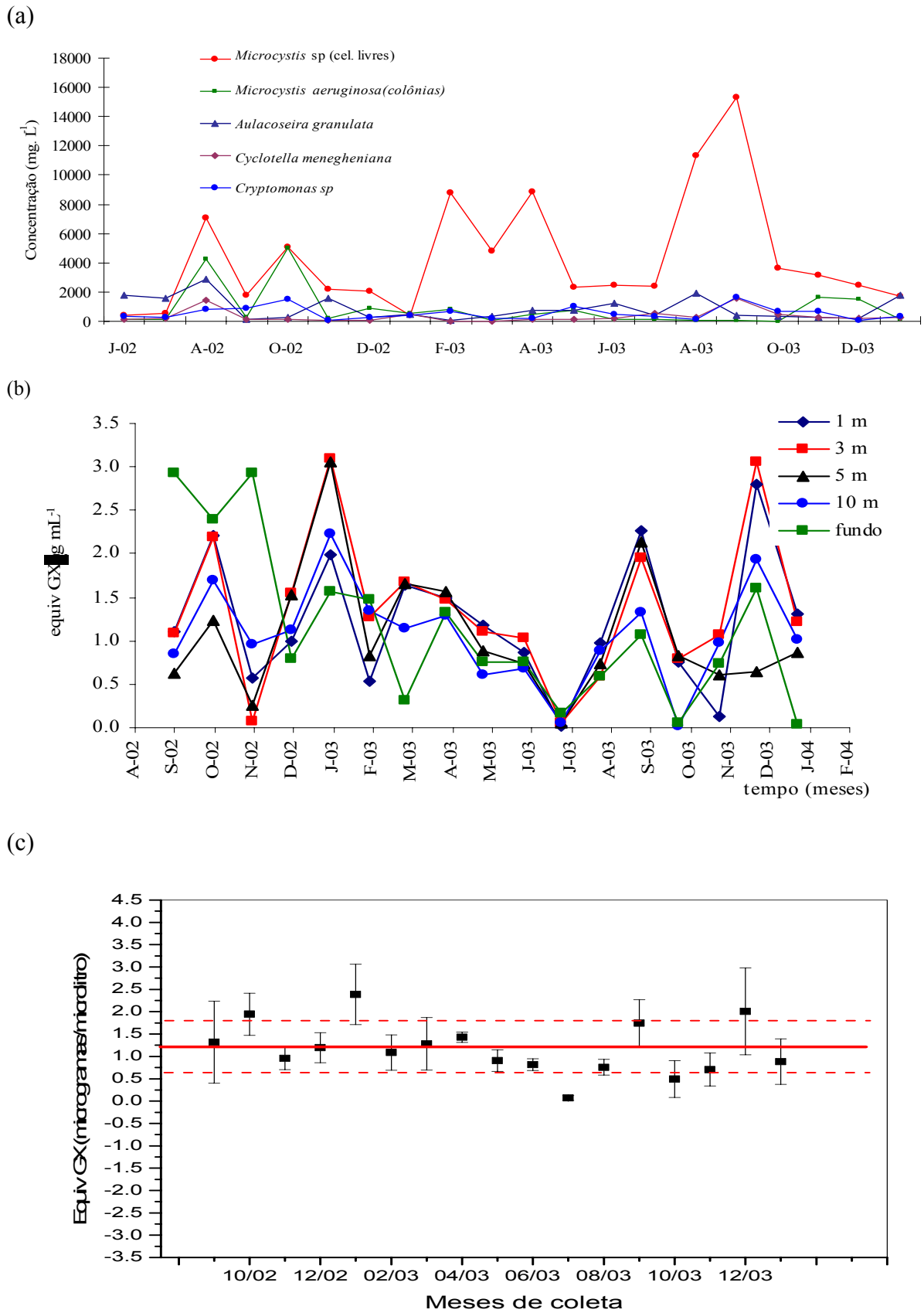


Figura 11 – (a) Reprodução da Figura 9; (b) variação das concentrações médias das TEP_{spectr} e (c) análise estatística dos resultados encontrados das concentrações das TEP_{spectr} no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

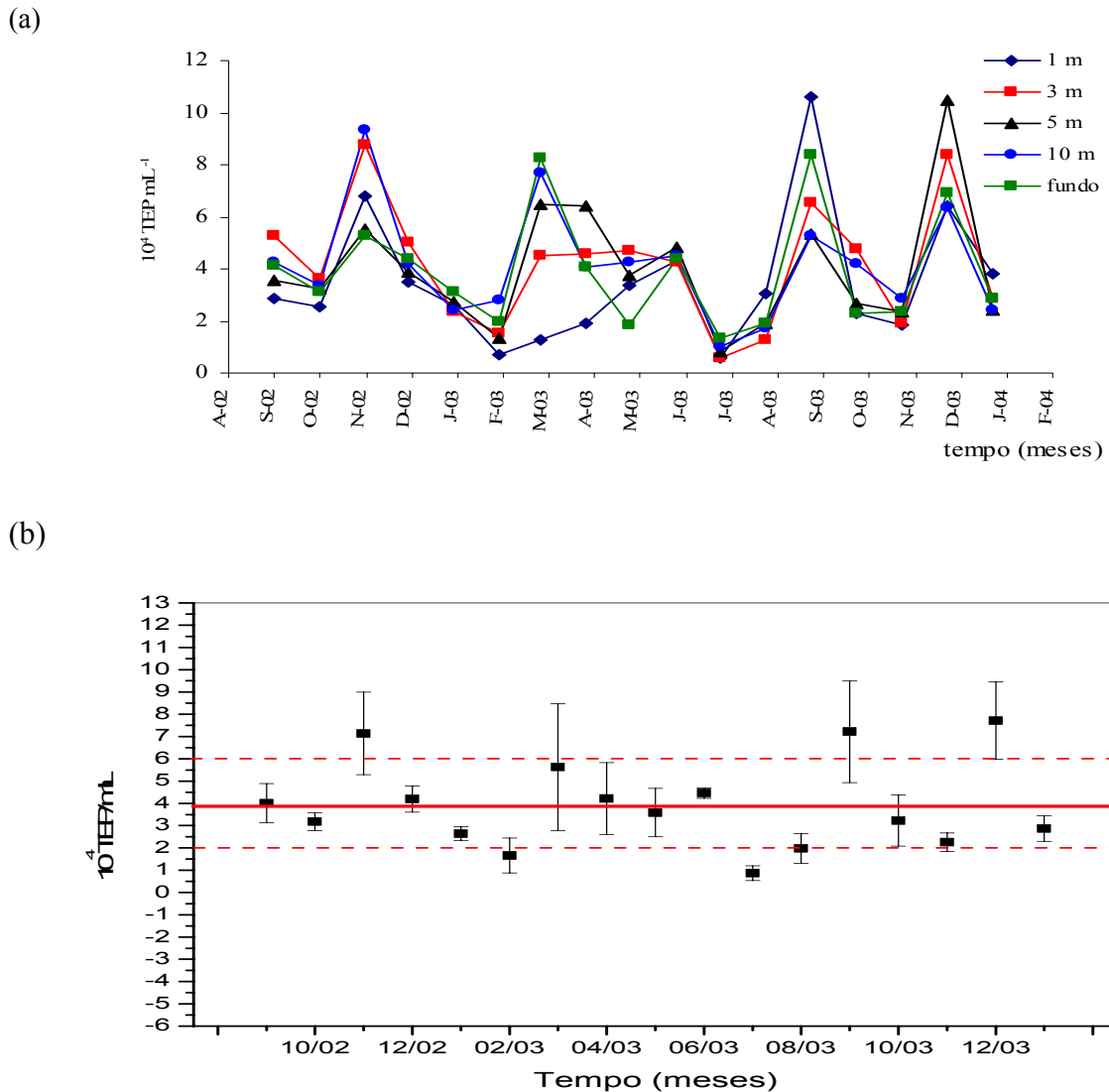


Figura 12 – (a) Variação das concentrações médias das $TEP_{microsc}$ e (b) análise estatística dos resultados encontrados das concentrações das $TEP_{microsc}$ no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

A Figura 13 apresenta uma comparação dos métodos empregados neste trabalho para a determinação das TEP das amostras coletadas no período de março de 2003 a janeiro de 2004. As concentrações médias das $TEP_{microsc}$, determinadas por microscopia de campo claro, foi lançada em gráfico na ordenada (eixo Y da Figura 13) e as concentrações médias das $TEP_{espectr}$ (em equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), determinadas empregando-se o método espectrofotométrico desenvolvido nesta tese, foram lançadas na abscissa (eixo X da Figura 13). Examinando-se a equação obtida: $TEP_{microsc} = 0,46 + 3,51 TEP_{espectr}$ e o $r^2 = 0,8459$,

onde $TEP_{microsc}$ representa o número de partículas obtidas empregando-se a técnica de microscopia de campo claro e $TEP_{espectr}$ é a concentração das TEP determinadas empregando-se o método espectrofotométrico. Este estudo confirma que as concentrações das TEP determinadas por microscopia correlacionam significativamente e linearmente com as concentrações das TEP determinadas por espectrofotometria.

Em um estudo semelhante, realizado por PASSOW (2002) comparou-se as concentrações das TEP determinadas por microscopia de campo claro e pelo método espectrofotométrico proposto PASSOW & ALLDREDGE (1995), obtendo-se um coeficiente de determinação, r^2 , igual a 0,6100 e considerou esse valor de r^2 satisfatório. A diferença entre os coeficientes de determinação obtida no presente estudo e aquele obtido por PASSOW & ALLDREDGE (1995), pode refletir as metodologias distintas empregadas nestes trabalhos, uma vez que o método espectrofotométrico empregado por estas pesquisadoras é semiquantitativo, de menor precisão e exatidão.

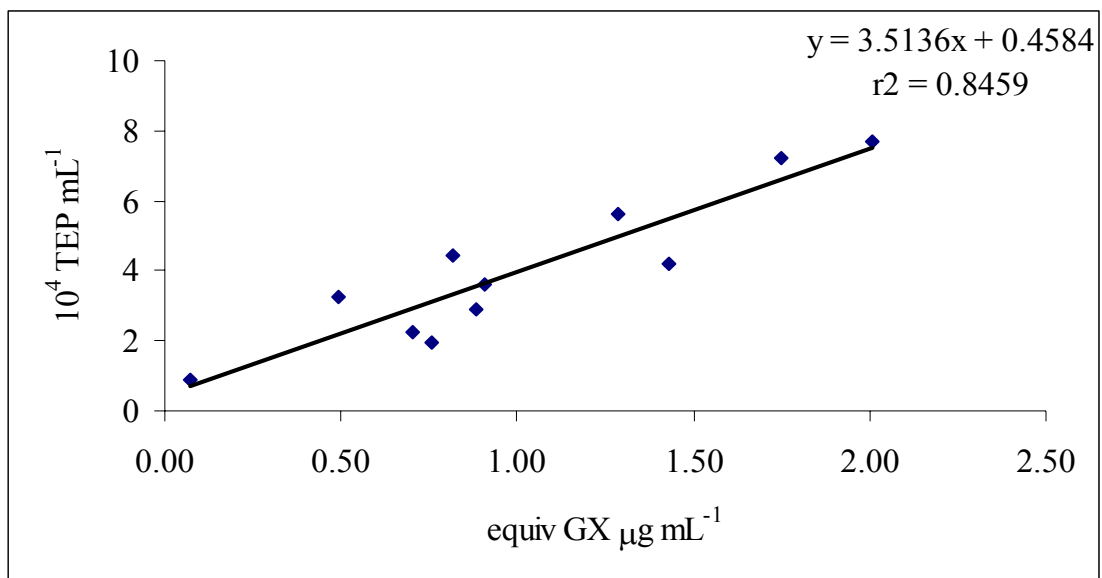


Figura 13 - Comparação entre os métodos: microscopia de campo claro (eixo Y) e espectrofotométrico (eixo X) utilizados na determinação das concentrações das TEP para amostras coletadas no reservatório de Barra Bonita, SP, no período de março de 2003 a janeiro de 2004.

Uma comparação das metodologias empregadas no estudo da variação sazonal da abundância das TEP no mar do Mediterrâneo indicou que as abundâncias das TEP

encontradas podem estar relacionadas também com a técnica de medida empregada (BEAUVAIS *et al.*, 2003).

Uma análise das concentrações das TEP obtidas empregando-se os dois métodos de determinação (ver Figuras 11b e 12a) pode-se verificar que no período de fevereiro de 2003 a abril de 2003 há um aumento da concentração das TEP, sendo que nos três meses seguintes há uma diminuição pronunciada da concentração das TEP, atingindo concentrações médias das TEP_{espect} de 0,07 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e TEP_{microsc} $8,7 \times 10^3$ partículas mL^{-1} . A partir desse mês, há um aumento acentuado da concentração das TEP até setembro de 2003, registrando-se concentrações médias de 1,75 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,22 \times 10^4$ partículas mL^{-1} . Entre o mês de setembro de 2003 a novembro deste mesmo ano houve uma diminuição das concentrações das TEP, obtendo-se teores médios de 0,70 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,26 \times 10^4$ partículas mL^{-1} . No mês de dezembro de 2003 foram encontradas as maiores concentrações médias, registrando-se concentrações de 2,01 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,71 \times 10^4$ partículas mL^{-1} . Finalmente, em janeiro de 2004 foram determinadas concentrações médias de 0,88 equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,87 \times 10^3$ partículas mL^{-1} .

Como descrito na literatura, as TEP têm sido encontradas em diversos corpos d'água em concentração variando de 10^2 a 10^7 partículas L^{-1} , sendo que a abundância dessas partículas pode estar correlacionada com a biomassa do fitoplâncton. Essas partículas são mais abundantes durante a fase de senescência do “blooms”, período de maior exudação (SIMON, *et al.*, 2002; PASSOW, 2002a), principalmente de diatomáceas.

Comparando-se a variação sazonal da concentração das TEP_{espect} (Figura 11b) ou TEP_{microsc} (Figura 12a), com a densidade de células do fitoplâncton (Figura 11a) para as amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004, pode-se observar uma relativa concordância entre a variação do número de células (mg mL^{-1}) e a concentração das TEP (espectrofotométrico e contagem por microscopia de campo claro). Nos meses seguintes,

nos quais se registraram fases de senescência do “bloom” de cianofíceas e/ou diatomáceas, foram constatados aumentos significativos das concentrações dessas partículas. Essa correlação já era esperada, uma vez que as TEP são produzidas preferencialmente pela excreção de polissacarídeos da comunidade algal ou pela liberação parcial ou total da cápsula ou bainha das algas, quando da sua morte.

Além das *Microcystis* sp, as diatomáceas *Aulacoseira granulata* contribuíram de forma significativa nos meses de novembro de 2002, junho de 2003 e agosto de 2003, explicando assim o aumento da concentração das TEP nos meses de dezembro de 2002 e setembro de 2003, conforme pode ser observado nas Figuras 11a, 11b e 12a.

5.5 Distribuição e abundância das TEP na coluna d’água

A Figura 14 apresenta as concentrações das TEP (equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$), a abundância das TEP (número de partículas mL^{-1}), o volume das TEP ($\mu\text{m}^3 \text{mL}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH em função da profundidade do corpo d’água do Reservatório de Barra Bonita determinados no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

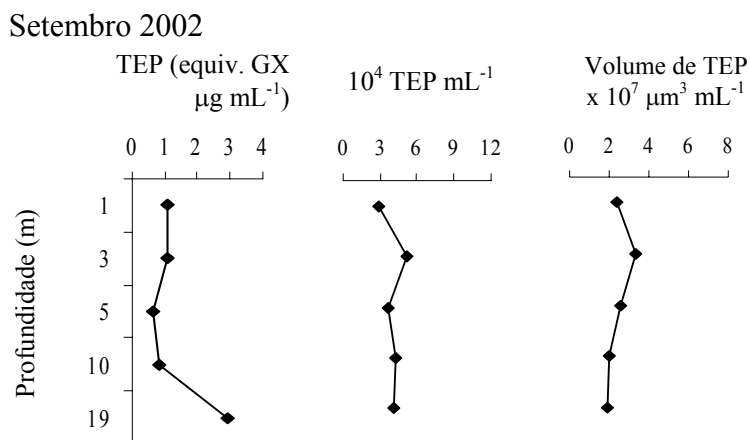
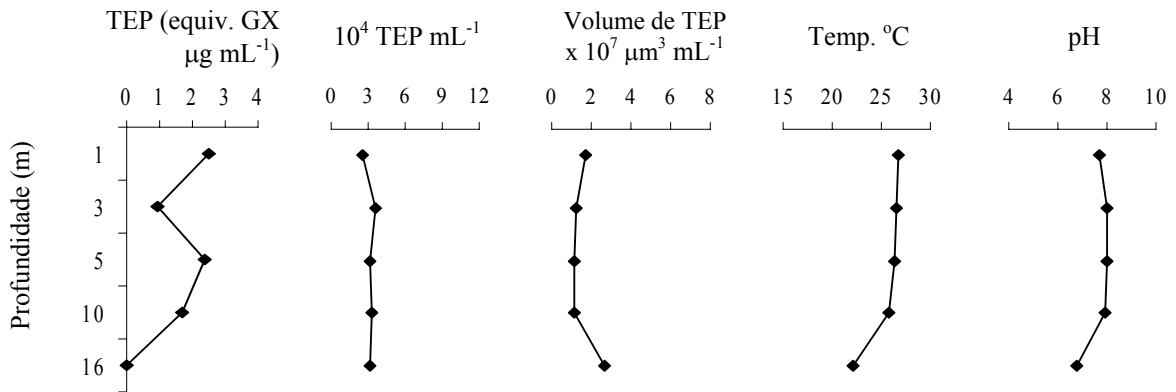
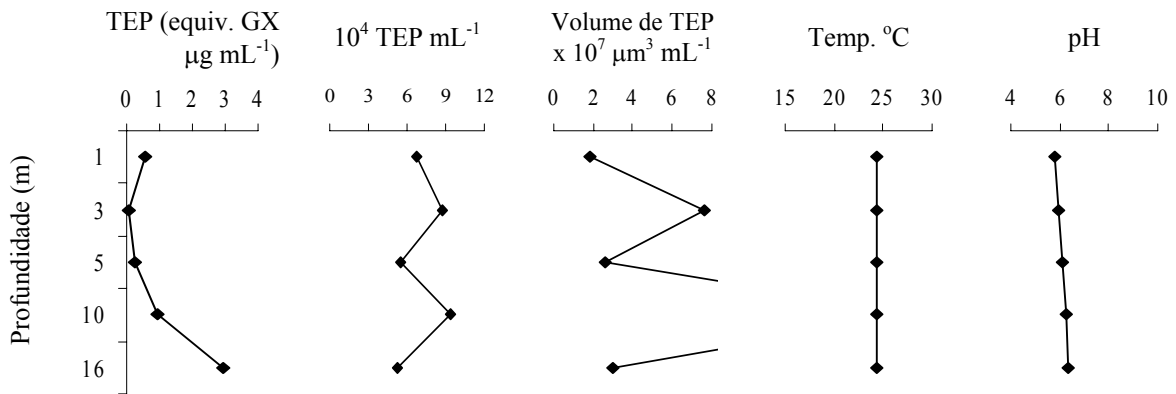


Figura 14 - Variação na coluna d’água das TEP; concentração das TEP; abundância das partículas; volume das partículas, temperatura; e pH.

Outubro 2002

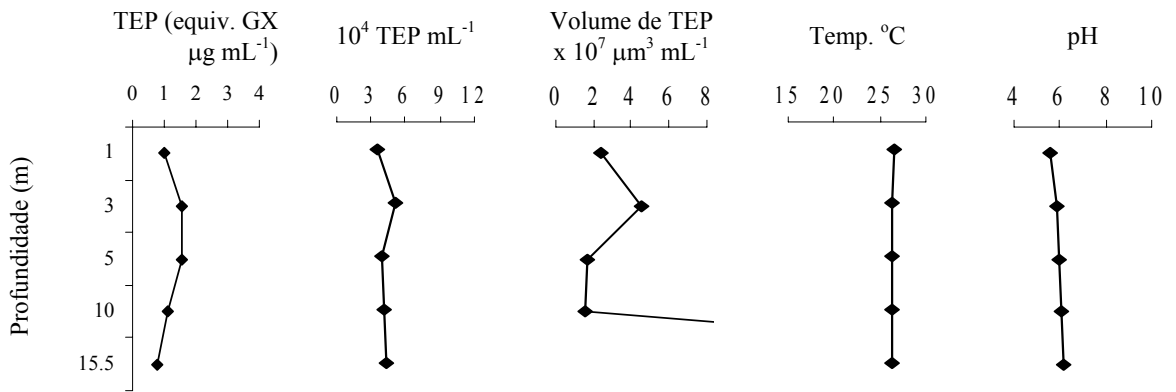


Novembro 2002



10 m = 36.82

Dezembro 2002



15,5 m = 36,05

Janeiro 2003

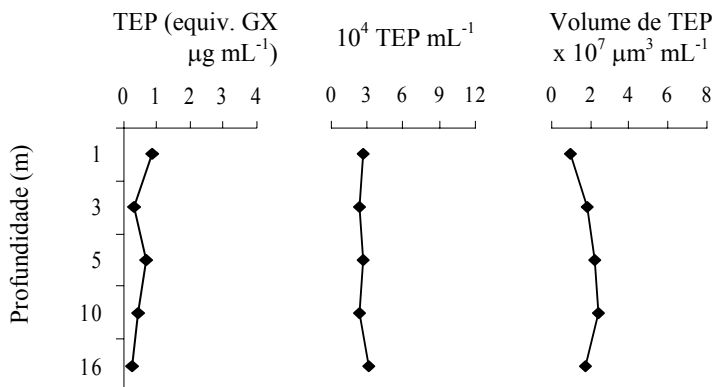
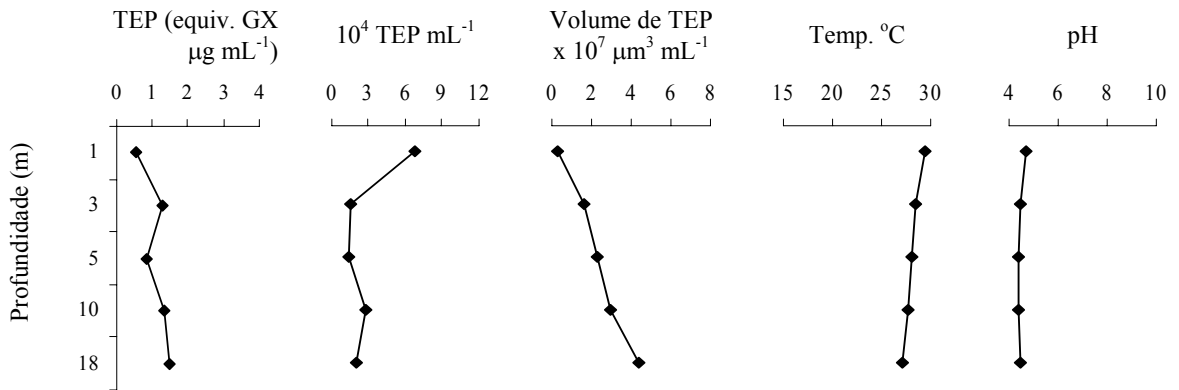
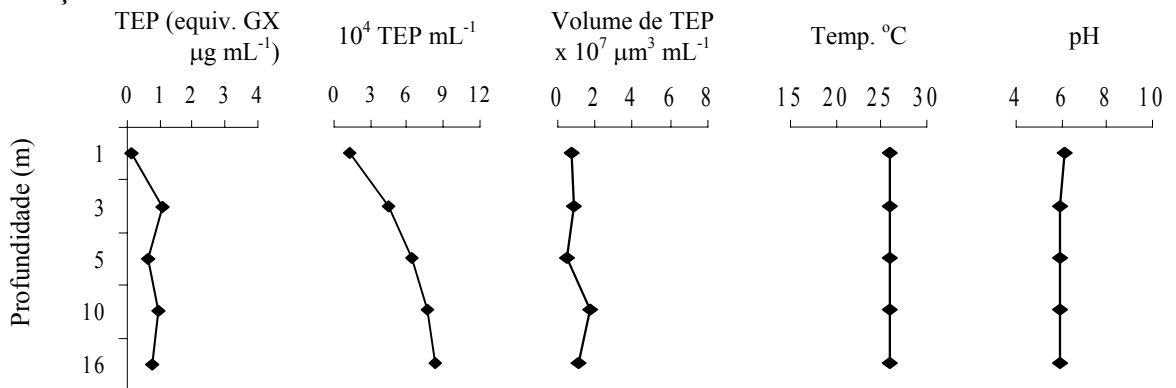


Figura 14 - continuação

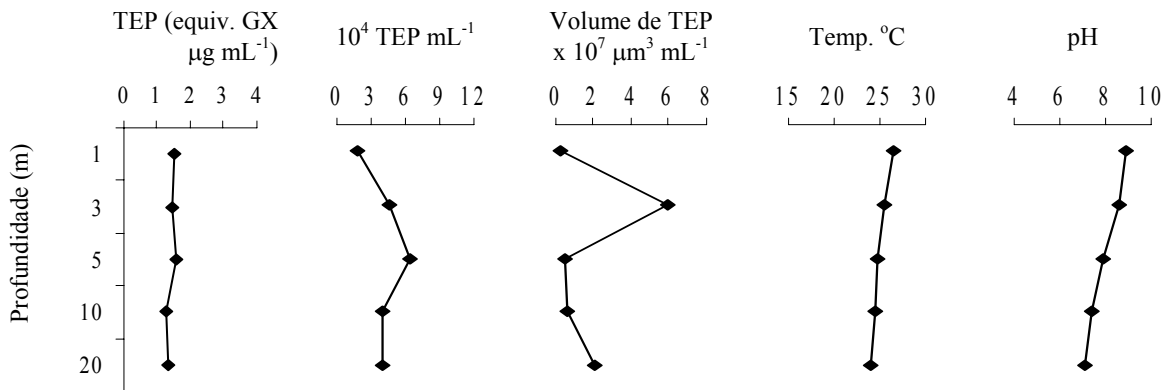
Fevereiro 2003



Março 2003



Abril 2003



Maio 2003

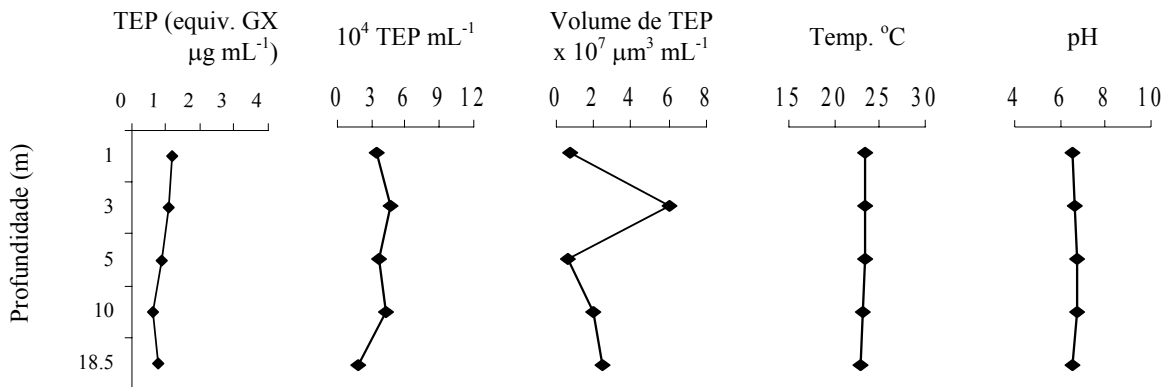
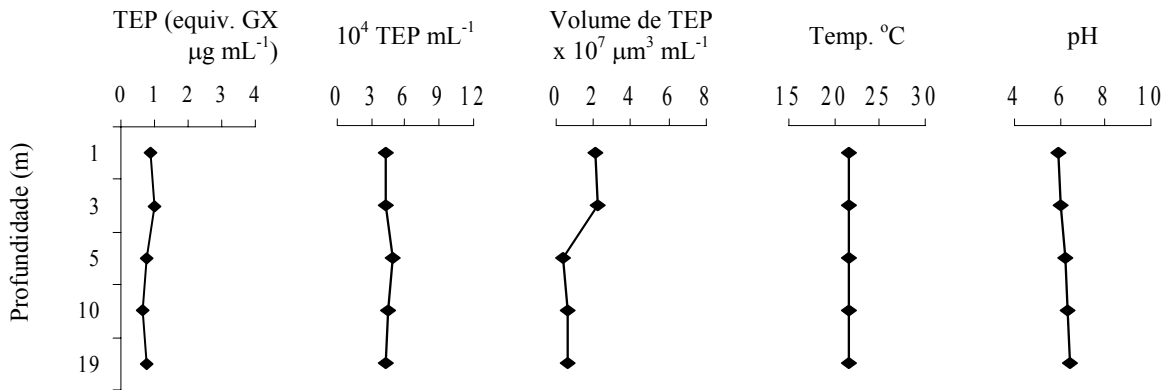
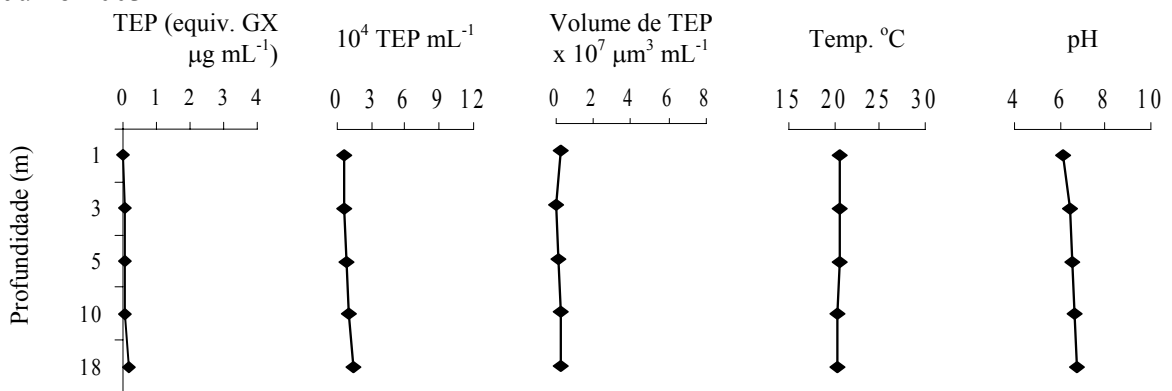


Figura 14 - continuação

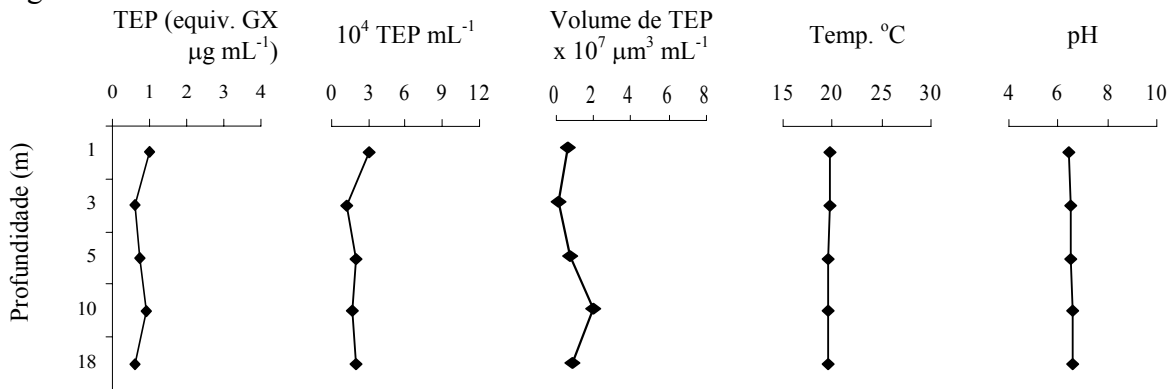
Junho 2003



Julho 2003



Agosto 2003



Setembro 2003

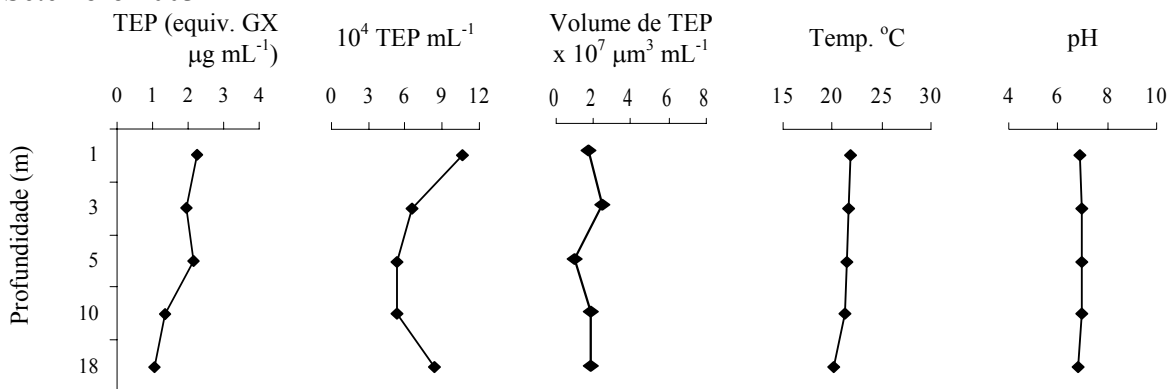
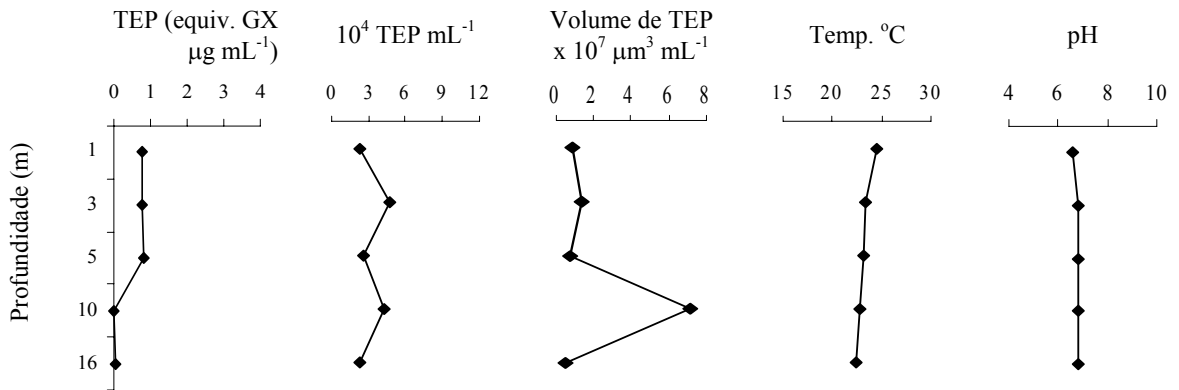
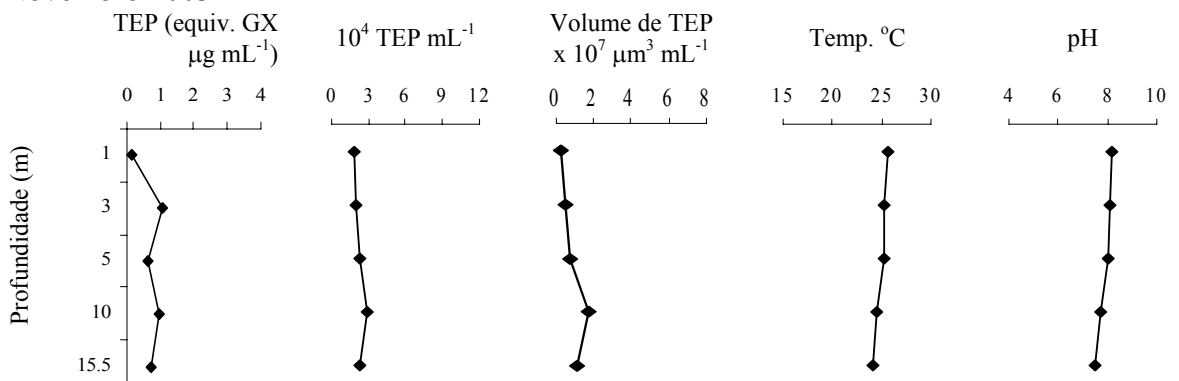


Figura 14 - continuação

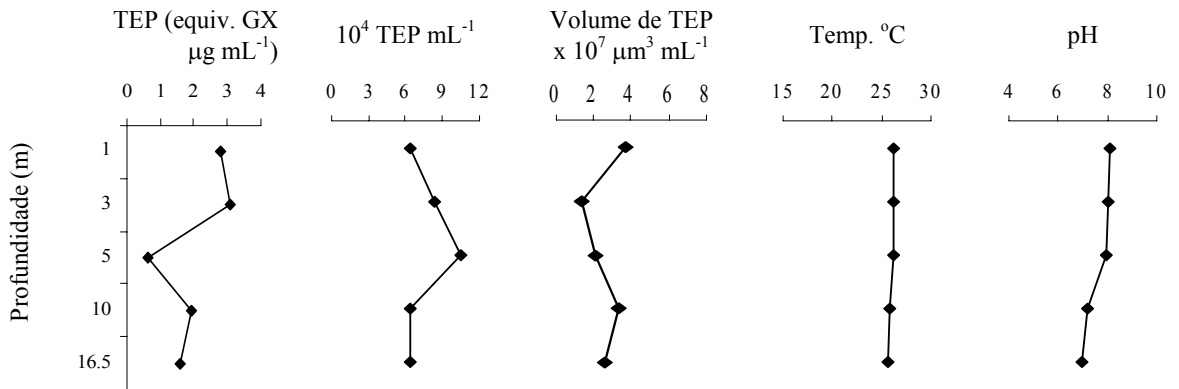
Outubro 2003



Novembro 2003



Dezembro 2003



Janeiro 2004

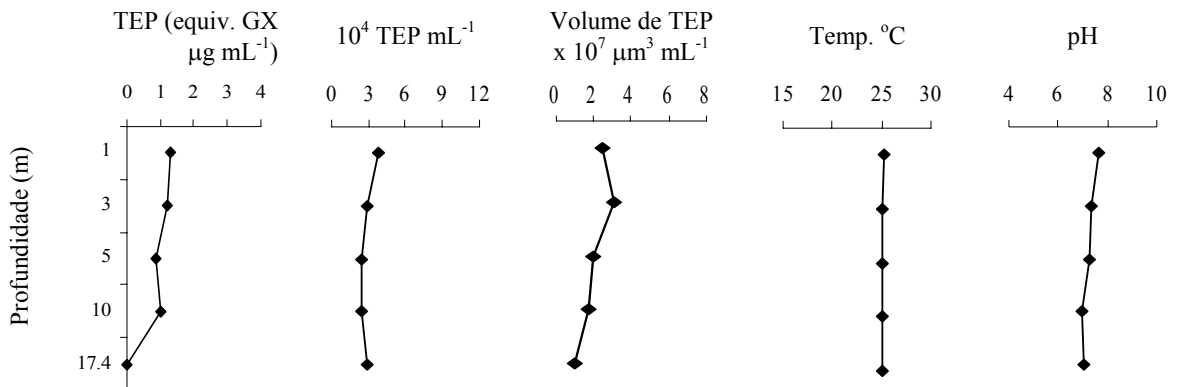


Figura 14 - continuação

MARI & KIØRBOE (1996) estudaram a abundância e distribuição por tamanho das TEP nas águas do sul de Kattegat (Dinamarca) e verificaram que há uma tendência de aumento da abundância das TEP com a profundidade da água (concentrações variaram de $3,0 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ TEP mL⁻¹), sendo que as amostras coletadas na superfície apresentaram as menores concentrações das TEP ($< 7,0 \times 10^3$ TEP mL⁻¹).

LOGAN *et al* (1995) estudando a abundância das TEP em águas doce do Lago Constance (Alemanha) durante um “bloom” de algas na primavera de 1993 encontraram que a diminuição da abundância das TEP na superfície desse lago está correlacionada com a sedimentação das diatomáceas, sendo a concentração máxima encontrada igual a $8,60 \times 10^2$ partículas mL⁻¹ no fundo do lago (a 25 m de profundidade).

Segundo PASSOW (2002a), TEP são géis cujas características físicas podem ser descritas em termos da teoria dos géis-polímeros. Os interstícios do polímero podem enclausurar água, a qual está em equilíbrio termodinâmico com água em sua volta (água doce ou do mar). Estes géis podem sofrer transições de fases entre a fase condensada e a fase hidratada. Conseqüentemente, o tamanho e o volume das TEP podem variar sem variação significativa de sua massa. Esta transição de fase depende de fatores ambientais como o pH, temperatura, pressão e força iônica. As TEP podem sofrer reações químicas, desidratação, envelhecimento e/ou outros fenômenos, os quais podem ser reversíveis e irreversíveis. As propriedades físico-químicas das TEP então dependem de sua história e específica condição de sua formação.

No estudo comparativo das variações de pH e temperatura do corpo d'água do reservatório de Barra Bonita, foi constatado que para todas as profundidades da coluna d'água, os menores valores de pH foram encontrados no mês de fevereiro de 2003 e os maiores valores no mês abril de 2003. Os valores de pH médios determinados foram 6,70; 6,73; 6,69; 6,58 e 6,51 para as amostras de águas coletadas nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo respectivamente. Podendo concluir que há ligeira tendência de diminuição

do valor de pH da água com a profundidade. No entanto, essa pequena variação de pH ($\Delta\text{pH} \sim 0,20$) não deve ter afetado a abundância vertical das TEP na água deste reservatório.

Em relação à variação da temperatura do corpo d'água do reservatório durante as amostragens (dia), as temperaturas mais elevadas foram observadas em fevereiro de 2003 (verão) e as mais baixas em agosto de 2003 (inverno), como esperadas. Foi observado também que a maior variação de temperatura na coluna d'água, entre a superfície e o fundo do reservatório, foi de 4,6 °C, registrada no mês de outubro de 2002, sendo que nos demais meses a variação de temperatura foi de alguns décimos de graus centígrados, como pode ser observado na Figura 14. A temperatura média em cada uma das profundidades foi de 24,3 °C a 1m; 24,1 °C a 3m; 24,0 °C a 5m; 23,8 °C a 10m e 23,4 °C no fundo do reservatório, sendo a temperatura média da água no período em estudo de 23,9 °C. Como discutido anteriormente, essa pequena variação de temperatura na coluna d'água durante os diferentes dias de amostragens, foi atribuída à natureza polimítica do reservatório. Mais uma vez, devido às características desse reservatório, esse pequeno gradiente de temperatura observado não deve ter tido algum efeito na abundância das TEP no corpo d'água estudado.

Uma comparação das abundâncias verticais das TEP obtidas em cada mês empregando-se os dois métodos de determinação (espectrofotométrico e microscopia de luz campo claro) apresentou, ao contrário do excelente coeficiente de determinação, $r^2 = 0,8459$, obtido no estudo anterior, coeficientes de determinação variando de 0,1500 a 0,7300, para as amostras coletadas no reservatório entre os meses de setembro de 2002 a janeiro de 2004, como mostrado na Figura 13. Assim, a correlação das abundâncias das TEP obtidas empregando-se estes dois métodos analíticos é significativa para amostras coletadas em apenas 6 meses, onde se obteve $r^2 \geq 0,5100$, sendo os coeficientes de determinação menores que esse valor nos meses restantes.

Como apresentado na metodologia, na estimativa dos volumes das TEP, foi considerado que essas partículas são esféricas e sólidas, sendo o volume calculado a partir da

equação de uma esfera perfeita, ou seja: $V = 4/3\pi r^3$, sendo o r igual à metade do diâmetro da esfera. Os volumes calculados das TEP, em volume de TEP $\times 10^7 \mu\text{m}^3$, estão apresentados na Figura 14. Uma comparação dos valores de volume obtidos das TEP com a abundância das TEP obtidas por microscopia de campo claro, indica uma baixa correlação entre os valores obtidos neste trabalho, uma vez que em apenas 6 conjuntos de amostras foram obtidos coeficientes de determinação maiores que 0,5100.

A Figura 15 apresenta uma variação sazonal da concentração volumétrica das TEP em mL m^{-2} de água do reservatório de Barra Bonita no período de setembro de 2003 a janeiro de 2004. Essas concentrações volumétricas foram determinadas por integralização dos volumes das TEP na coluna d'água correspondente a um metro quadrado. Nos meses de novembro de 2002 e dezembro de 2002 foram registradas as maiores concentrações volumétricas das TEP com teores de 226,7 e 222,6 mL m^{-2} de água, respectivamente.

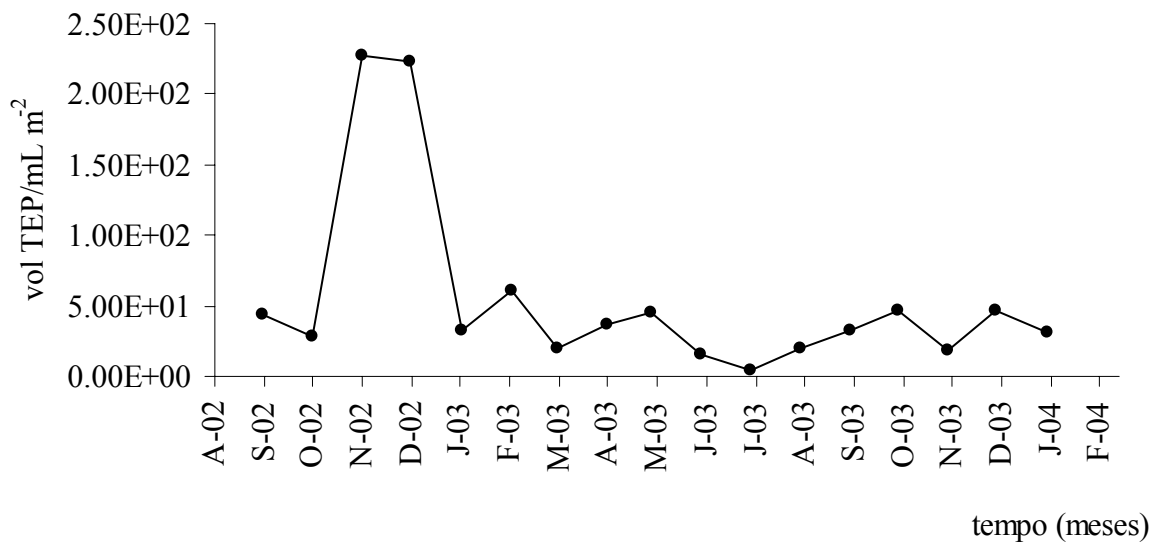


Figura 15 - Variação sazonal da concentração volumétrica das TEP, do reservatório de Barra Bonita no período de setembro de 2003 a janeiro de 2004..

Em uma comparação da variação sazonal das concentrações volumétricas na coluna d'água (Figura 15) com as concentrações das TEP_{espect} (Figura 11b) e concentração das TEP_{microsc} (Figura 12a), pode-se observar uma boa concordância entre estes teores para a maioria dos meses estudados.

Observando-se a Figura 9 ou 11a, verifica-se que houve um aumento da concentração das espécies algais cianofíceas (*Microcystis* sp e *Microcystis aeruginosa*) e de *Cryptomonas* sp no período de agosto a outubro de 2002 e de diatomáceas (*Aulacoseira granulata* e *Cyclotella* sp) no período de agosto a novembro de 2002 e outros “bloom” desses mesmos gêneros de microalgas fitoplanctônicas nos meses de agosto a outubro de 2003, indicando assim um provável aumento da excreção de polissacarídeos, seguido pela senescência dessas microalgas fitoplanctônicas. Esses aumentos das concentrações de cianobactérias, diatomáceas e criptofíceas foram registrados nos meses que antecederam o registro dos maiores volumes das TEP (Figura 15). As microalgas fitoplanctônicas são consideradas importantes produtoras de exopolímeros (DECHO, 1990; MOPPER *et al.* 1995), sendo esses exopolímeros o principal precursor das TEP (PASSOW, 2002a).

A Figura 16 apresenta a variação da concentração de carboidratos dissolvidos (mg L^{-1}) na água do reservatório de Barra Bonita no período de junho de 2002 a janeiro de 2004. Figura cedida pela doutoranda Maria José Dellamano de Oliveira.

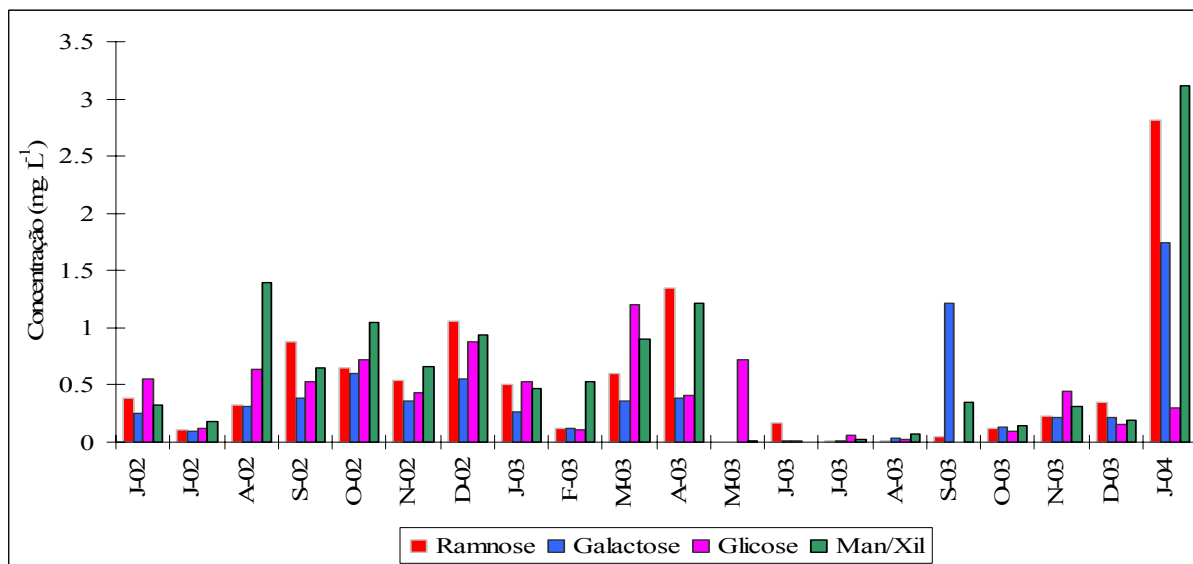


Figura 16 – Variação sazonal de carboidratos dissolvidos na água do reservatório de Barra Bonita no período de junho de 2002 a janeiro de 2004.

A variação sazonal da concentração dos carboidratos (ramnose, galactose, glicose e manose/xilose) deve estar relacionada à comunidade de microalgas fitoplanctônicas. Nos meses em que ocorreram “blooms” de diatomáceas e cianofíceas houve um aumento significativo das concentrações dos carboidratos supramencionados. Essa correlação foi verificada nos meses de agosto e outubro de 2002 e setembro de 2003.

Nos meses de novembro e dezembro de 2002, quando foi registrado um aumento da concentração volumétrica das TEP (no período de agosto de 2002 a dezembro de 2002) (Figura 15), houve também o registro da elevação da concentração desses carboidratos, sugerindo assim que as TEP poderiam ter sido formadas nesses meses. Por outro lado, no período de junho a agosto de 2003, foram determinados as menores concentrações desses carboidratos (Figura 16), corroborando com as menores concentrações volumétricas das TEP encontradas nesse período (Figura 15) e/ou concentrações das TEP_{espect} e/ou TEP_{microsc} (Figuras 11b e 12a), respectivamente. O aumento da concentração volumétrica (Figura 15) em setembro de 2003 pode estar relacionado com o aumento acentuado de células algais registrados nesse mesmo mês (Figura 11a) e também com o aumento de carboidratos (Figura 16). Além da presença e abundância dos precursores (polissacarídeos dissolvidos), o volume destas partículas pode estar relacionado às propriedades físico-químicas como a propriedade destas serem mais reativas ou grudentas, bem como o tempo em que estas partículas foram formadas, isto é a “idade” das TEP. Parte das TEP com maior volume deve ser mais antiga, pois devem ter agregado uma maior quantidade de material presente na coluna d’água, confirmando os resultados registrados nas Figuras 9 ou 11a, Figura 15 e Figura 16.

Segundo PASSOW (2002a), a concentração das TEP e clorofila se correlacionam significativamente durante a fase exponencial de crescimento em cultura de laboratório ou durante o “bloom” de fitoplâncton. No entanto, neste trabalho não foi encontrada uma correlação geral entre a produção das TEP e a concentração de clorofila a.

5.6 Distribuição das TEP por tamanho na coluna d'água

Como apresentado na metodologia, a distribuição das TEP por tamanho é geralmente descrita por uma equação do tipo (equação 2):

$$N = kd_p^{-\beta} \text{ ou } dN/d(d_p) = kd_p^{-(\beta+1)} \quad (\text{equação 2})$$

onde dN representa o número de partículas por unidade de volume (1 mL por exemplo) no intervalo de tamanho das partículas de d_p a $(d_p + d(d_p))$. A constante k depende da concentração das partículas e β descreve a distribuição das partículas por tamanho (espectro das partículas por tamanho). Assim, quanto menor for o valor de β encontrado, menor será a fração das partículas de menor tamanho (McCAYE, 1984; PASSOW & ALLDREDGE, 1994; MARI & KIØRBOE, 1996; WORM & SØNDERGAARD, 1998). Os valores de β e de k podem ser determinados por regressões do tipo (equação 3):

$$\log [dN/d(d_p)] \text{ vs } \log [d_p] \quad (\text{equação 3})$$

Desta maneira, o coeficiente linear das curvas obtidas será igual a $\log k$ e o coeficiente angular igual a $-(\beta + 1)$, onde a magnitude de β descreve a distribuição das partículas por tamanho em diferentes amostras (MARI & KIØRBOE, 1996; McCAYE, 1984).

No cálculo da distribuição das partículas medidas em cada profundidade na coluna d'água, foi calculado o diâmetro equivalente de uma esfera perfeita (DEE) empregando-se a área de cada TEP determinada por microscopia de campo claro. Desta forma, foram agrupadas 10 classes por tamanho nos intervalos seguintes: 1,0 - 1,50; 1,50 - 2,25; 2,25 - 3,38; 3,38 - 5,06; 5,06 - 7,59; 7,59 - 11,39; 11,39 - 17,09; 17,09 - 25,63; 25,63 - 38,44; 38,44 - 57,67 μm . Em cada classe por tamanho, a concentração da TEP, (dN) foi normalizada para cada intervalo de diâmetro da partícula $d(d_p)$, que no presente estudo foi de 1,5 μm . Empregando-se essa variação do diâmetro das partículas, chegou-se à série supramencionada de 10 classes distintas de partículas.

As TEP possuem altas concentrações de água retida em sua estrutura tridimensional, assim é de extrema importância seguir rigorosamente o mesmo procedimento de filtração, para que as TEP não sofram colapso durante ou após a filtração da água, o qual afetaria o diâmetro equivalente de uma esfera perfeita (DEE) ou o seu volume e, conseqüentemente a distribuição das TEP por tamanho.

A Figura 17 apresenta a concentração das TEP em função da distribuição por tamanho das partículas, para as amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita.

Os parâmetros k e β foram calculados das regressões lineares, após transformação logarítmica. Os valores elevados para r^2 , obtidos neste trabalho, indicam uma boa correlação entre esses parâmetros encontrados. Geralmente o pico das concentrações das TEP está associado com o “bloom” de fitoplâncton. Altas concentrações das TEP têm sido encontradas em zonas eutróficas, caso do reservatório estudado neste trabalho. A distribuição temporal e espacial das TEP sugere que há uma forte relação com o fitoplâncton presente (PASSOW & ALLDREDGE, 1994; MARI & KIØRBOE, 1996; GROSSART *et al.*, 1997; ENGEL & PASSOW, 2001; PASSOW, 2002a).

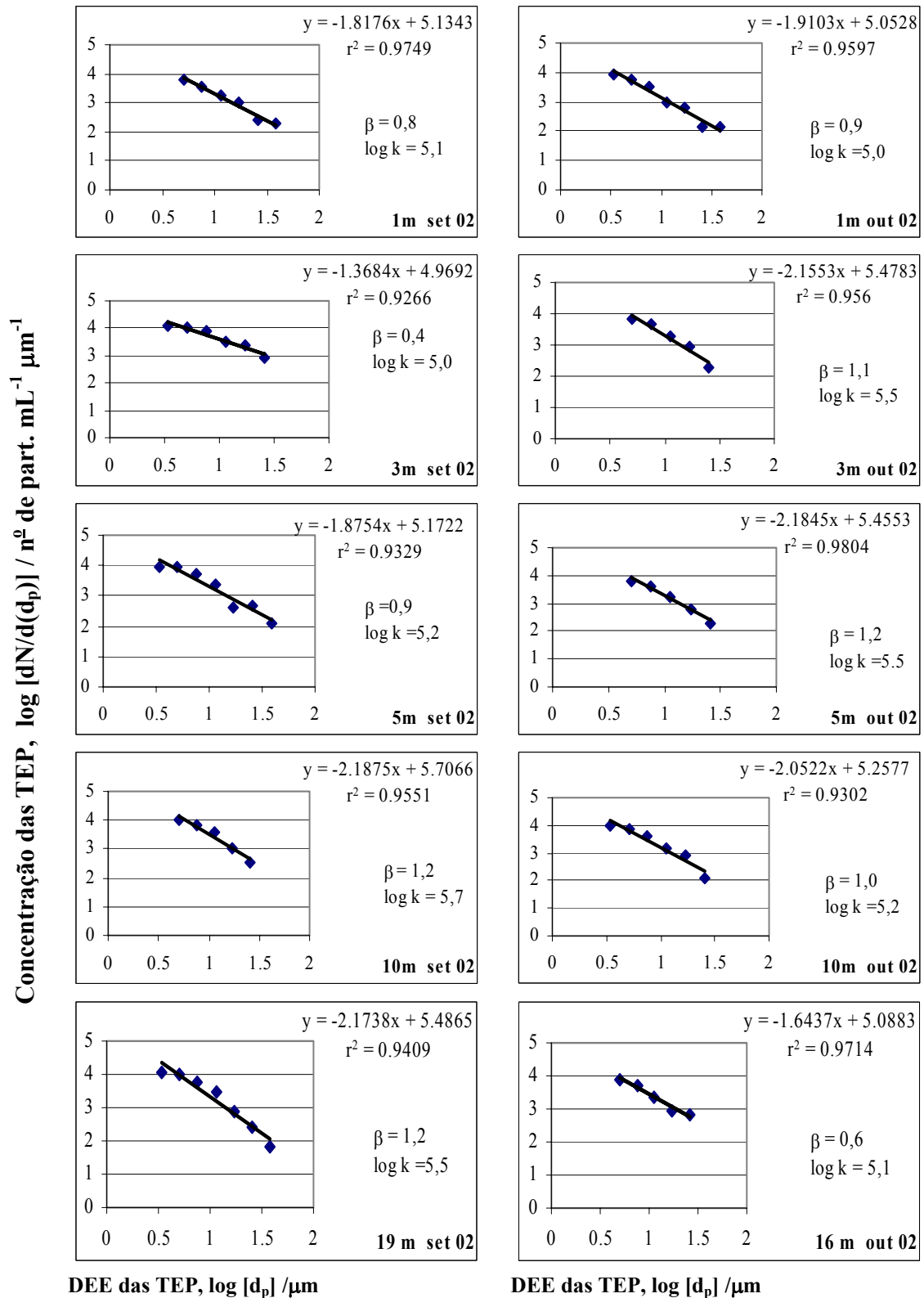


Figura 17 – Concentrações das TEP em função da distribuição por tamanho das partículas (em diâmetro equivalente das TEP (DEE)), para as amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP.

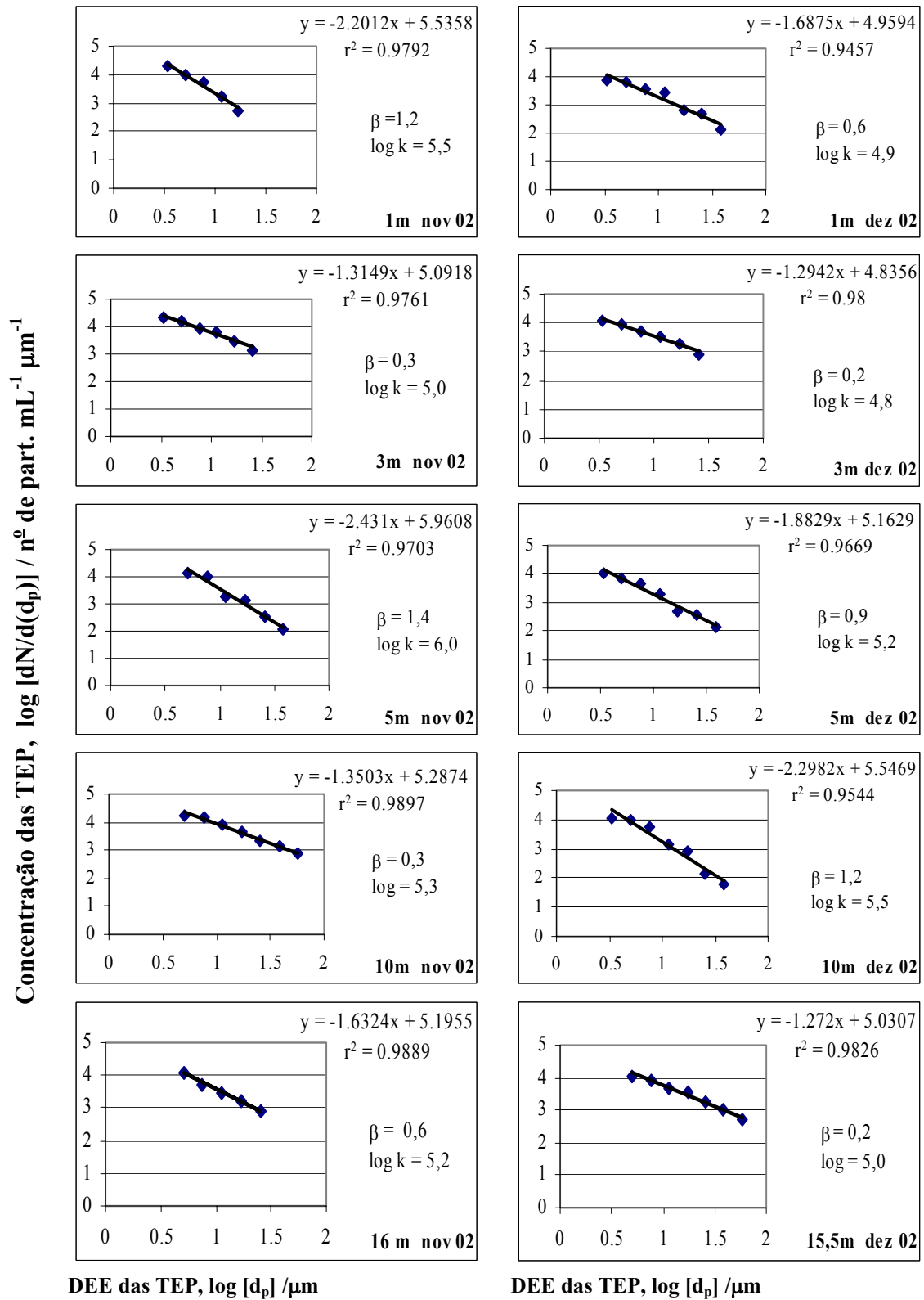


Figura 17 - continuação

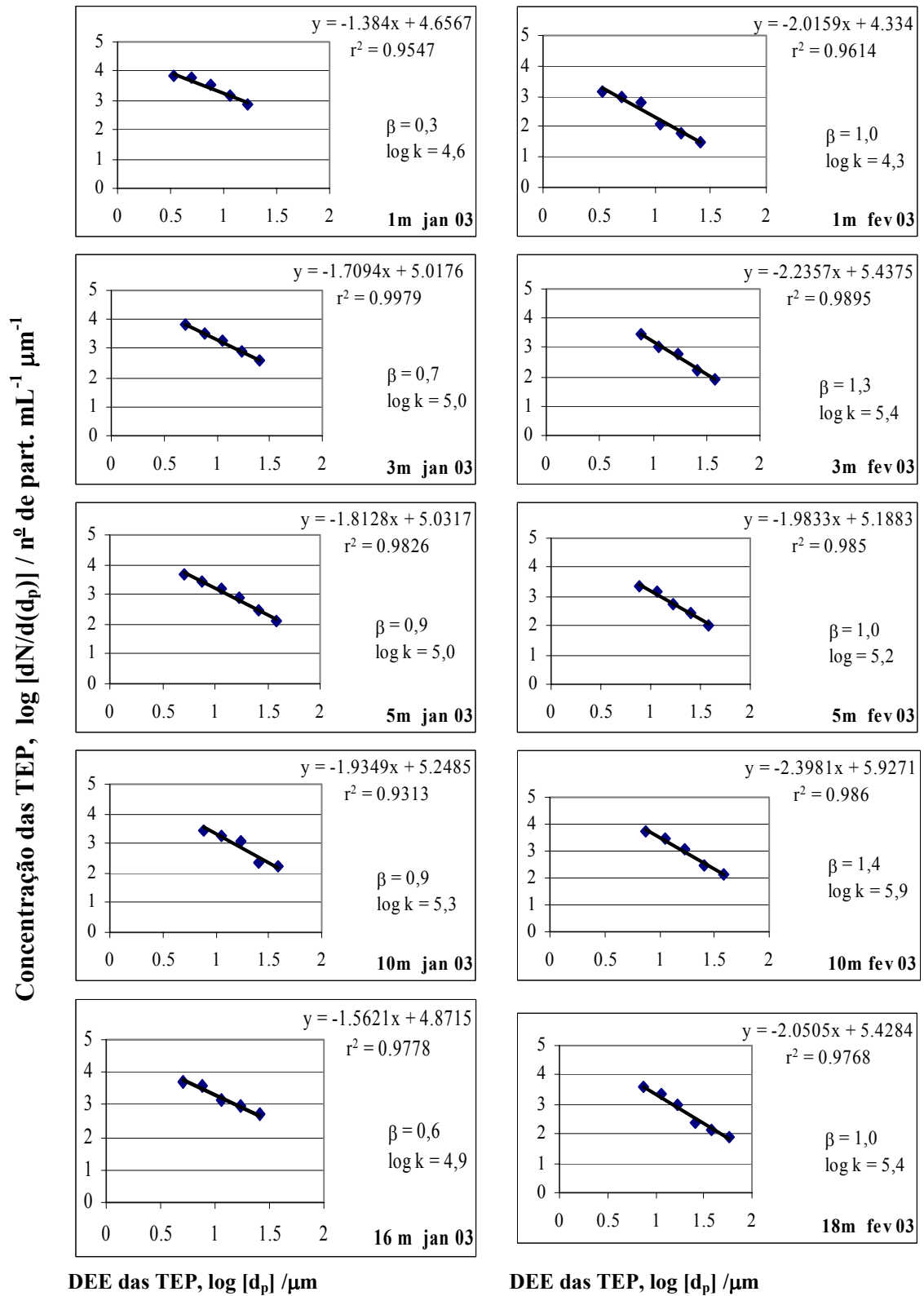


Figura 17 - continuação

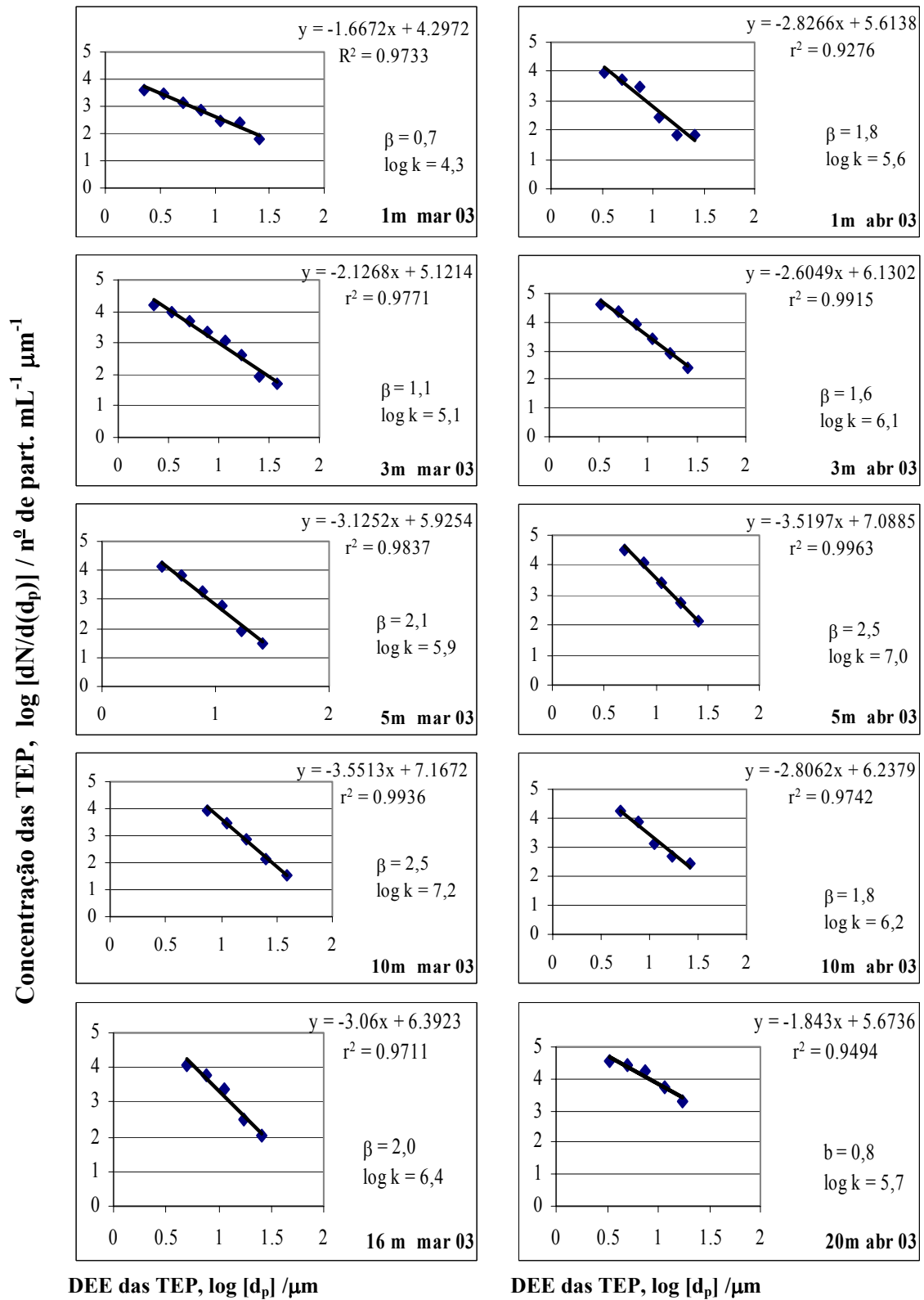


Figura 17 - continuação

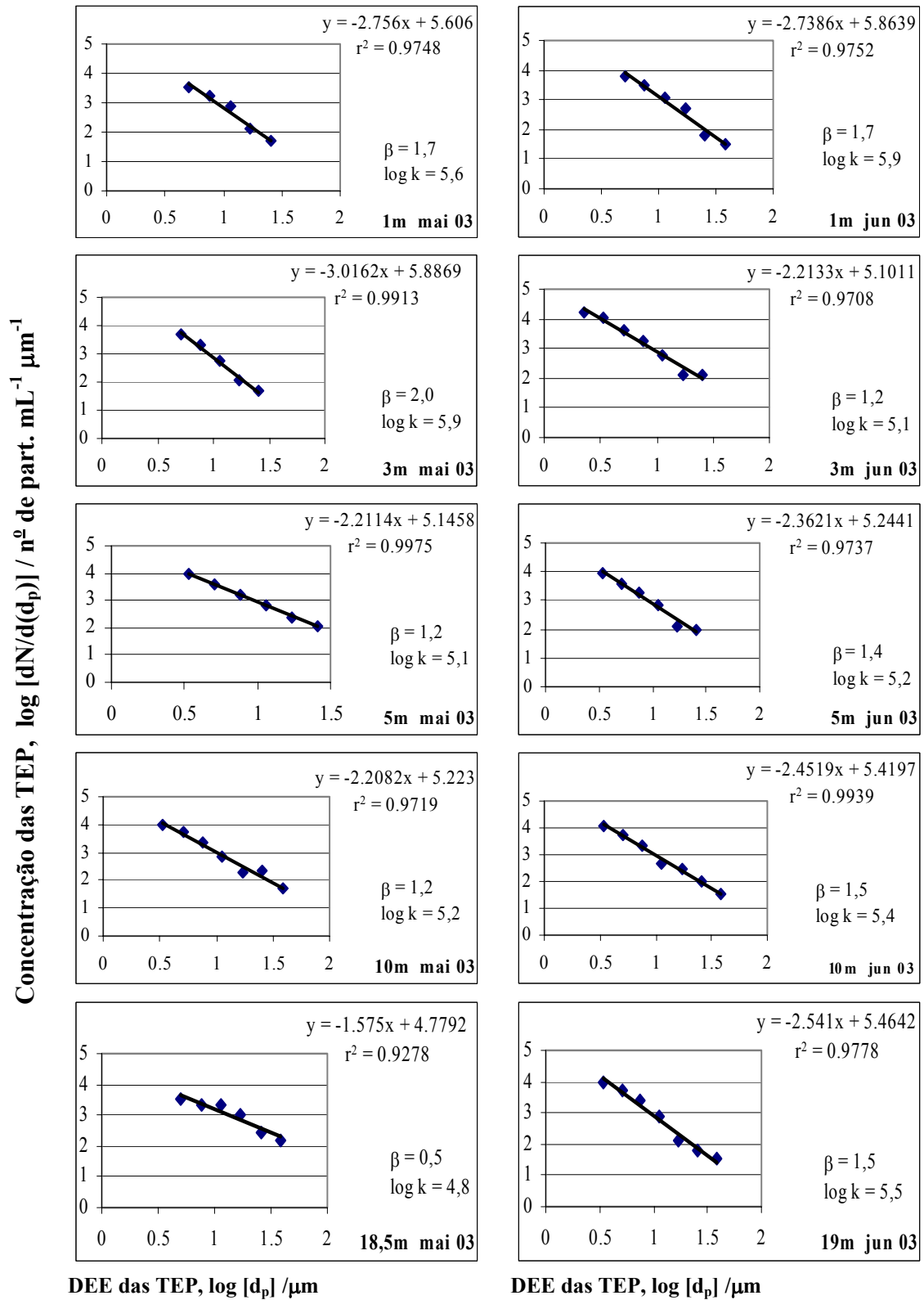


Figura 17 - continuação

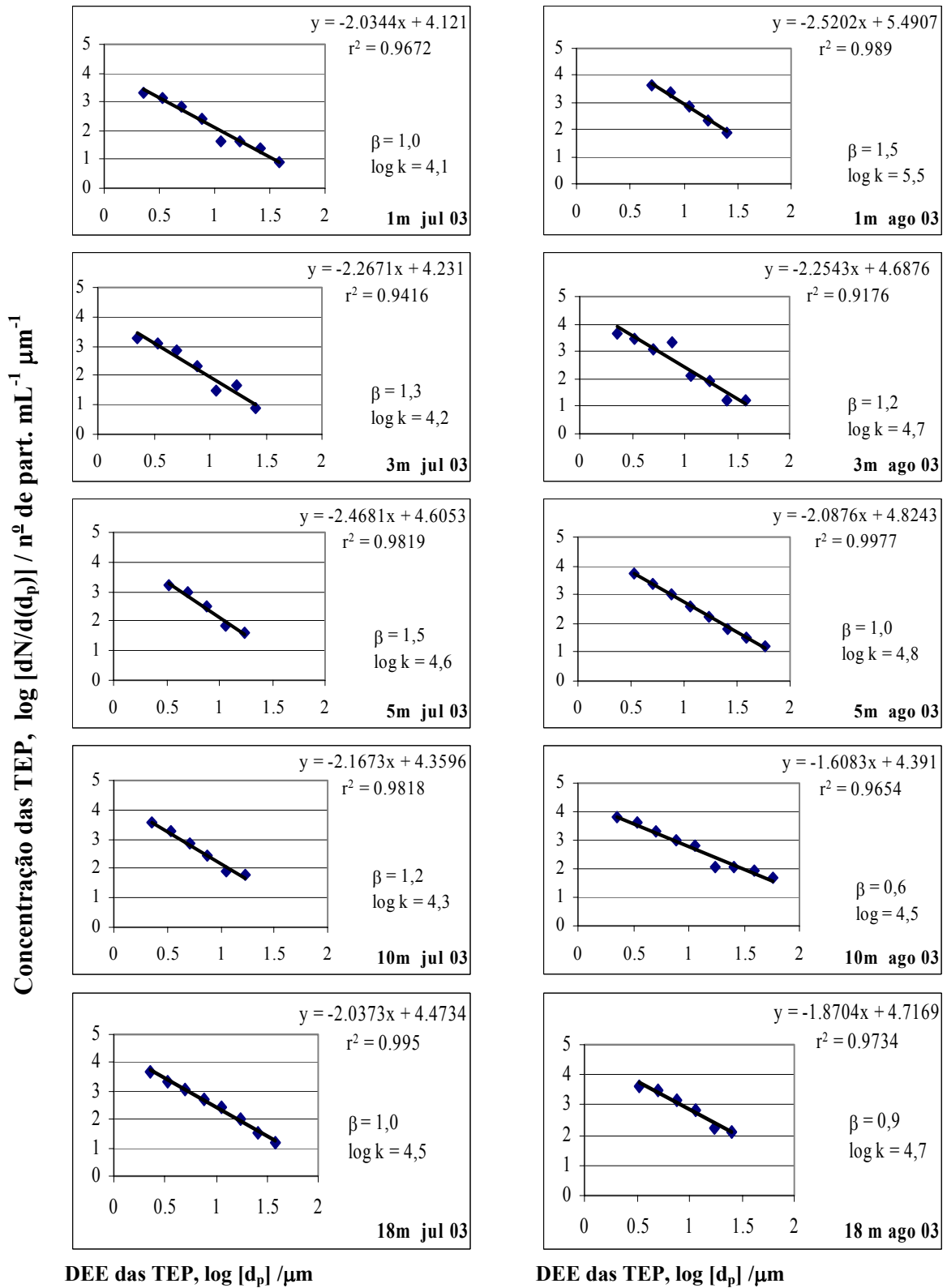


Figura 17 - continuação

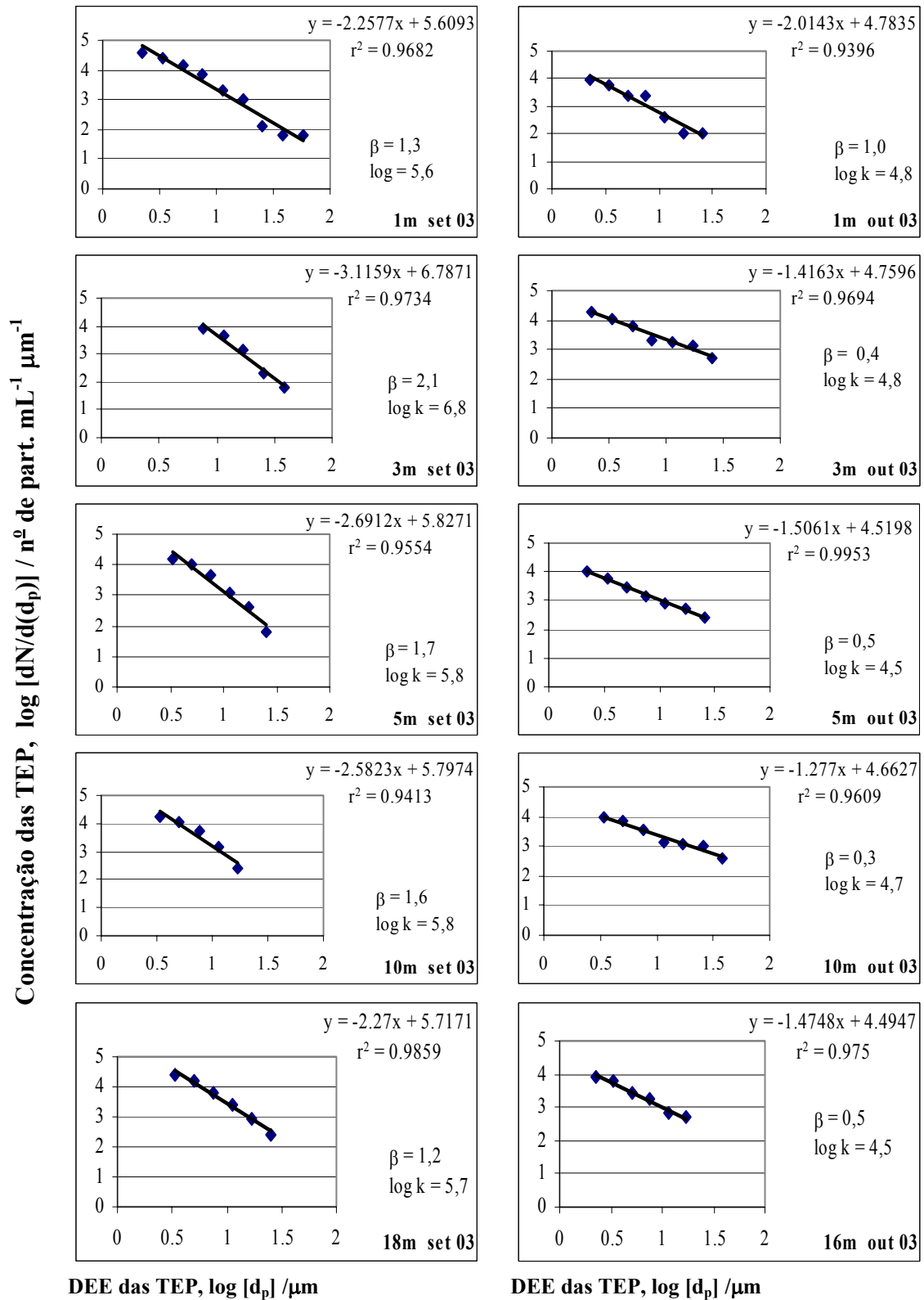


Figura 17 - continuação

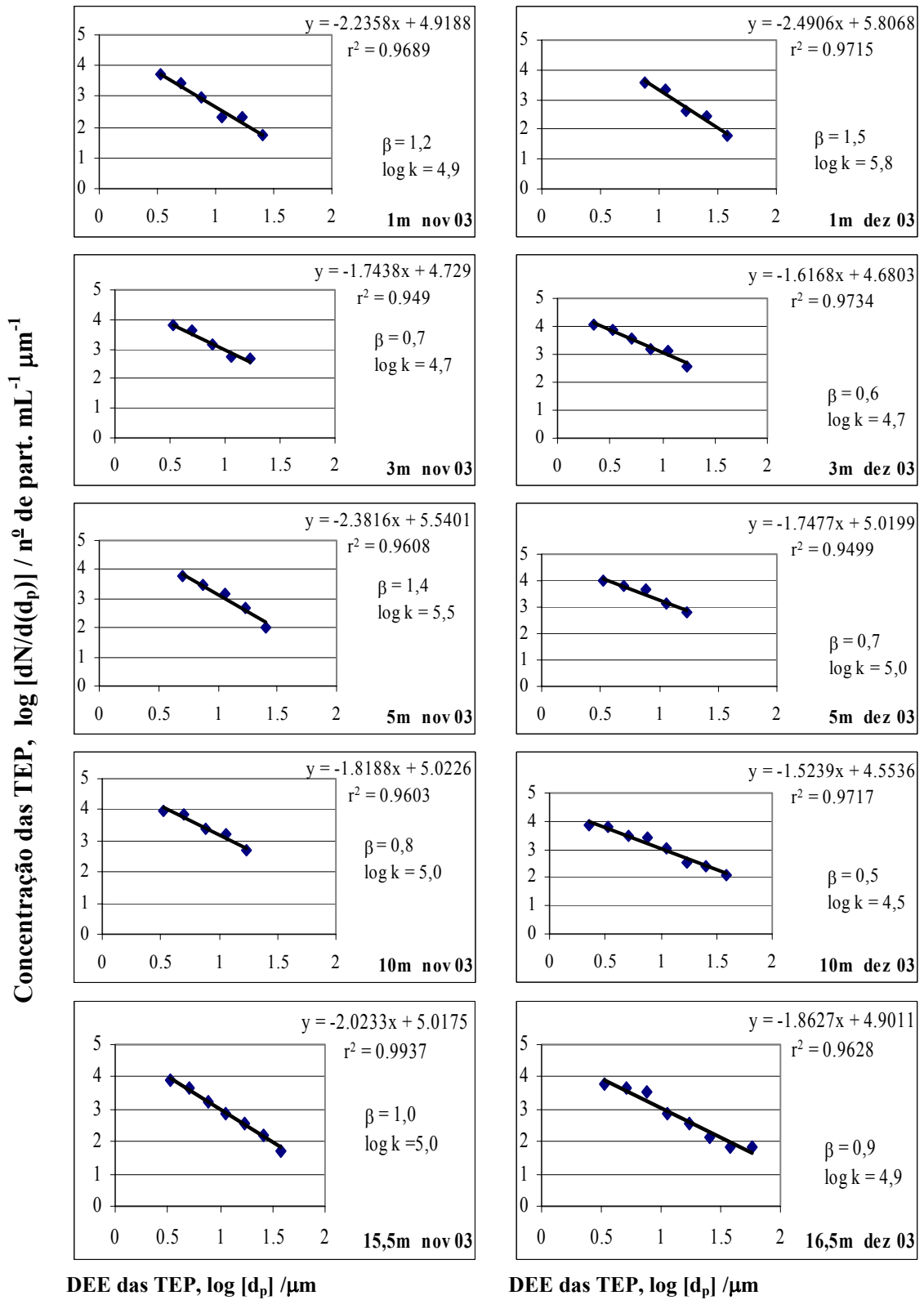


Figura 17 - continuação

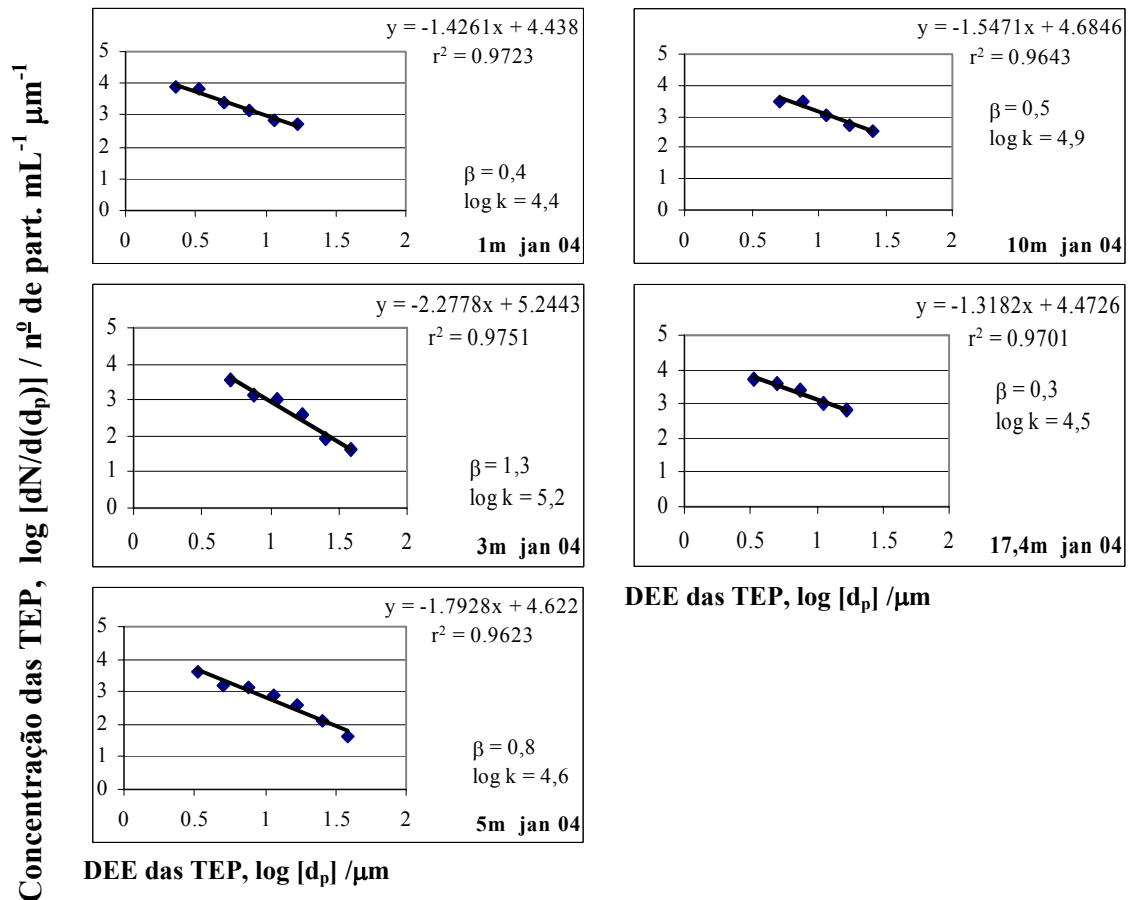


Figura 17 - continuação

A Tabela 9 apresenta a variação sazonal de β para as amostras coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita.

Como pode ser observado nas Figuras 9 ou 11a e Tabela 9, os menores valores médios de β foram encontrados nos meses de setembro de 2002 a janeiro de 2003 ($0,6 < \beta < 1,0$) e entre os meses de outubro de 2003 a janeiro de 2004 ($0,5 < \beta < 1,0$). Esses valores de β sugerem que nesses períodos mencionados há uma fração de partículas maiores, como discutido anteriormente. *Aulacoseira granulata*, *Anabaena spiroide* (BITTAR, 2005), *Cryptomonas tetropyrenoidose* (GIROLDO *et al.*, 2005; VIEIRA & CREPOLDI, em preparação) além de *Cyclotella sp*, como observado, são espécies muito abundantes em Barra Bonita, são grandes produtoras de TEP de grande tamanho, indicando assim que as mesmas devem ser as responsáveis pela produção destas partículas, uma vez que essas espécies

fitoplanctônicas foram dominantes nos períodos mencionados. No período entre fevereiro de 2003 e setembro de 2003, as espécies dominantes foram *Microcystis* sp; *Microcystis aeruginosa*, espécies responsáveis pela excreção e/ou produção das TEP de menor tamanho, ou seja valores médios de β maiores. Como pode ser observado, nesse período, o valor médio de β variou de 1,0 a 1,7, confirmando assim a predominância de uma fração maior de partículas menores.

Tabela 9 – Valores de β encontrados no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP.

	1m	3m	5m	10m	fundo	médias
set-02	0,8	0,4	0,9	0,7	1,2	0,8
out-02	0,9	1,1	1,2	1,0	0,6	1,0
nov-02	1,2	0,3	1,4	0,3	0,6	0,8
dez-02	0,6	0,2	0,9	1,2	0,2	0,6
jan-03	0,3	0,7	0,9	0,9	0,6	0,7
fev-03	1,0	1,3	1,0	1,4	1,0	1,1
mar-03	0,7	1,1	2,1	2,5	2,0	1,7
abr-03	1,8	1,6	2,5	1,8	0,8	1,7
mai-03	1,7	2,0	1,2	1,2	0,5	1,3
jun-03	1,7	1,2	1,4	1,5	1,5	1,5
jul-03	1,0	1,3	1,5	1,2	1,0	1,2
ago-03	1,5	1,2	1,0	0,6	0,9	1,0
set-03	1,3	2,1	1,7	1,6	1,2	1,6
out-03	1,0	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5
nov-03	1,2	0,7	1,4	0,8	1,0	1,0
dez-03	1,5	0,6	0,7	0,5	0,9	0,8
jan-04	0,4	1,3	0,8	0,5	0,3	0,7

Por outro lado, no período com menor volume de precipitação pluviométrica (50 mm), os maiores valores médios de β foram encontrados nos meses de março de 2003 a julho de 2003 ($1,1 < \beta < 1,7$), indicando assim um maior espectro por tamanho das TEP e a presença das TEP mais antigas (PASSOW 2002a).

Segundo KREMBS & ENGEL (2001), quanto maior for os valores dos coeficientes angulares das curvas obtidas de $\log [dN/d(d_p)]$ vs $\log[d_p]$, isto é, quanto maior for o valor de $-(\beta + 1)$, maior será o valor de β , ou maior será o espectro por tamanho das partículas encontradas no corpo d'água. Os valores de β determinados por diversos pesquisadores variaram de 0,7 a 2,7 em diversos corpos d'água (PASSOW, 2002a). No presente estudo, os valores individuais de β encontrados variaram de 0,2 (na profundidade de 3m em dezembro de 2002) a 2,5 (na profundidade de 10 m em março de 2003 e na profundidade de 5 m em abril de 2003). Segundo PASSOW (2002a), durante a fase de agregação de “blooms” de diatomáceas, o valor de β é em torno de 1, indicando uma diminuição da fração das partículas das TEP de menor tamanho. Os valores de β podem então ser empregados como um indicador do grau de agregação das partículas. Em outros processos, como aqueles da utilização pelas bactérias ou “grazing” do zooplâncton podem afetar o espectro de tamanho das partículas (PASSOW & ALLDREDGE, 1994). Por exemplo, “grazing” dos copépodes, resulta no aumento da fração das TEP de maior tamanho, aumentando desta maneira a distribuição das partículas para cima e a obtenção de coeficientes angulares maiores (PRIETO *et al.*, 2001).

Com relação aos valores de $\log k$ ou k , como discutido, essa constante está relacionada diretamente às concentrações das TEP no corpo d'água. Observando-se os valores de k médios calculados e apresentados na Tabela 10, os menores valores médios foram encontrados nos meses de julho de 2003 ($k= 2,40 \times 10^4$ partículas mL^{-1}), em outubro de 2003 ($k= 4,79 \times 10^4$ partículas mL^{-1}) e em janeiro de 2004 ($k= 6,69 \times 10^4$ partículas mL^{-1}). Os maiores valores de k médios encontrados foram nos meses de novembro de 2002 ($2,15 \times 10^6$ partículas mL^{-1}), março de 2003 ($3,86 \times 10^6$ partículas mL^{-1}), abril de 2003 ($2,75 \times 10^6$ partículas mL^{-1}), maio de 2003 ($3,08 \times 10^6$ partículas mL^{-1}) e setembro de 2003 ($1,69 \times 10^6$ partículas mL^{-1}). Esses valores de k médios encontrados são concordantes com aqueles da distribuição e abundâncias das TEP sazonais apresentados nas Figuras 11b e 12.

Tabela 10 – Valores de log k encontrados no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m; 3 m; 5 m; 10 m e fundo do reservatório de Barra Bonita, SP.

	1m	3m	5m	10m	fundo	médias
set-02	5,1	5,0	5,2	5,1	5,5	5,2
out-02	5,0	5,5	5,5	5,2	5,1	5,3
nov-02	5,5	5,0	6,0	5,3	5,2	5,4
dez-02	4,9	4,8	5,2	5,5	5,0	5,1
jan-03	4,6	5,0	5,0	5,3	4,9	5,0
fev-03	4,3	5,4	5,2	5,9	5,4	5,2
mar-03	4,3	5,1	5,9	7,2	6,4	5,8
abr-03	5,6	6,1	7,0	6,2	5,7	6,1
mai-03	5,6	5,9	5,1	5,2	4,8	5,3
jun-03	5,9	5,1	5,2	5,4	5,5	5,4
jul-03	4,1	4,2	4,6	4,3	4,5	4,3
ago-03	5,5	4,7	4,8	4,5	4,7	4,8
set-03	5,6	6,8	5,8	5,8	5,7	5,9
out-03	4,8	4,8	4,5	4,7	4,5	4,7
nov-03	4,9	4,7	5,5	5,0	5,0	5,0
dez-03	5,8	4,7	5,0	4,5	4,9	5,0
jan-04	4,4	5,2	4,6	4,9	4,5	4,7

5.7 Colonização das TEP por bactérias

As bactérias podem utilizar como fonte de carbono ou suporte mecânico polissacarídeos extracelulares (exopolissacarídeos), compostos liberados por quase todas as microalgas planctônicas e não planctônicas (FREIRE-NORDI & VIEIRA 1996; 1998; COLOMBO *et al.*,2004). As TEP podem formar com as bactérias um microambiente, uma vez que estas partículas proporcionam condições adequadas para o crescimento destes microrganismos.

Empregando-se o DAPI como reagente, MARI & KIØRBOE (1996) estimaram um erro de aproximadamente 4% na enumeração de bactérias aderidas às TEP com diâmetros

menores que 3 μm e um erro de aproximadamente 13% na enumeração de bactérias aderidas às TEP com diâmetros maiores que 30 μm .

De um conjunto de 5600 fotomicrografias obtidas das amostras de água coletadas no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 e nas profundidades de 1 m, 3 m, 5 m, 10 m e fundo, foram selecionadas algumas fotomicrografias objetivando mostrar as TEP com bactérias aderidas, bem como a dinâmica de colonização dessas partículas no corpo d'água do reservatório de Barra Bonita.

A Figura 18 apresenta duas fotomicrografias obtidas de um mesmo campo de amostra coletada em março de 2003 a 3 m, empregando-se microscopia de campo claro (Figura 18a) e microscopia de fluorescência (Figura 18b). Como mostrado, a TEP 1, localizada no centro do campo em estudo, apresentou uma área de 1412,13 μm^2 (diâmetro = 42,40 μm). Analisando-se a TEP 1 mostrada nesta mesma figura, pode-se observar que a mesma não foi tingida uniformemente pelo corante, sendo a região de cor mais escura aquela onde foi encontrada uma maior densidade de bactérias. Empregando-se a microscopia de fluorescência, foi possível contar 163 bactérias (Figura 18b). A TEP 2 apresentou uma área de 79,33 μm^2 (diâmetro = 10,05 μm) possuindo 17 bactérias aderidas e a TEP 3 apresentou uma área de 51,12 μm^2 (diâmetro = 8,07 μm) tendo 15 bactérias aderidas. Nessas duas partículas, pode também ser observada uma maior densidade bacteriana na região central das mesmas, indicando assim que essas partículas foram colonizadas há algum tempo, características das TEP mais antigas. Nesse campo foi ainda observado a presença de algumas dezenas de TEP de menor tamanho (diâmetros $\leq 2 \mu\text{m}$), contendo até duas bactérias aderidas em cada uma destas partículas.

A Figura 19 apresenta as fotomicrografias obtidas por microscopia de campo claro (Figura 19a) e por microscopia de fluorescência (Figura 19b) de amostra de água coletada na profundidade de 1 m em setembro de 2002. No campo claro, foram observadas mais de 30

TEP com diâmetros menores ou iguais a 3 μm sem bactérias aderidas. A TEP 1 em destaque e delimitada por linha vermelha, tem uma área de 6698 μm^2 e possui apenas 5 bactérias aderidas. A TEP 1 não é densa e tem um aspecto fibrilar, sendo que na micrografia de campo claro pode ser visto uma mancha clara que é destacada na micrografia por fluorescência (A). Por outro lado, a TEP 2 que é bem menor (116,47 μm^2) e mais densa que a TEP 1, possui 22 bactérias aderidas, mostrando assim a grande variabilidade em um mesmo campo das formas, aspectos e grau de colonização das partículas.

A Figura 20a apresenta uma fotomicrografia por fluorescência de uma TEP com área de 711,27 μm^2 e contendo 33 bacilos aderidos medindo de 3 a 5 μm de comprimento. Todas as TEP colonizadas por bacilos possuíam uma cor azul escuro, quando visualizadas por microscopia de fluorescência. Por outro lado, as TEP colonizadas por cocos ou por bactérias de diferentes morfologias apresentaram um aspecto esbranquiçado, diferença que pode estar relacionada à composição química dessas partículas. Esta TEP foi observada na lâmina contendo amostra de água coletada na profundidade de 3 m do mês de setembro de 2002. Ademais, outras TEP colonizadas com os mesmos bacilos foram também observadas nas amostras de água do mês de setembro de 2002 coletadas nas profundidades de 1 e 5 m.

A fotomicrografia mostrada na Figura 20b foi obtida empregando-se microscopia de campo claro. Essa TEP apresenta uma área de 1003,53 μm^2 , sendo que a região destacada pelo círculo vermelho é aquela ocupada por 12 bactérias contadas por microscopia de fluorescência e corresponde a uma área de 342,90 μm^2 .

TEP/bactérias parecem muitas vezes semelhantes a colônias de microalgas e podem ser confundidas na microscopia de fluorescência, uma vez que as bactérias na forma de cocos e as células de cianofíceas podem ter o mesmo tamanho e fluorescer com a mesma intensidade e tonalidade. A diferenciação dessas células pode ser feita empregando-se um filtro verde próprio na microscopia de fluorescência. A micrografia das células das microalgas

fitoplanctônicas fluorescem em tonalidade vermelha, enquanto as bactérias não aparecem na microscopia empregando-se aquele filtro.

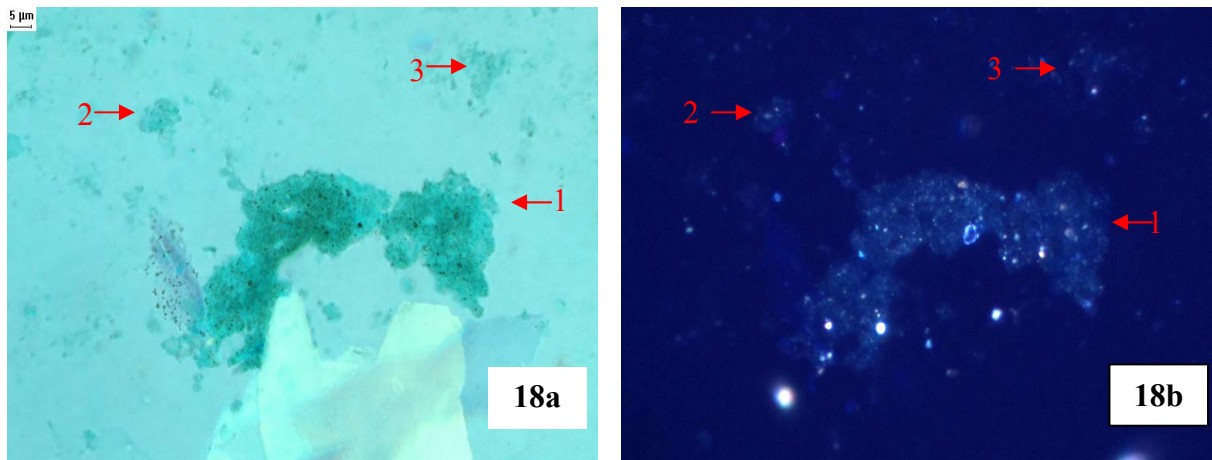


Figura 18 – Fotomicrografias de um mesmo campo (a) microscopia de luz clara e (b) microscopia de fluorescência, aumento de 1000X. Amostra coletada no reservatório de Barra Bonita, SP.

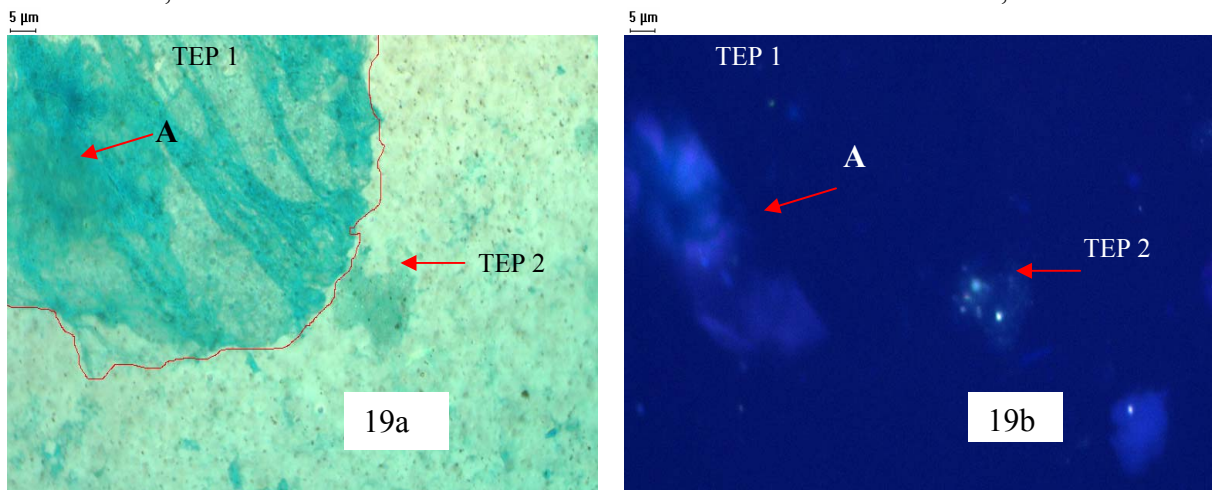


Figura 19 - Fotomicrografias obtidas de um mesmo campo de amostra de água coletada na profundidade de 1m em setembro de 2002, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência.

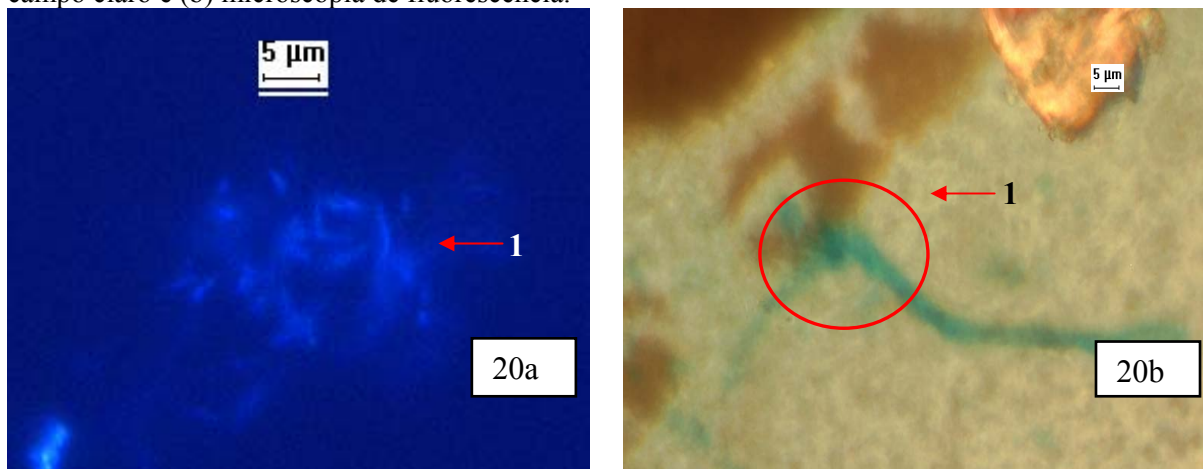


Figura 20 - Fotomicrografias obtidas de amostra de água coletada na profundidade de 3 m em setembro de 2002, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de fluorescência mostrando TEP com bacilos e (b) microscopia de campo claro mostrando TEP colonizada por bactérias na região em destaque.

A Figura 21 mostra as fotomicrografias obtidas na microscopia de fluorescência sem (Figura 21a) ou com o filtro verde (Figura 21b). Como pode ser observado nestas figuras, na fotomicrografia apresentada na Figura 21a aparece uma TEP (1) com área de $403,40 \mu\text{m}^2$ contendo aderidas 22 bactérias no formato de cocos. No entanto, a TEP não é observada na fotomicrografia obtida do mesmo campo da lâmina com o emprego do filtro verde.

A Figura 22 mostra as fotomicrografias obtidas na microscopia de fluorescência sem (Figura 22a) ou com o emprego do filtro verde (Figura 22b). Na Figura 22a é destacada por um círculo vermelho uma TEP aderida à colônia de *Microcystis* sp. A presença desta microalga foi tão dominante neste campo, que não foi possível medir a área das TEP e nem mesmo contar o número de bactérias agregadas nas partículas. As setas verdes mostradas na fotomicrografia 22b, indicam os lugares ocupados pelas TEP colonizadas por bactérias, sendo que as mesmas não foram observadas nesta fotomicrografia.

A Figura 23 mostra TEP aderidas a microalgas fitoplanctônicas. Na fotomicrografia 23a é destacada por um círculo vermelho uma TEP com área de $834,34 \mu\text{m}^2$ contendo 52 bactérias aderidas de diferentes formas (cocos, bacilos e espirilos) e tamanhos. Neste exemplo é apresentada uma TEP aderida a uma microalga fitoplanctônica (*Anabaena spiroides*).

A fotomicrografia 23b destaca uma TEP com área igual a $253,22 \mu\text{m}^2$ aderida a uma microalga filamentosa. A adesão das 12 bactérias em forma de cocos só na superfície da partícula, a não existência de bactérias ao centro da partícula..

A fotomicrografia 23c mostra em destaque uma TEP com área de $198,78 \mu\text{m}^2$ aderida a uma colônia de *Microcystis* sp (1). Por sua vez a TEP é colonizada por 21 bacilos. Ademais, nesse mesmo campo podem ser observadas outras microalgas. A fotomicrografia 23d mostra uma TEP com uma área de $1731,84 \mu\text{m}^2$ próxima de colônias de microalgas fitoplanctônicas, contendo, aderidas 55 bactérias de tamanho e formas diversificadas.

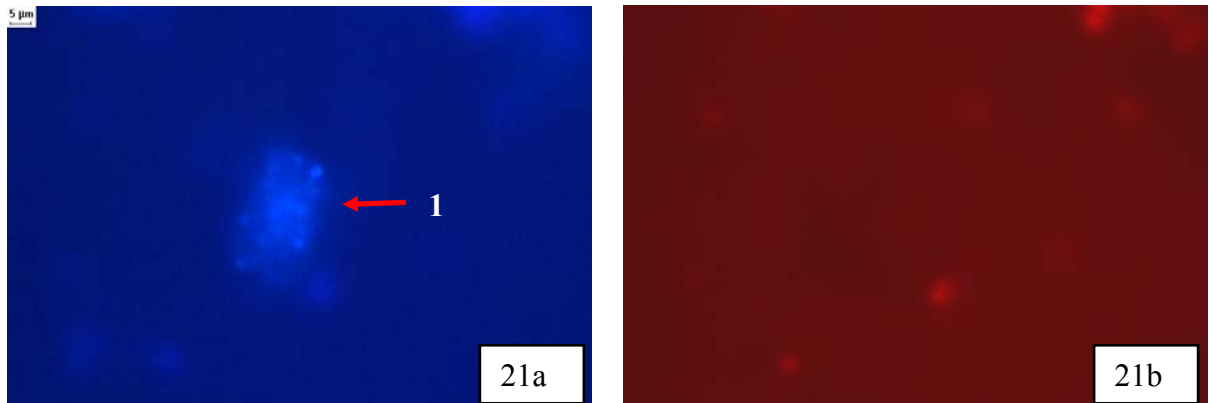


Figura 21 - Fotomicrografia de um mesmo campo, obtidas por microscopia de fluorescência (a) sem o filtro verde e (b) com o filtro verde, amostra de outubro de 2002 a 5 m.

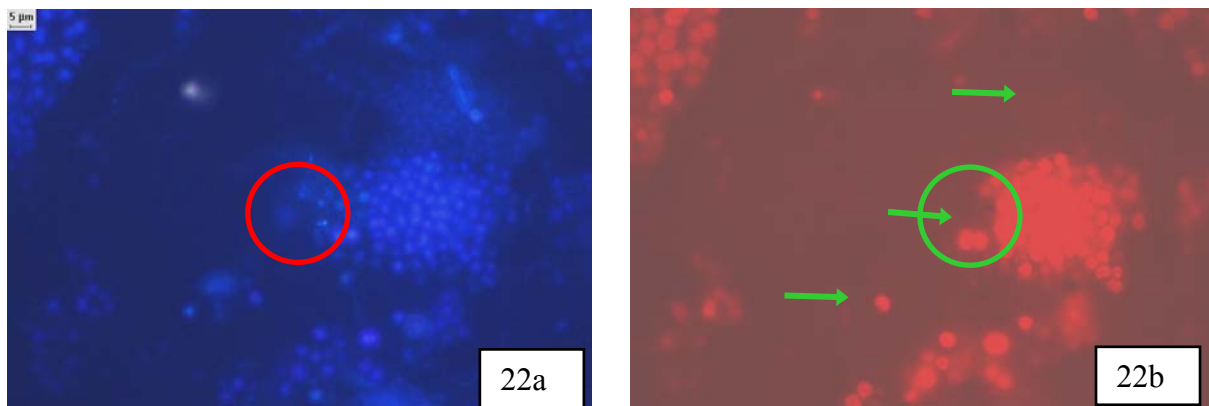


Figura 22 - Fotomicrografia feitas de um mesmo campo com amostra coletada no reservatório de Barra Bonita, SP., em outubro de 2002, a 3 m, obtidas por microscopia de fluorescência (a) sem o filtro verde e (b) com o filtro verde.

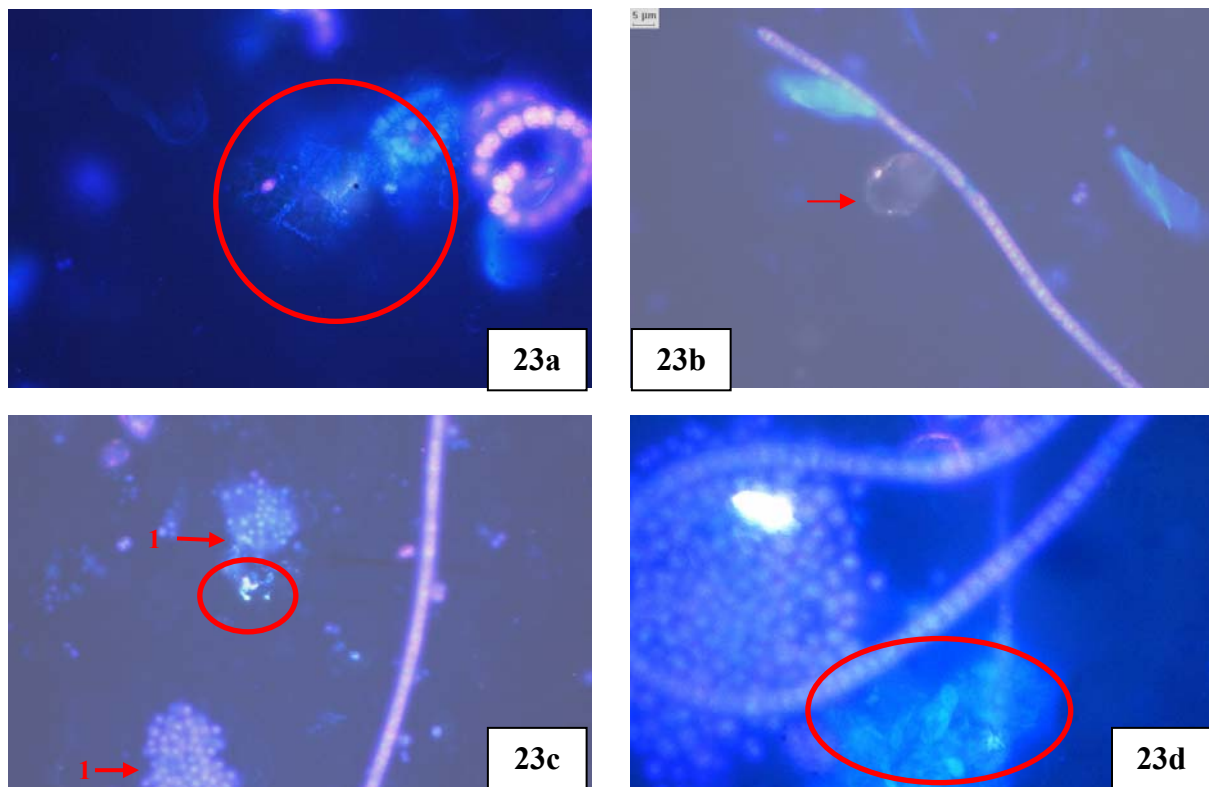


Figura 23 – Fotomicrografia das TEP aderidas a microalgas planctônicas, por microscopia de fluorescência. Amostras coletadas no reservatório de Barra Bonita, SP.

A Figura 24 apresenta duas fotomicrografias obtidas de uma mesma lâmina de amostra de água coletada na profundidade de 1 m no mês de novembro de 2002. Em destaque são apresentadas duas TEP de diferentes tamanhos e densidade de bactérias. Na fotomicrografia 24a a TEP possui uma área de $7,52 \mu\text{m}^2$ e contém 6 bactérias aderidas. Por outro lado, a fotomicrografia 24b possui uma TEP com área de $2105,45 \mu\text{m}^2$ e contém 193 bactérias aderidas, mostrando assim a diversidade de tamanho de partículas que podem coexistir em uma mesma amostra de água.

A fotomicrografia 24c mostra uma TEP com área de $164,29 \mu\text{m}^2$ contendo 29 bactérias aderidas na superfície da partícula. A fotomicrografia 24d apresenta no mesmo campo três TEP com tamanhos e quantidades de bactérias aderidas semelhantes: TEP (1) área $219,38 \mu\text{m}^2$ com 14 bactérias aderidas; TEP (2) área $238,12 \mu\text{m}^2$ com 17 bactérias aderidas e TEP (3) $279,19 \mu\text{m}^2$ com 24 bactérias aderidas.

As fotomicrografias mostradas na Figura 25 são de amostra de água coletada a 1 m em dezembro 2002. A Figura 25a mostra uma TEP com área total de $311,75 \mu\text{m}^2$, sendo que a área em destaque não foi colonizada por bactérias. O restante de sua área mostra a adesão de 16 bactérias na superfície da partícula, além de áreas maiores de geometrias não definidas que podem ser substâncias orgânicas (substâncias húmicas) adsorvidas que refletem luz azul prateada intensa. A fotomicrografia 25b mostra uma TEP com aspecto fibrilar que não possui bactérias aderidas em sua superfície, apesar de sua grande área ($\sim 4000 \mu\text{m}^2$). Foi observado neste trabalho que TEP com esse aspecto fibrilar geralmente não são colonizados por bactérias, uma vez que possuem pouca água na sua constituição e possuem propriedades físico-químicas distintas daquelas das TEP que são gelatinosas e pegajosas (PASSOW 2002a).

A Figura 26 mostra duas fotomicrografias de amostra de água coletada a 10 m em março de 2003. Na TEP 1 com área total de $176,94 \mu\text{m}^2$, destacada na fotomicrografia 26a,

pode ser observado colonização da TEP por 25 bactérias em apenas uma região dessa partícula. Nessa mesma fotomicrografia, a TEP 2 com área total de $296 \mu\text{m}^2$, possui 28 bactérias aderidas na área periférica da partícula, não havendo bactérias aderidas no centro. A fotomicrografia 26b mostra uma TEP com área total de $215,72 \mu\text{m}^2$ nessa mesma fotomicrografia e 32 bactérias aderidas na região central. Provavelmente as TEP formadas mais recentemente possuem bactérias na superfície da mesma enquanto que nas mais antigas, as bactérias geralmente ocupam maior área da partícula e também na parte interna da mesma.

A Figura 27 mostra fotomicrografias obtida de um mesmo campo de amostra de água coletada a 5 m em abril de 2003. Na fotomicrografia 27a é destacada uma TEP obtida por micrografia de campo claro e como pode ser observada esta partícula não foi tingida homogeneamente com o Alcian Blue, apresentando assim regiões com diferentes intensidades de cor. Empregando-se microscopia por fluorescência, essa TEP com área total de $1562,61 \mu\text{m}^2$ mostra possuir 32 bacilos aderidos na região a direita da partícula.

A Figura 28 apresenta duas fotomicrografias de microscopia de fluorescência obtidas de amostras de água coletadas a 5m (28a) e fundo (28b) em maio de 2003. Na fotomicrografia 28a, a TEP possui uma região mais escura no centro da mesma (ver seta vermelha) onde não houve adesão de bactérias. A área total dessa TEP é $124,32 \mu\text{m}^2$ tendo 54 cocos aderidos. As duas TEP mostradas na micrografia 28b possuem áreas de $1299,24 \mu\text{m}^2$ e $82,83 \mu\text{m}^2$ e há aderido 134 cocos e 12 cocos, respectivamente. Pode-se destacar assim que em ambas fotomicrografias não foi observada uma diversidade de formas de bactérias, sendo as três TEP colonizadas apenas por cocos.

As fotomicrografias mostradas na Figura 29 foram obtidas por microscopia de campo claro (29a) e por microscopia de fluorescência (29b) de amostra de água coletada a 3 m em junho de 2003. A TEP mostrada em (29a) apresentou área total de $1375,04 \mu\text{m}^2$ sendo que a partícula só foi colonizada por 40 bactérias na área em destaque, como pode ser também

observado na fotomicrografia (29b). Objetivando destacar a região colonizada pelas bactérias, essa região foi centralizada na foto.

As fotomicrografias apresentadas na Figura 30 foram obtidas em um mesmo campo por microscopia de campo claro (30a) e por microscopia de fluorescência (30b) de amostra de água coletada a 10 m em outubro de 2003. Na fotomicrografia (30a), de um total de 20 TEP, foram destacados 4 TEP com adesão de bactérias (TEP 1: 1355,74 μm^2 com 83 bactérias aderidas; TEP 2: 87,24 μm^2 com 4 bactérias aderidas; TEP 3: 192,54 μm^2 com 12 bactérias aderidas e TEP 4: 72,55 μm^2 com 6 bactérias aderidas). Como pode ser observado, essas partículas não são coloridas uniformemente e a colonização das bactérias foi distribuída por todas as áreas das TEP, como pode ser visto na fotomicrografia (30b).

Nas fotomicrografias correspondentes às amostras de águas dos demais meses estudados, não foram registradas grandes alterações e/ou observações que mereçam destaque, não sendo assim discutidos.

No presente trabalho foram enumeradas em média 2,0 % de partículas com diâmetros menores que 3 μm , 88,5 % de partículas com diâmetros entre 3 μm e 30 μm e 9,5% de partículas com diâmetros maiores que 30 μm . Desta maneira, pode-se admitir que o erro médio na enumeração de bactérias aderidas as TEP ficou na faixa de 8-10%.

No presente estudo foi encontrado que o número de bactérias aderidas por TEP variou de 1 bactéria TEP^{-1} a 235 bactérias TEP^{-1} , sendo que em alguns campos estudados não foram encontradas bactérias aderidas nas TEP. A ausência de bactérias em algumas TEP não afetou a média do número de bactérias aderidas por TEP, uma vez que essa ausência de bactérias não foi significativa. Ademais, a ausência de bactérias nas TEP pode ser um indicativo da formação recente destas partículas.

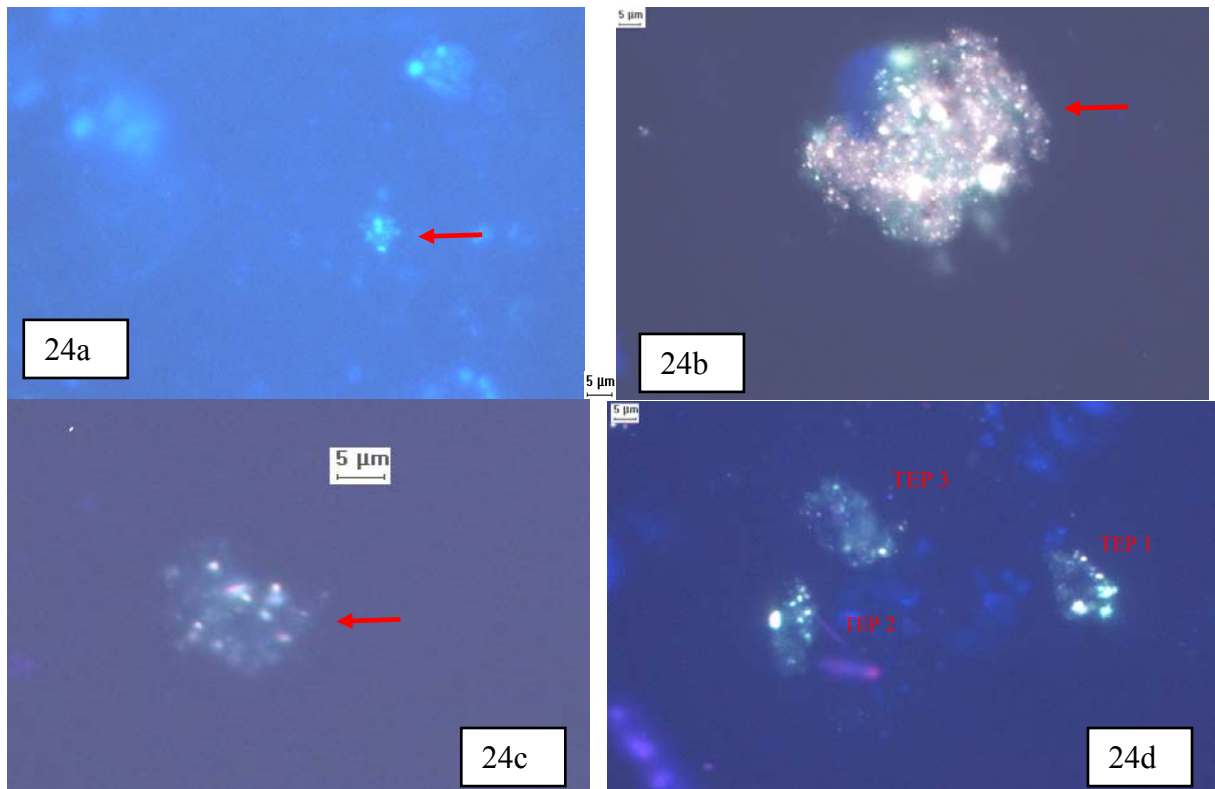


Figura 24 – Fotomicrografias das TEP, por microscopia de fluorescência, amostras coletadas em novembro de 2002 a 1 m, no reservatório de Barra Bonita, SP

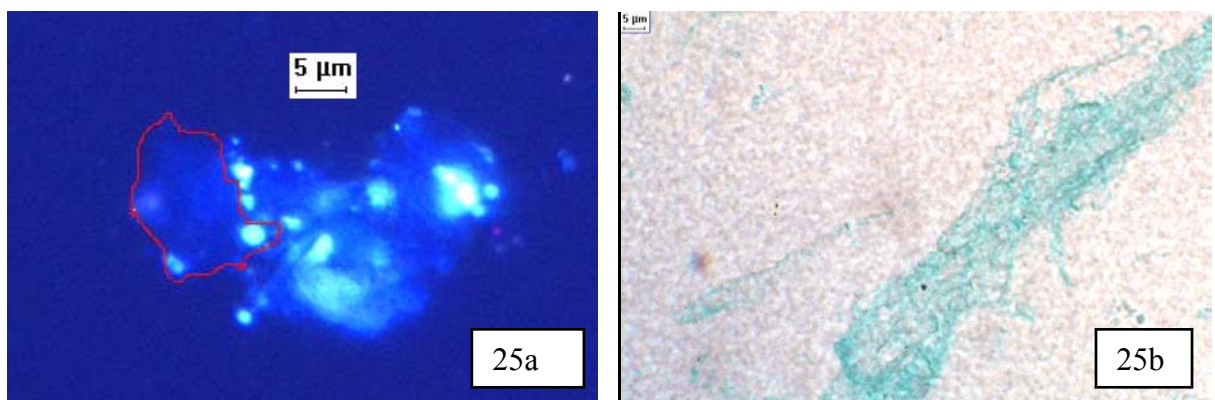


Figura 25 - Fotomicrografias das TEP, (a) microscopia de fluorescência e (b) microscopia de campo claro uma TEP com aspecto fibrilar que não possui bactérias, amostra coletada em dezembro de 2002 a 1 m, no reservatório de Barra Bonita, SP.

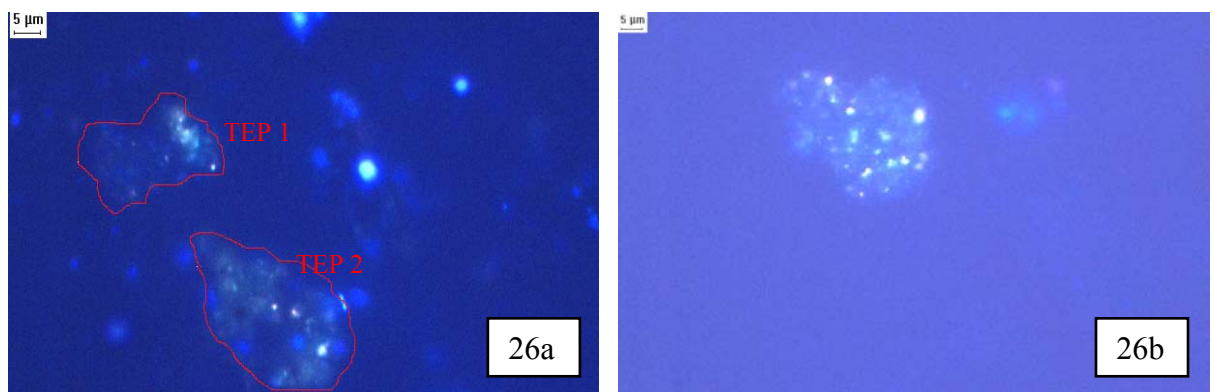


Figura 26 - Fotomicrografias das TEP, por microscopia de fluorescência, de amostra de água coletada em março de 2003 a 10 m, no reservatório de Barra Bonita, SP

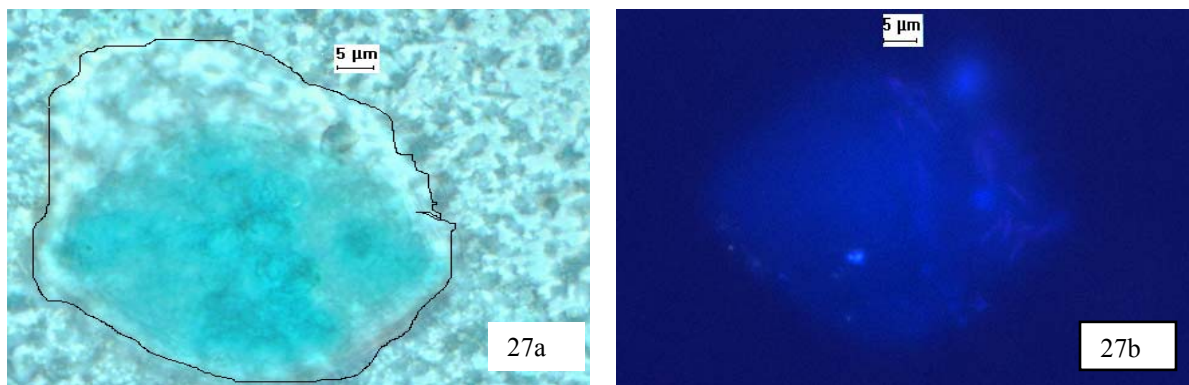


Figura 27 - Fotomicrografias obtidas de um mesmo campo de amostra de água coletada na profundidade de 5 m em abril de 2003, no reservatório de Barra Bonita, SP. (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência.

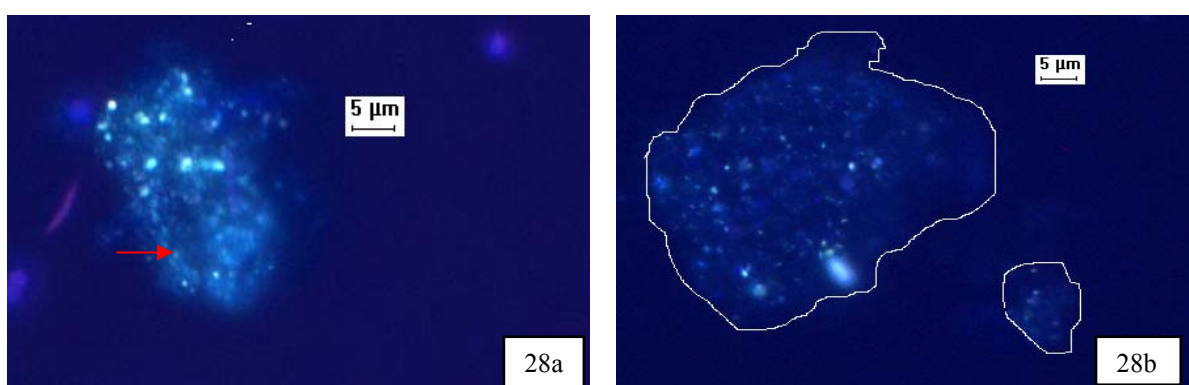


Figura 28 - Fotomicrografias de microscopia de fluorescência obtidas de amostras de água coletadas a 5m (a) e fundo (b) em maio de 2003, proveniente do reservatório de Barra Bonita, SP.

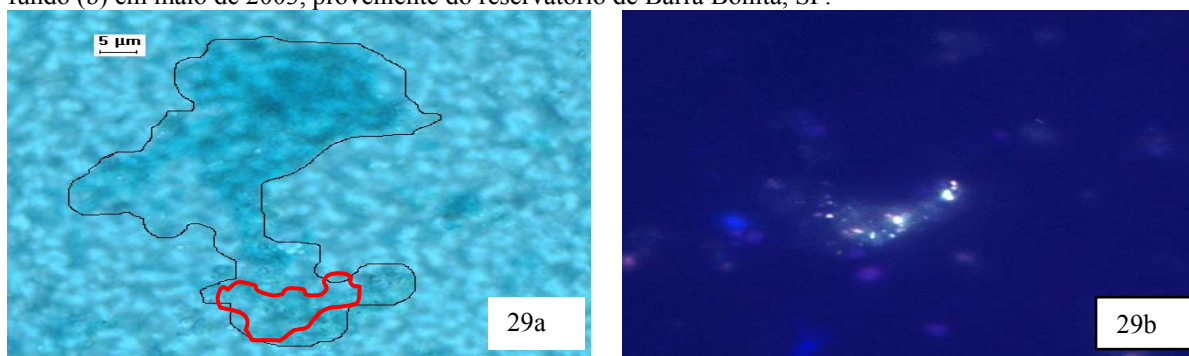


Figura 29 - Fotomicrografias de um mesmo campo, microscopia de campo claro (a) e microscopia de fluorescência (b). Amostra coletada em junho de 2003 (3 m), no reservatório de Barra Bonita, SP.

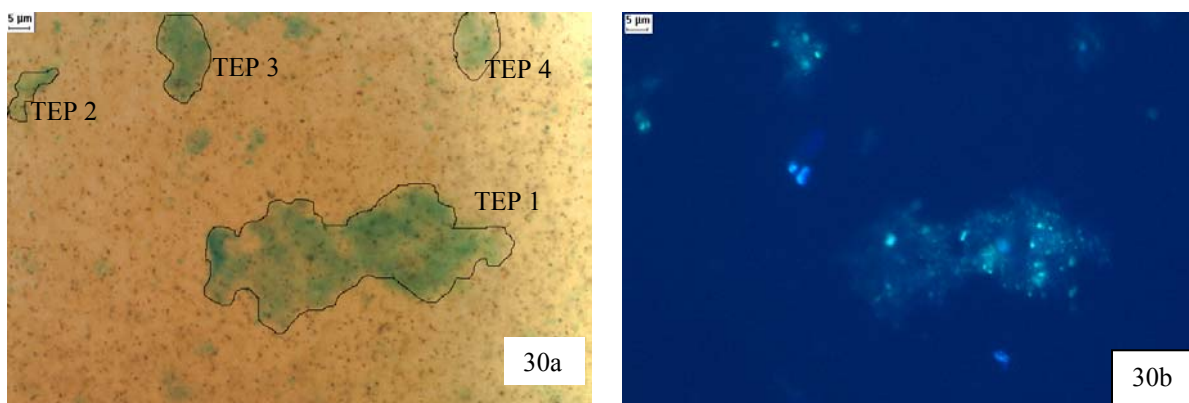


Figura 30 - Fotomicrografias de um mesmo campo, (a) microscopia de campo claro e (b) microscopia de fluorescência, amostra coletada a 10 m em outubro de 2003, no reservatório de Barra Bonita, SP.

Não há, descritos na literatura estudos relacionando a colonização das TEP em corpos de águas naturais de região tropical ou temperada da América do Sul, ficando prejudicada assim uma comparação da colonização das TEP por bactérias obtidas no presente trabalho. No entanto, PASSOW & ALLDREDGE (1994) estudando águas do Oceano Atlântico encontraram uma colonização das TEP por bactérias variando de 1 a 220 bactérias TEP⁻¹. Segundo essas pesquisadoras, a grande variabilidade da colonização das partículas de tamanho semelhante indica uma diferença no grau de colonização das TEP que está possivelmente relacionado com a diferença de idade ou com a composição química destas partículas.

A Figura 31 apresenta o número médio de bactérias aderidas a cada TEP (valor médio) no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. Como pode ser observado nesta figura, o número médio de bactérias por TEP variou de 9 bactérias TEP⁻¹ (novembro de 2003) a 47 bactérias TEP⁻¹ (novembro de 2002), sendo o número médio de bactérias igual a 26 bactérias TEP⁻¹.

Comparando os resultados apresentados na Figura 31 com os dados apresentados na Figura 9 ou 11a pode-se concluir que nos meses que sucedem o bloom da comunidade fitoplanctônica, que é a fase senescente dessa comunidade, há uma coincidência com o período onde as TEP colonizadas por bactérias são mais densas, pois nesta fase do crescimento há uma adição de produtos metabólicos, pedaços da cápsula e/ou a cápsula inteira no ambiente. A Figura 31 apresenta picos de partículas densamente povoadas como as dos meses de novembro de 2002 (47 bactérias TEP⁻¹), janeiro de 2003 (38 bactérias TEP⁻¹), fevereiro de 2003 (39 bactérias TEP⁻¹) e setembro de 2003 (38 bactérias TEP⁻¹), onde a quantidade média de bactérias por TEP pode estar relacionada à idade das TEP, a sua composição química e/ou a fase de crescimento nas populações fitoplanctônicas do ambiente.

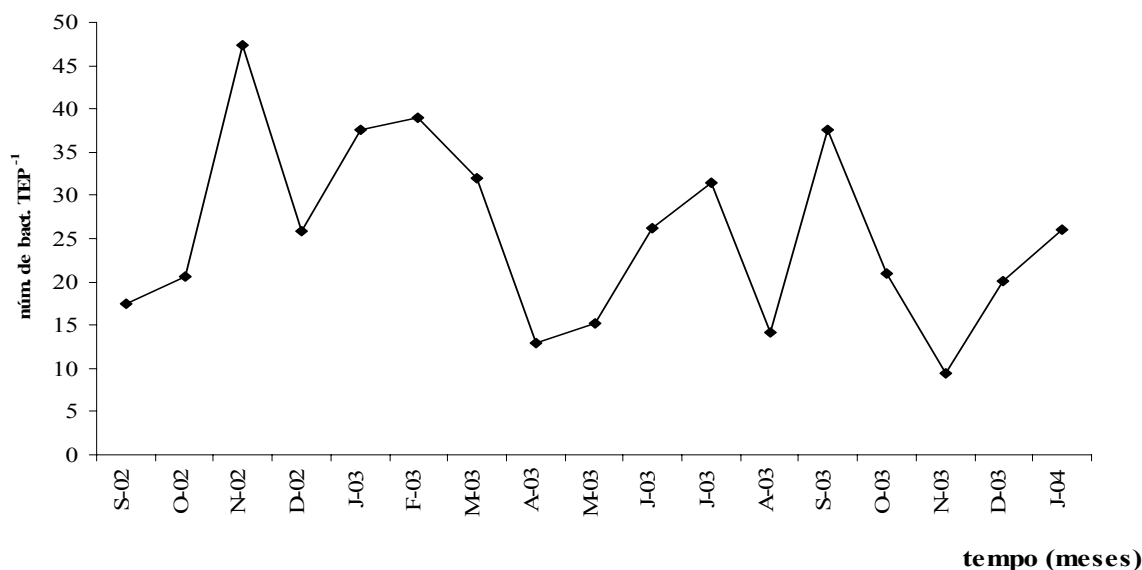


Figura 31 – Número médio de bactérias aderidas a cada TEP em amostras do reservatório de Barra Bonita, SP. (valor médio) no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

MARI & KIØRBOE (1996) encontraram um número médio de bactérias por TEP variando de 3 a 10 bactérias TEP⁻¹ em amostras de água de mar (Kattegat, Dinamarca) sendo que o β encontrado variou de 0,7 a 4,4. Como a variabilidade do tamanho das partículas foi maior que aquela encontrada por PASSOW & ALLDREDGE (1994) e também aquela encontrada no presente trabalho, o intervalo menor de número médio de bactérias aderidas por TEP poder estar relacionada com uma alta concentração das TEP em formação, que como visto, possui menor número de bactérias aderidas (PASSOW & ALLDREDGE, 1994; PASSOW, 2002a).

A Figura 32 apresenta a variação sazonal, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004, do número médio de bactérias aderidas por volume das TEP em mL (número de bactérias mL⁻¹ das TEP). Como pode ser observado nesta figura, o número de bactérias mL⁻¹ das TEP variou de $2,01 \times 10^{10}$ mL⁻¹ em novembro de 2002 a $7,25 \times 10^{10}$ mL⁻¹ em outubro de 2003, sendo o valor médio registrado no período estudado de $3,32 \times 10^{10}$ mL⁻¹.

Uma comparação dos resultados do número médio de bactérias aderidas por volume das TEP em mL (Figura 32) como os “bloom” das espécies fitoplanctônicas dominantes

(Figura 9 ou 11 a) indicou que os resultados são concordantes e portanto os “bloom” de cianofíceas e de diatomáceas coincidem com os meses onde número médio de bactérias aderidas por volume das TEP em mL.

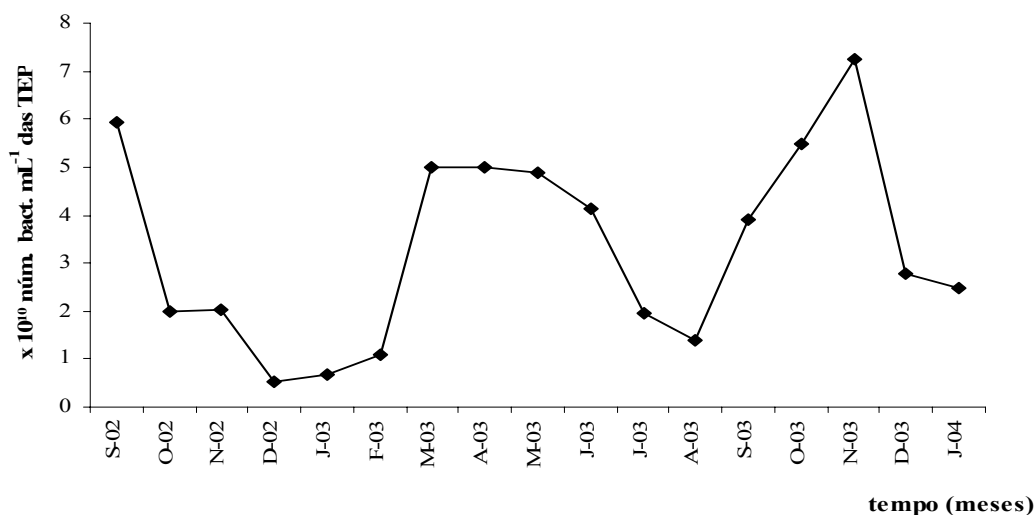


Figura 32 - Variação sazonal do número médio de bactérias aderidas por volume das TEP em mL, em amostras do reservatório de Barra Bonita, SP., no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

Um estudo da abundância de bactérias aderidas nas TEP durante a primavera de 1994 nas águas do Kattegat (Dinamarca), MARI & KIØRBOE (1996) encontraram uma população de bactérias variando de $4,0 \times 10^{10}$ a $1,3 \times 10^{11}$ bactérias mL⁻¹ das TEP. Como pode ser observado, a população de bactérias aderidas às TEP encontradas em nosso trabalho estão em boa concordância com a população de bactérias aderidas por mL das TEP encontrada no trabalho desenvolvido por esses pesquisadores.

A Tabela 11 mostra a variação da população de bactérias de vida livre e de bactérias aderidas no período estudado, bem como a percentagem de bactérias aderidas.

Tabela 11 - Variação das populações de bactérias de vida livre e de bactérias aderidas. Amostras do reservatório de Barra Bonita, SP., no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

tempo (meses)	Bactéria livre *	Bactérias aderidas as TEP	Porcentagem de bactérias aderidas
Set-02	7,39E+05	3,5E+05	32,4
Out-02	6,05E+05	4,1E+05	40,3
Nov-02	4,63E+05	1,9E+06	80,3
Dec-02	5,96E+05	7,3E+05	50,5
Jan-03	7,82E+05	1,1E+06	34,0
Fev-03	9,72E+05	1,3E+06	29,1
Mar-03	5,06E+05	2,7E+05	35,1
Abr-03	1,03E+06	2,1E+05	17,0
Mai-03	5,94E+05	2,7E+05	31,0
Jun-03	4,25E+05	3,9E+05	47,9
Jul-03	2,69E+05	9,3E+04	25,7
Ago-03	8,76E+05	6,5E+04	6,9
Set-03	7,60E+05	8,7E+05	53,4
Out-03	3,93E+05	5,8E+05	59,6
Nov-03	1,09E+06	2,1E+05	16,3
Dec-03	8,89E+05	3,3E+05	27,0
Jan-04	7,63E+05	4,6E+05	37,6

*A contagem das bactérias de vida livre foi feita pela doutoranda Vanessa Colombo.

A Figura 33 mostra como variam o número de bactérias de vida livre e o número de bactérias aderidas às TEP na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004. A comunidade de bactérias aderidas nas TEP variou de $6,5 \times 10^4$ por mL de amostra (agosto de 2003) a $1,9 \times 10^6$ por mL de amostra (novembro de 2002). Por outro lado, a população de bactérias de vida livre variou de $2,69 \times 10^5$ a $1,09 \times 10^6$ bactérias por mL de amostra.

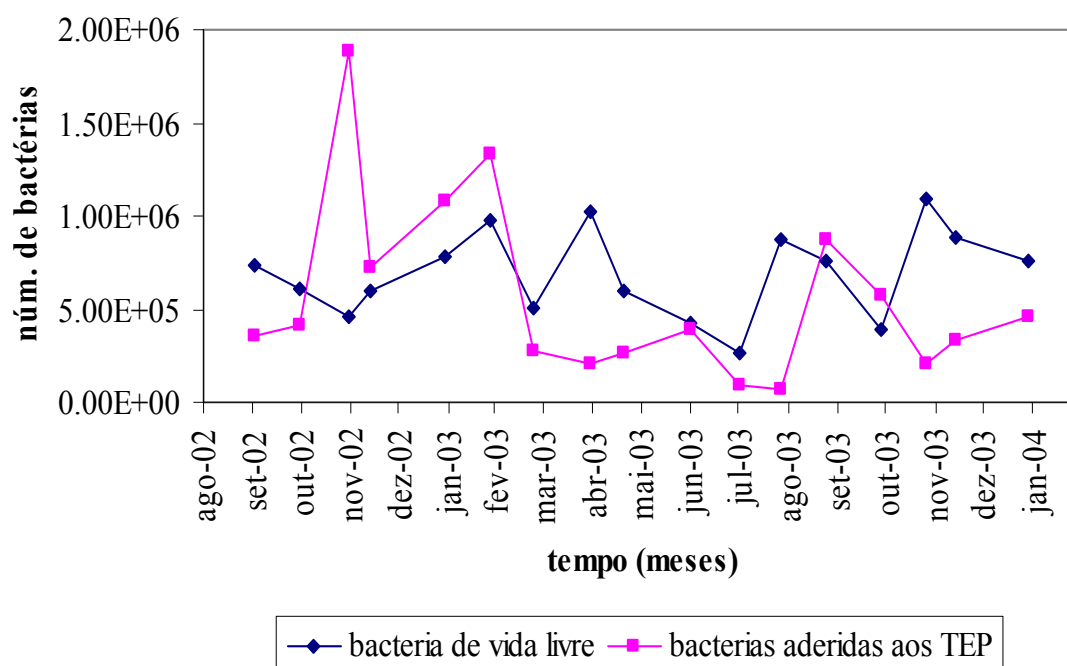


Figura 33 - Variação sazonal no número de bactérias de vida livre e o número de bactérias aderidas as TEP na coluna d'água do reservatório de Barra Bonita, no período de setembro de 2002 a janeiro de 2004.

CARRIAS *et al.* (2002), estudando dois lagos em diferentes estados tróficos, encontraram uma concentração variando de 10^7 a 10^8 bactérias L^{-1} (ou 10^4 a 10^5 bactérias mL^{-1}), teores esses menores que aqueles encontrados no presente trabalho.

Neste trabalho foi encontrada uma percentagem de bactérias aderidas variando de 6,9 % em agosto de 2003 a 80,3 % em novembro de 2002, em relação às bactérias totais (bactérias livres mais bactérias aderidas) (Tabela 11). ALLDREDGE *et al* (1993) estudando água de mar encontraram uma percentagem de bactérias aderidas variando de 28 % a 68% .

MARI *et al.*, (2004) estudando o comportamento das TEP na teia alimentar de microorganismos de água do mar de Noruega verificaram que as TEP servem de abrigo para a comunidade bacteriana. De acordo com as estimativas de 0,5 até 90% da comunidade bacteriana total podem estar aderidas às TEP. No entanto, o processo pelo qual as bactérias são aderidas a essas partículas ainda não é conhecido. Alguns estudos sugerem a agregação passiva que consiste da teoria de coagulação de MARI & KIORBOE (1996). Nessa teoria,

quando há um aumento de bactérias agregadas nas partículas, há uma diminuição de bactérias de vida livre. Outros pesquisadores têm mostrado que as bactérias podem colonizar ativamente as TEP quando essas afundam no corpo d'água (KIORBOE & JACKSON, 2001). Neste caso, há um crescimento do número de células sobre a superfície das partículas.

Finalmente, segundo PASSOW & ALLDREDGE (1994), todas as TEP estão associadas com as bactérias e há uma estreita relação entre o tamanho das TEP e o número de bactérias aderidas. No presente trabalho essas relações foram evidenciadas. Como discutido anteriormente, um aumento da população algal na coluna d'água no período de agosto a novembro de 2002 (Figura 9), levou a um aumento das concentrações e diversidade dos carboidratos (Figura 16) e da concentração das TEP nos meses posteriores (Figura 11 e 12). Assim, os maiores percentuais de bactérias aderidas foram encontrados nos meses de novembro e dezembro de 2002 (percentagens de 80,3 e 50,5 respectivamente) quando se registraram as maiores concentrações de carboidratos (Figura 16) e das TEP (Figura 11b e 12). Por outro lado, a menor percentagem de bactérias aderidas (6,9%) foi encontrada no mês de agosto de 2003, mês posterior àqueles onde foram registradas as menores concentrações de carboidratos (Figura 16) e também das TEP (Figura 11b e 12).

5.8 Adequação das técnicas de biologia molecular ao estudo de bactérias aderidas às TEP

5.8.1 Extração de DNA

Diversos protocolos de extração do 16s DNAr das amostras de água provenientes do Reservatório de Barra Bonita foram empregados neste trabalho. Devido à baixa concentração de bactérias aderidas às partículas das TEP, foram reunidas as cinco amostras de água

coletadas em diferentes profundidades em um mesmo mês. Assim, 17 amostras correspondentes ao período de setembro de 2002 a janeiro de 2004 foram processadas, além de mais 5 sub-amostras da amostra de água coletada no mês março de 2003, uma vez que nesse mês foi possível analisar separadamente as amostras coletadas em cada uma das profundidades. Um controle negativo e os dois controles positivos (10 e 30 μL respectivamente de *E. coli* BL21). Essa foi a metodologia adotada nesse trabalho por ser aquela que proporcionou alcançar resultados positivos para todas as amostras.

Cabe enfatizar que o estudo das melhores condições experimentais para a extração de DNA de bactérias e/ou o procedimento de amplificação de DNA por PCR de uma amostra ambiental não é tarefa fácil e de simples execução, uma vez que pequenas variações dos parâmetros experimentais envolvidos nestes dois procedimentos podem inviabilizar a extração de DNA bem como a obtenção das bandas dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose.

Os testes para verificar a eficiência das extrações de DNA foram feitos por eletroforese em gel de agarose 1,5% m/v aplicando-se potencial de 100 V por 50 min. Em todas as colunas foi constatada a presença de banda de DNA, indicando assim que a extração do DNA foi realizada com sucesso. Cabe ressaltar que a única coluna que não foi verificada a presença da banda de DNA foi aquela correspondente ao controle negativo.

5.8.2 Amplificação do DNA da comunidade microbiana agregada pela técnica de PCR e DGGE

Os “primers” ou iniciadores da reação de polimerização, para a amplificação do fragmento do DNA r 16S do Domínio *Bactéria* foram os seguintes: 968f (NUBEL *et al* 1996)

e 1401r (HEUER *et al* 1997). A utilização destes primers amplificou um fragmento do DNAr de aproximadamente 433 pares de base (pb), como mostra a Figura 33.

A Figura 34 mostra a eletroforese em gel de agarose 2% m/v obtida após a amplificação por PCR do 16S DNAr da comunidade pertencente ao Domínio *Bactéria*. A corrida foi feita em um aparelho de porte médio, tornando possível a análise de todas as amostras em um único gel, reduzindo desta maneira os erros envolvidos neste processo. Para a aplicação das 27 amostras (correspondentes as 22 amostras da água coletadas no reservatório, dois controles positivos, um controle negativo e o padrão de marcadores de massa molar (ladder) (L)), foi necessário a utilização de dois pentes representados pelas linhas A e B, sendo que cada pente possui 16 poços para a aplicação de até 15 μ L de amostra no tampão apropriado. Na linha A desta figura, a primeira coluna é aquela correspondente à da aplicação do ladder (L), sendo as colunas restantes, numeradas de 01 a 14, correspondentes às amostras dos meses de setembro de 2002 a outubro de 2003 (coluna 01: set. 02; coluna 02: out. 02; coluna 03: nov. 02; coluna 04: dez. 02; coluna 05: jan. 03; coluna 06: fev. 03; coluna 07: mar. 03; coluna 08: abr. 03; coluna 09: mai. 03; coluna 10: jun. 03; coluna 11: jul. 03; coluna 12: ago. 03; coluna 13: set. 03; coluna 14: out. 03). O segundo pente está representado pela linha B e foram aplicadas as amostras na seguinte ordem: coluna 01: nov. 03; coluna 02: dez. 03; coluna 03: jan. 04; coluna 04: 1 m mar. 03; coluna 05: 3 m mar. 03; coluna 06: 5 m mar. 03; coluna 07: 10 m mar. 03; coluna 08: fundo mar. 03; coluna 09: controle positivo 1 (10 μ L de *E. coli* BL21); coluna 10: controle positivo 2 (30 μ L de *E. coli* BL21); coluna 11: controle negativo e coluna 12: padrões de marcadores de massa molar (ladder) (L).

Nesta figura nota-se que a amplificação do fragmento de 440 pb do 16S DNAr foi bem sucedida, como indicado pelas bandas que apareceram nas colunas seguintes. Todas as bandas refletiram que o fragmento amplificado estava entre 400 e 500 pb do ladder, exceto para as amostras de: outubro de 2002; novembro de 2002; agosto de 2003; novembro de 2003; 10 m de março de 2003 e para o controle positivo 1 (10 μ L de *E. coli* BL21).

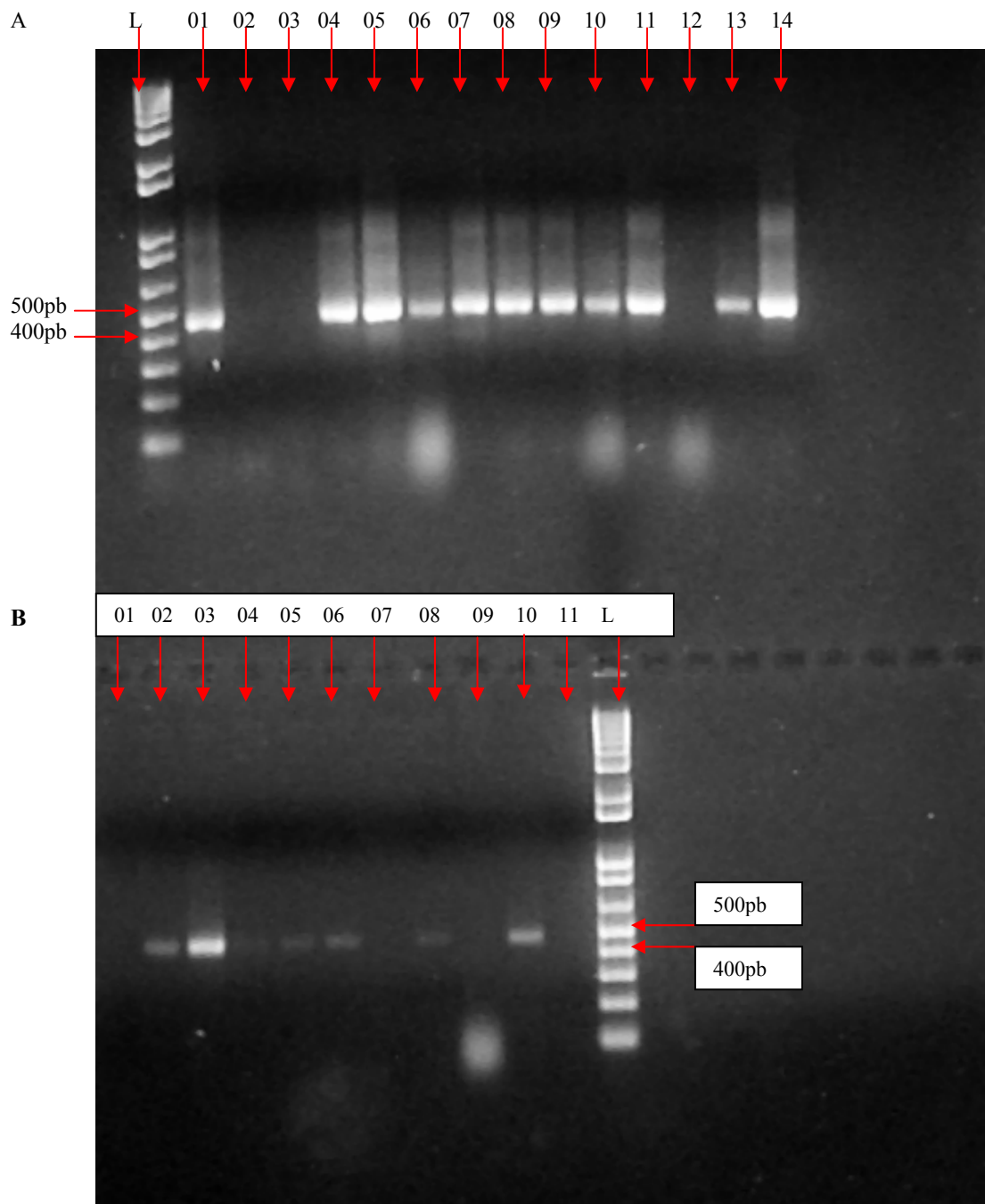


Figura 34 - Imagem do gel de agarose 2% mostrando a amplificação do 16S DNAr extraído da comunidade bacteriana pertencente ao Domínio Bactéria **Linha A**: coluna **L** ladder; coluna **01**: set. 02; coluna **02**: out. 02; coluna **03**: nov. 02; coluna **04**: dez. 02; coluna **05**: jan. 03; coluna **06**: fev. 03; coluna **07**: mar. 03; coluna **08**: abr. 03; coluna **09**: mai. 03; coluna **10**: jun. 03; coluna **11**: jul. 03; coluna **12**: ago. 03; coluna **13**: set. 03; coluna **14**: out. 03. **Linha B**: coluna **01**: nov. 03; coluna **02**: dez. 03; coluna **03**: jan. 04; coluna **04**: 1 m mar. 03; coluna **05**: 3 m mar. 03; coluna **06**: 5 m mar. 03; coluna **07**: 10 m mar. 03; coluna **08**: fundo mar. 03; coluna **09**: controle positivo 1 (10 μ L de *E. coli* BL21); coluna **10**: controle positivo 2 (30 μ L de *E. coli* BL21); coluna **11**: controle negativo e coluna **L**: ladder.

Posteriormente repetiu-se o PCR e o gel de agarose 2% m/v para estas amostras com resultado negativo e novamente não apareceu nenhuma banda, de onde se pode concluir que o fragmento de DNA se perdeu ao ser manipulado durante o processo de extração e/ou no caso das amostras de agosto de 2003, de 10 m de março de 2003 e do controle positivo 1 (10 µL de *E. coli* BL21) a quantidade de material conseguido pela extração foi insuficiente para realizar a amplificação pelo método do PCR. Como não havia mais amostra disponível, não foi possível repetir este experimento. Todas as bandas podem ser visualizadas com uma forte intensidade de cor exceto na linha B, a amostra correspondente às coletas de 1 m, 3 m, 5 m e fundo, onde aparecem bandas com menor intensidade, talvez devido à pouca quantidade do DNA presente nestas amostras. No trabalho de PICKUP *et al.* (1995), há a sugestão de que se trabalhe com mais de 800 L de amostra de água natural, o que seria inviável neste trabalho, dada a distância entre do reservatório de Barra Bonita e o laboratório de Ficologia e também as condições de trabalho para a filtração tangencial.

5.8.3 Dados preliminares sobre a diversidade de bactérias aderidas às TEP empregando a técnica do DGGE

A técnica do DGGE permite uma análise direta do DNA genômico de organismos, podendo utilizar um fragmento específico de um grupo ou de grupos de organismos de interesse. No presente estudo o fragmento de DNAr 16S utilizado foi produto do emprego da técnica do PCR utilizando primers universais. O primer f (forward) teve acoplado na extremidade 5' um grampo GC (com cerca de 35 bases), esse grampo impediu a completa dissociação das fitas. Desta maneira, o fragmento inteiro desnatura como um domínio único e pára de migrar quando encontra seu mT (melting temperature) no gel. A análise direta do DNA apresenta informações relevantes do número de diferentes genomas em amostras

naturais, embora não forneça qualquer informação sobre a identidade dos indivíduos dessa comunidade (TESKE *et al.*, 1996).

Na técnica do DGGE foram utilizadas as amostras correspondentes aos meses de dezembro de 2002, janeiro, março, abril, maio, junho, julho, setembro, outubro, dezembro de 2003 e janeiro de 2004. Essas amostras foram as que apresentaram um fragmento do DNAr 16S amplificado pelo PCR e confirmado em gel de agarose. O fragmento amplificado possui aproximadamente 440 pb e os primers utilizados foram específicos para organismos da comunidade pertencente ao Domínio *Bactéria*.

Os géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA foram confeccionados para se estabelecer as melhores condições de trabalho para as amostras de água natural provenientes do reservatório de Barra Bonita, e as melhores condições estabelecidas foram para os géis com gradientes de 45-60% e de 45-65%.

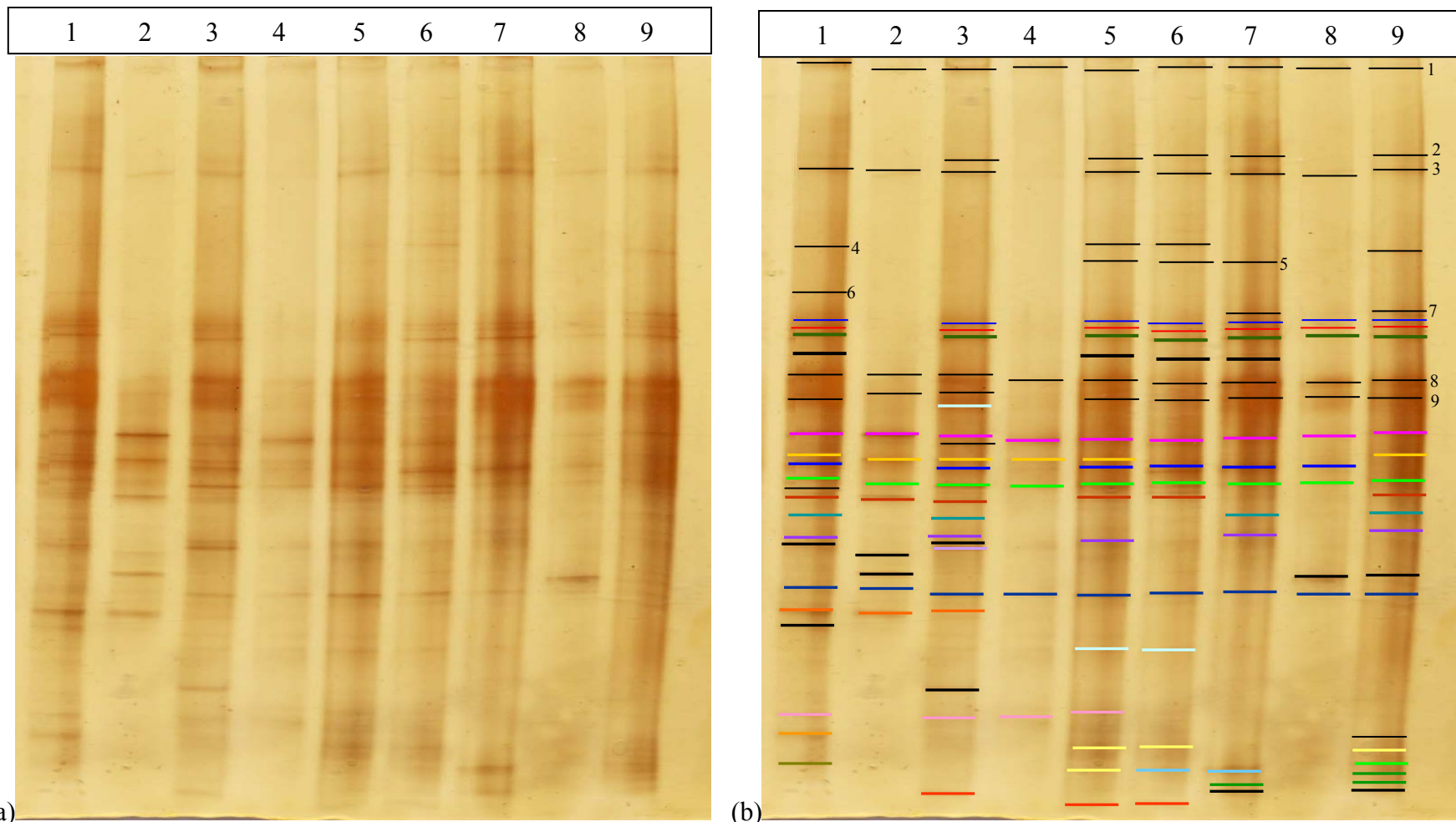
A Figura 35 mostra o gel de poliacrilamida com um gradiente desnaturante de 45 a 60%. Como pode ser observado, para as amostras de água correspondentes aos meses de dezembro de 2002, janeiro, março, abril, maio, junho, julho, setembro e outubro de 2003, o gel apresentou o padrão de diversidade bacteriana aderida às TEP. As bandas localizadas em uma mesma linha horizontal devem corresponder a uma mesma espécie bacteriana e podem estar ou não (bactérias de vida livre) aderidas às TEP. Para facilitar a visualização das bandas que apareceram no gel, foram traçadas manualmente linhas (Figura 35b) que correspondem às bandas obtidas, sendo que as cores ou numeração devem corresponder a uma mesma espécie de bactéria. A aplicação da amostra seguiu a seguinte ordem: coluna 1 – out 03, coluna 2 – set 03, coluna 3 – jul 03, coluna 4 – jun 03, coluna 5 – mai 03, coluna 6 – abr 03, coluna 7 – mar 03, coluna 8 – jan 03 e coluna 9 – dez 02.

A Figura 36 apresenta o gel de poliacrilamida com um gradiente desnaturante 45-65%. Para as amostras de água coletadas e aplicadas no gel na coluna 1 – jan 04, coluna 2 – dez 03,

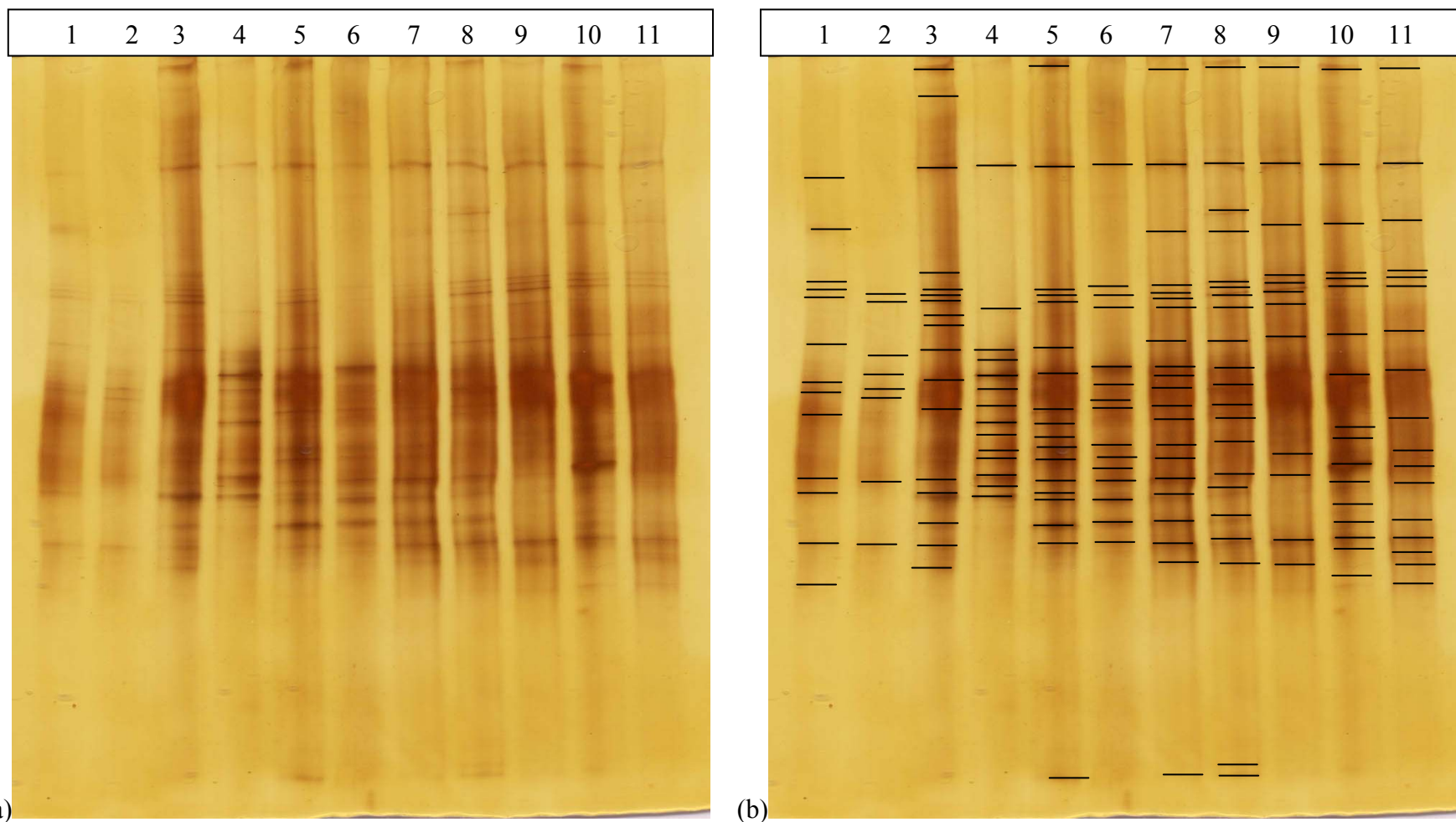
coluna 3 – out 03, coluna 4 – set 03, coluna 5 – jul 03, coluna 6 – jun 03, coluna 7 – mai 03, coluna 8 – abr 03, coluna 9 – mar 02, coluna 10 – jan 03 e coluna 11 – dez 02 foi obtido o padrão de diversidade das bactérias que podem estar aderidas as TEP.

Observando esses géis pode-se concluir que nos meses de dezembro de 02, abril de 03, maio de 03 e outubro de 03 um maior número de bandas foi visualizada, e o menor número de bandas nos meses de janeiro de 03, junho de 2003, dezembro de 2003 e janeiro de 2004. De uma maneira ideal, uma banda observada no gel corresponde a uma linhagem de bactérias. Entretanto duas ou mais bandas têm sido detectadas para algumas linhagens. Por outro lado, algumas bandas como na Figura 35 as bandas 3, 4, 11, 12, 13, 16 e 21 e na Figura 36 as bandas 4, 11, 12, 13 e 21, podem ser observadas na mesma altura do gel em diferentes colunas sugerindo que uma mesma linhagem possa estar presente em diferentes meses.

O uso do DGGE tem cada vez mais demonstrada sua utilidade e aplicação não apenas na caracterização de uma comunidade complexa, como também no estudo da dinâmica de populações específicas em função das condições ambientais (HEUER *et al.* 1997). Essa técnica utilizada na análise direta de amostras ambientais tenta, também, superar as limitações impostas pelas técnicas tradicionais de isolamento e cultivo de microrganismos. Estudos têm demonstrado que o isolamento e cultivo de microrganismos podem não representar aqueles mais dominantes e significativos nas respectivas amostras ambientais (GIOVANNONI *et al.* 1990). Nesse sentido, nosso trabalho tem um papel importante, uma vez que é um trabalho pioneiro na utilização das técnicas moleculares do PCR/DGGE no estudo e conhecimento da dinâmica das bactérias agregadas às TEP no reservatório de Barra Bonita. Para uma caracterização e identificação dessa comunidade há a necessidade de realizar o sequenciamento destas populações, trabalho esse extenso e laborioso e que não objeto de estudo do presente trabalho de tese.



(a) (b)
Figura 35 – Gel de poliacrilamida (45-60 %), mostrando a dinâmica de diversidade bacteriana aderidas às TEP, resultado da técnica do DGGE. (a) gel de poliacrilamida e (b) gel com traços manuais. Coluna 1 – out 03; coluna 2 – set 03; coluna 3 – jul 03; coluna 4 – jun 03; coluna 5 – mai 03; coluna 6 – abr 03; coluna 7 – mar 03; coluna 8 – jan 03 e coluna 9 – dez 02.



(a) **Figura 36** - Gel de poliacrilamida (45-65 %), mostrando a dinâmica de diversidade bacteriana aderidas às TEP, resultado da técnica do DGGE. (a) gel de poliacrilamida e (b) gel com traços manuais. Coluna 1 – jan 04, coluna 2 – dez 03, coluna 3 – out 03, coluna 4 – set 03, coluna 5 – jul 03, coluna 6 – jun 03, coluna 7 – mai 03, coluna 8 – abr 03, coluna 9 – mar 02, coluna 10 – jan 03 e coluna 11 – dez 02

6 CONCLUSÕES

Baseando-se na formação de par-iônico insolúvel entre as TEP e o Alcian Blue nas melhores condições experimentais estabelecidas neste trabalho (pH = 4; concentração da solução de Alcian Blue = $3,0 \times 10^{-3}$ % m/v (concentração final)), a curva calibração obtida foi linear no intervalo de concentração de goma de xantana de 0,50 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($A = 0,34 - 0,037 [GX]$; $r^2 = 0,9999$), onde A representa a absorvância e [GX] a concentração de goma de xantana em $\mu\text{g mL}^{-1}$, com um limite de detecção (LD) de $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O procedimento espectrofotométrico desenvolvido neste trabalho se mostrou útil e de extrema importância na determinação da concentração das TEP envolvendo um número elevado de amostras de água natural, devido a sua simplicidade e velocidade analítica, além do mesmo apresentar melhor exatidão e precisão.

Durante as observações e enumerações por microscopia de luz clara, as TEP apresentaram aspectos e/ou formas diversificadas. As TEP podem apresentar formas esférica, retangular, de “nuvem”, de fibras, de um “rendado” e também sem formas definidas ou irregulares. A intensidade do tingimento destas partículas pelo Alcian Blue depende das características físico-química das TEP e também de espécies inorgânicas e orgânicas ou células aderidas às mesmas. No caso das TEP com os grupos carboxílicos e sulfatos protonados, essas partículas não são tingidas pelo reagente colorimétrico.

A abundância das TEP no reservatório apresentou correlação com a abundância do fitoplâncton sugerindo que a formação das TEP está relacionada à produção de exopolímeros liberados por algas e cianobactérias. Os gêneros *Microcystis* sp, *Anabaena* sp, *Aulacoseira* sp e *Cyclotella* sp foram as mais frequentemente encontradas aderidas às TEP.

Uma comparação dos resultados obtidos empregando-se o método espectrofotométrico proposto neste trabalho e o método por microscopia de luz branca mostrou que as concentrações das TEP se correlacionam significativamente e linearmente: $TEP_{microsc} = 0,46 + 3,51 TEP_{espectr}$ e o $r^2 = 0,8459$, onde $TEP_{microsc}$. A correlação das abundâncias das TEP obtidas empregando-se os dois métodos analíticos é significativa para amostras coletadas em apenas 6 meses, onde se obteve $r^2 \geq 0,5100$, sendo os coeficientes de determinação menores que esse valor nos meses restantes.

Uma comparação entre os valores de volumes obtidos das TEP e abundância destas partículas obtidas por microscopia de luz branca indicou uma baixa correlação vertical entre os valores obtidos neste trabalho. No entanto, uma comparação da variação sazonal das concentrações volumétricas na coluna d'água das TEP (mL de TEP por m³ de água) com as concentrações das TEP (equiv. GX $\mu\text{g mL}^{-1}$) e concentrações das TEP (partículas mL⁻¹) mostrou excelente concordância entre estes teores para a maioria dos meses estudados.

Contrariando resultados descritos na literatura, nem todas as TEP têm bactérias aderidas e a quantidade de bactérias aderidas não necessariamente é diretamente proporcional ao volume das TEP e que a fase senescente da comunidade fitoplanctônica coincide com o período onde as TEP colonizadas por bactérias são mais densas, como verificado no mês de novembro de 2002.

As análises moleculares (PCR/DGGE) evidenciaram um padrão de diversidade bacteriana que podem estar aderidas as TEP e pode-se concluir que diversas linhagens de bactérias colonizam as TEP de uma mesma coleta.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIS, M.; UNANUE, M.; IRIBERRI, J. e HERNDL, G. J. (1998). Bacterial colonization and ectoenzymatic activity in phytoplankton-derived model particles. Part II. Cleavage and uptake of carbohydrates. *Microbial Ecology* **36**(1): 66-74.
- ALLDREDGE, A. L. e GOTSCHALK, C. C. (1990). The Relative Contribution of Marine Snow of Different Origins to Biological Processes in Coastal Waters. *Continental Shelf Research* **10**(1): 41-58.
- ALLDREDGE, A. L.; PASSOW, U. e LOGAN, B. E. (1993). The Abundance and Significance of a Class of Large, Transparent Organic Particles in the Ocean. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **40**(6): 1131-1140.
- ALLDREDGE, A. L. e SILVER, M. W. (1988). Characteristics, Dynamics and Significance of Marine Snow. *Progress in Oceanography* **20**(1): 41-82.
- AMANN, R.I.; STROMLEY, J.; DEVEREUX, R.; KEY, R. & STAHL, D.A. 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(2): 614-623.
- AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYERREIL, L. A. e THINGSTAD, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology-Progress Series* **10**(3): 257-263.
- AZETSU-SCOTT, K. e NIVEN, S. E. H. (2005). The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the transport of Th-234 in coastal water during a spring bloom. *Continental Shelf Research* **25**(9): 1133-1141.
- AZETSU-SCOTT, K. e PASSOW, U. (2004). Ascending marine particles: Significance of transparent exopolymer particles (TEP) in the upper ocean. *Limnology and Oceanography* **49**(3): 741-748.
- BARTHEL, K. G.; SCHNEIDER, G.; GRADINGER, R. e LENZ, J. (1989). Concentration of Live Picoplankton and Nanoplankton by Means of Tangential Flow Filtration. *Journal of Plankton Research* **11**(6): 1213-1221.
- BEAUVAIS, S.; PEDROTTI, M. L.; VILLA, E. e LEMEE, R. (2003). Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology-Progress Series* **262**: 97-109.

- BERKENHEGER, I. e FISCHER, U. (2004). Competition for polymers among heterotrophic bacteria, isolated from particles of the equatorial Atlantic. *International Microbiology* **7**(1): 13-18.
- BERMAN, T. e VINER-MOZZINI, Y. (2001). Abundance and characteristics of polysaccharide and proteinaceous particles in Lake Kinneret. *Aquatic Microbial Ecology* **24**(3): 255-264.
- BITTAR, T. B. (2005). Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de três espécies de microalgas isoladas do Reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê/SP). Dissertação (Mestrado em ecologia e recursos naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BLOEM, J. (1995). Molecular Microbial Ecology Manual. Cap.4 *Fluorescent staining of microbes for total direct counts*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 4.1.8: 1-13.
- BOCHDANSKY, A. B. e HERNDL, G. J. (1992). Ecology of Amorphous Aggregations (Marine Snow) in the Northern Adriatic Sea .5. Role of Fecal Pellets in Marine Snow. *Marine Ecology-Progress Series* **89**(2-3): 297-303.
- BRACHVOGEL, T.; SCHWEITZER, B. e SIMON, M. (2001). Dynamics and bacterial colonization of microaggregates in a large mesotrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology* **26**(1): 23-35.
- CARRIAS, J. F.; SERRE, J. P.; SIME-NGANDO, T. e AMBLARD, C. (2002). Distribution, size, and bacterial colonization of pico- and nano-detrital organic particles (DOP) in two lakes of different trophic status. *Limnology and Oceanography* **47**(4): 1202-1209.
- COLOMBO, V., VIEIRA, A. A. H. e MORAES, G. (2004). Microbial degradation of the extracellular polysaccharides produces by *Aanabaena spiroides* (Cyanobacteria). *Revista de Microbiologia*. **35**: 110-116.
- CORZO, A., MORILLO, J. A., e RODRIGUEZ, S. (2000). Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitran* under nitrogen limitation. *Aquatic Microbial Ecology* **23**(5): 63-72.
- DECHO, A. W. (1990). Microbial Exopolymer Secretions in Ocean Environments - Their Role(S) in Food Webs and Marine Processes. *Oceanography and Marine Biology* **28**: 73-153.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. e SMITH, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**(3): 350-356.
- ENGEL, A. (2002). Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymer particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research* **24**(1): 49-53.
- ENGEL, A. (2000). The role of transparent exopolymer particles (TEP) in the increase in apparent particle stickiness (alpha) during the decline of a diatom bloom. *Journal of Plankton Research* **22**(3): 485-497.
- ENGEL, A.; DELILLE, B.; JACQUET, S.; RIEBESELL, U.; ROCHELLE-NEWALL, E.; TERBRUGGEN, A. e ZONDERVAN, I. (2004). Transparent exopolymer particles and dissolved organic carbon production by *Emiliana huxleyi* exposed to different CO₂ concentrations: a mesocosm experiment. *Aquatic Microbial Ecology* **34**(1): 93-104.
- ENGEL, A.; GOLDTHWAIT, S.; PASSOW, U. e ALLDREDGE, A. (2002a). Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnology and Oceanography* **47**(3): 753-761.
- ENGEL, A.; MEYERHOFER, M. e VON BROCKEL, K. (2002b). Chemical and biological composition of suspended particles and aggregates in the Baltic Sea in summer (1999). *Estuarine Coastal and Shelf Science* **55**(5): 729-741.
- ENGEL, A. e PASSOW, U. (2001). Carbon and nitrogen content of transparent exopolymer particles (TEP) in relation to their Alcian Blue adsorption. *Marine Ecology-Progress Series* **219**: 1-10.
- EMERY, K.O.; JOHNS, I.A. & HONJO, S. 1984. Organic films on particulate matter in surfar waters off eastern Asia. *Sedimentology*, **31**: 503-514.
- FATIBELLO, S.; VIEIRA, A. A. H. e FATIBELLO, O. (2004). A rapid spectrophotometric method for the determination of transparent exopolymer particles (TEP) in freshwater. *Talanta* **62**(1): 81-85.
- FERRIS, M. J.; MUYZER, G. e WARD, D. M. (1996). Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2): 340-346.
- FREIRE-NORDI, C. S. e VIEIRA, A. A. H. (1996). Utilization of extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae) by heterotrophic bacteria. *Revista de Microbiologia*. **27** (1): 27-32.

- FREIRE-NORDI, C. S. e VIEIRA, A. A. H. (1998). Degradability of polysaccharides compounds excreted by *Ankistrodesmus densus* Kors (Chlorophyceae) in cultures of natural bacterial communities. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **26**: 1685-1688.
- GILLAN, D. C.; SPEKSNIJDER, A.; ZWART, G. e DE RIDDER, C. (1998). Genetic diversity of the biofilm covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, bivalvia) as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and cloning of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9): 3464-3472.
- GIOVANNONI, S. J., BRITSCHGI, T. B., MOYER, C. L. e FIELD, K. G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- GIROLDO, D.; VIEIRA, A. A. H. e PAULSEN, B. S. (2005). Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculare* (Zygnematophyceae). *Phycologia* **44**(6): 671-677.
- GROSSART, H. P.; KIORBOE, T.; TANG, K. e PLOUG, H. (2003). Bacterial colonization of particles: Growth and interactions. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6): 3500-3509.
- GROSSART, H. P.; LEVOLD, F.; ALLGAIER, M.; SIMON, M. e BRINKHOFF, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology* **7**(6): 860-873.
- GROSSART, H. P., BERMAN, T., SIMON, M. e POHLMANN, K. (1998). Occurrence and microbial dynamics of macroscopic organic aggregates (lake snow) in Lake Kinneret, Israel, in fall. *Aquatic Microbial Ecology* **25**: 247-104-258.
- GROSSART, H. P. e SIMON, M. (1993). Limnetic Macroscopic Organic Aggregates (Lake Snow) - Occurrence, Characteristics, and Microbial Dynamics in Lake Constance. *Limnology and Oceanography* **38**(3): 532-546.
- GROSSART, H. P.; SIMON, M. e LOGAN, B. E. (1997). Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton, and zooplankton. *Limnology and Oceanography* **42**(8): 1651-1659
- .GUEGUEN, C.; BELIN, C. e DOMINIK, J. (2002). Organic colloid separation in contrasting aquatic environments with tangential flow filtration. *Water Research* **36**(7): 1677-1684.

- HEISSENBERGER, A.; HERNDL, G. J.; FLANNIGAN, D.; LOTT, J. N. A. e LEPPARD, G. G. (1994). Ultrastructure of the Matrix of Marine Snow. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **207**: 179-GEOC.
- HERNDL, G. J. (1992). Marine Snow in the Northern Adriatic Sea: possible causes and consequences for a shallow ecosystem *Marine Microbiology Food Webs* **6**: 149-172.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. e WELLINGTON, E. M. H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3233-3241.
- HOFFMANN, S. R.; SHAFER, M. M.; BABIARZ, C. L. e ARMSTRONG, D. E. (2000). A critical evaluation of tangential flow ultrafiltration for trace metal studies in freshwater systems. 1. Organic carbon. *Environmental Science & Technology* **34**(16): 3420-3427.
- HOLLIBAUGH, J. T.; WONG, P. S.; BANO, N.; PAK, S. K.; PRAGER, E. M. e ORREGO, C. (2001). Stratification of microbial assemblages in Mono Lake, California, and response to a mixing event. *Hydrobiologia* **466**(1-3): 45-60.
- HONG, Y.; SMITH, W. O. e WHITE, A. M. (1997). Studies on transparent exopolymer particles (TEP) produced in the Ross Sea (Antarctica) and by *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* **33**(3): 368-376.
- HUGENHOLTZ, P.; PITULLE, C.; HERSHBERGER, K. L. e PACE, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology* **180**(2): 366-376.
- HUMAYOUN, S. B.; BANO, N. e HOLLIBAUGH, J. T. (2003). Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2): 1030-1042.
- JACKSON, G. A. (1990). A Model of the Formation of Marine Algal Flocs by Physical Coagulation Processes. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **37**(8): 1197-1211.
- JONES, S. E. e LOCK, M. A. (1993). Seasonal Determinations of Extracellular Hydrolytic Activities in Heterotrophic and Mixed Heterotrophic Autotrophic Biofilms from 2 Contrasting Rivers. *Hydrobiologia* **257**(1): 1-16.

- KEPKAY, P. E. (2000). The handbook of environmental chemistry. Vol.5 Part D Marine Chemistry. ed. by P Wangersky. Cap.2 *Colloids and the ocean carbon cycle*. © Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, pp 35-56.
- KREMBS, C. e ENGEL, A. (2001). Abundance and variability of microorganisms and transparent exopolymer particles across the ice-water interface of melting first-year sea ice in the Laptev Sea (Arctic). *Marine Biology* **138**(1): 173-185.
- KIØRBOE, T. e JACKSON, G. A. (2001). Marine snow, organic solute plumes, and optimal chemosensory behavior of bacteria. *Limnology and Oceanography* **46**:1309-1318.
- LI, X. Y. e LOGAN, B. E. (1997). Collision frequencies between fractal aggregates acid small particles in a turbulently sheared fluid. *Environmental Science & Technology* 31(4): 1237-1242.
- LIND, O. T. e DAVALOSLIND, L. (1991). Association of Turbidity and Organic-Carbon with Bacterial Abundance and Cell-Size in a Large, Turbid, Tropical Lake. *Limnology and Oceanography* **36**(6): 1200-1208.
- LOGAN, B. E.; GROSSART, H. P. e SIMON, M. (1994). Direct Observation of Phytoplankton, Tep and Aggregates on Polycarbonate Filters Using Brightfield Microscopy. *Journal of Plankton Research* **16**(12): 1811-1815.
- LOGAN, B. E.; PASSOW, U.; ALLDREDGE, A. L.; GROSSART, H. P. e SIMON, M. (1995). Rapid Formation and Sedimentation of Large Aggregates Is Predictable from Coagulation Rates (Half-Lives) of Transparent Exopolymer Particles (Tep). *Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography* **42**(1): 203-214.
- MARI, X.; BEAUVAIS, S.; LEMEE, R. e PEDROTTI, M. L. (2001). Non-Redfield C : N ratio of transparent exopolymeric particles in the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* **46**(7): 1831-1836.
- MARI, X. e KIØRBOE, T. (1996). Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *Journal of Plankton Research* **18**(6): 969-986.
- MARI, X.; RASSOULZADEGAN, F. e BRUSSAARD, C. P. D. (2004). Role of TEP in the microbial food web structure. II. Influence on the ciliate community structure. *Marine Ecology-Progress Series* **279**: 23-32.
- MARI, X.; RASSOULZADEGAN, F.; BRUSSAARD, C. P. D. e WASSMANN, P. (2005). Dynamics of transparent exopolymeric particles (TEP) production by *Phaeocystis globosa* under N- or P-limitation: a controlling factor of the retention/export balance. *Harmful Algae* **4**(5): 895-914.

- MCCAIVE, I. N. (1984). Size Spectra and Aggregation of Suspended Particles in the Deep Ocean. *Deep-Sea Research Part a-Oceanographic Research Papers* **31**(4): 329-352.
- MIDDELBOE, M.; SØNDERGAARD, M.; LETARTE, Y. e BORCH, N. H. (1995). Attached and Free-Living Bacteria - Production and Polymer Hydrolysis During a Diatom Bloom. *Microbial Ecology* **29**(3): 231-248.
- MOPPER, K.; ZHOU, J. A.; RAMANA, K. S.; PASSOW, U.; DAM, H. G. e DRAPEAU, D. T. (1995). The Role of Surface-Active Carbohydrates in the Flocculation of a Diatom Bloom in a Mesocosm. *Deep-Sea Research Part Ii-Topical Studies in Oceanography* **42**(1): 47-73.
- NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W. e BACKHAUS, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**(19): 5636-5643.
- ODUM, E.P. (1988). *Ecologia*, Trad. C.J. TRIBE, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
- PASSOW, U. (2000). Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology-Progress Series* **192**: 1-11.
- PASSOW, U. (2002a). Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. *Progress in Oceanography* **55**(3-4): 287-333.
- PASSOW, U. (2002b). Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton. *Marine Ecology-Progress Series* **236**: 1-12.
- PASSOW, U. e ALLDREDGE, A. L. (1994). Distribution, Size and Bacterial-Colonization of Transparent Exopolymer Particles (TEP) in the Ocean. *Marine Ecology-Progress Series* **113**(1-2): 185-198.
- PASSOW, U. e ALLDREDGE, A. L. (1995). A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography* **40**(7): 1326-1335.
- PASSOW, U.; ALLDREDGE, A. L. e LOGAN, B. E. (1994). The Role of Particulate Carbohydrate Exudates in the Flocculation of Diatom Blooms. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **41**(2): 335-357.
- PASSOW, U.; SHIPE, R. F.; MURRAY, A.; PAK, D. K.; BRZEZINSKI, M. A. e ALLDREDGE, A. L. (2001). The origin of transparent exopolymer particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research* **21**(4): 327-346.

- PASSOW, U. e WASSMANN, P. (1994). On the Trophic Fate of *Phaeocystis-Pouchetii* (Hariot) .4. the Formation of Marine Snow by P-Poucheti. *Marine Ecology-Progress Series* **104**(1-2): 153-161.
- PEREIRA CABRAL, B. J. (2003). Utilização de técnicas de segmentação e correlação de Spearman em imagens TM para o estudo da concentração de sedimentos em suspensão no reservatório de Barra Bonita - São Paulo - Brasil. *GeoFocus* **3**: 235-267.
- PHILLIPS, C. J.; SMITH, Z.; EMBLEY, T. M. e PROSSER, J. I. (1999). Phylogenetic differences between particle-associated and planktonic ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in the northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(2): 779-786.
- PICKUP, R. W., RHODES, G. E SAUNDERS, J. R. (1995). Molecular Microbial Ecology Manual. Cap.4 *Extraction of microbial DNA from aquatic sources: Freshwater*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1.1.2: 1-11.
- PORTER, K. G. e FEIG, Y. S. (1980). The Use of Dapi for Identifying and Counting Aquatic Microflora. *Limnology and Oceanography* **25**(5): 943-948.
- PRIETO, L.; SOMMER, F.; STIBOR, H. N. e KOEVE, W. (2001). Effects of planktonic copepods on transparent exopolymeric particles (TEP) abundance and size spectra. *Journal of Plankton Research* **23**(5): 515-525.
- RAMAIAH, N.; SARMA, A.; GAUNS, M.; KUMAR, M. D. e MADHUPRATAP, M. (2000). Abundance and relationship of bacteria with transparent exopolymer particles during the 1996 summer monsoon in the Arabian Sea. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Earth and Planetary Sciences* **109**(4): 443-451.
- RAMAIAH, N.; TAKEDA, S.; FURUYA, K.; YOSHIMURA, T.; NISHIOKA, J.; AONO, T.; NOJIRI, Y.; IMAI, K.; KUDO, I.; SAITO, H. e TSUDA, A. (2005). Effect of iron enrichment on the dynamics of transparent exopolymer particles in the western subarctic Pacific. *Progress in Oceanography* **64**(2-4): 253-261.
- SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D. e SIMPSON, A. J. G. (1994). Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide Gels. *Biotechniques* **17**(5): 914.
- SCHNEIDER, B.; ENGEL, A. e SCHLITZER, R. (2004). Effects of depth- and CO₂-dependent C : N ratios of particulate organic matter (POM) on the marine carbon cycle. *Global Biogeochemical Cycles* **18**(2).

- SCHUSTER, S. e HERNDL, G. J. (1995). Formation and Significance of Transparent Exopolymeric Particles in the Northern Adriatic Sea. *Marine Ecology-Progress Series* **124**(1-3): 227-236.
- SILVA-PEREIRA, I. (2003). Técnicas básicas em Biologia Molecular. Cap.4 *Amplificação de DNA por PCR*. Editora Universidade de Brasília. Brasília, pp 99-110.
- SIMON, M. (1985). Specific Uptake Rates of Amino-Acids by Attached and Free-Living Bacteria in a Mesotrophic Lake. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(5): 1254-1259.
- SIMON, M.; GROSSART, H. P.; SCHWEITZER, B. e PLOUG, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology* **28**(2): 175-211.
- STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. e PACE, N.R. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S ribosomal RNA sequence. *Applied and Environmental Microbiology* **49**: 1379-1985.
- STEINBERG, D. K.; SILVER, M. W. e PILSKALN, C. H. (1997). Role of mesopelagic zooplankton in the community metabolism of giant larvacean house detritus in Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology-Progress Series* **147**(1-3): 167-179.
- STODEREGGER, K. E. e HERNDL, G. J. (1999). Production of exopolymer particles by marine bacterioplankton under contrasting turbulence conditions. *Marine Ecology-Progress Series* **189**: 9-16.
- TAYLOR, M. W.; SCHUPP, P. J.; DAHLLOF, I.; KJELLEBERG, S. e STEINBERG, P. D. (2004). Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environmental Microbiology* **6**(2): 121-130.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y. e MUYZER, G. (1996). Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4210-4215.
- TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A. e OVREAS, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**(1): 53-62.
- VERDUGO, P.; ALLDREDGE, A. L.; AZAM, F.; KIRCHMAN, D. L.; PASSOW, U. e SANTSCHI, P. H. (2004). The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Marine Chemistry* **92**(1-4): 67-85.

- VIEIRA, A.A.H. (1999). Produção e destino dos polissacarídeos extracelulares de origem algal em um reservatório eutrofizado do rio Tietê.(Estudo de Processos). Projeto temático. Departamento de Botânica - UFSCar/São Carlos p.42
- VIEIRA, A.A.H. e CREPOLDI, M. O. S. Exopolissacarídeos de *Cryptomonas tetropyrenoidose* (em preparação).
- VIEIRA, A.A.H. e GIROLDO, D. (2005). Aggregate formation in axenic and microbial co-inoculated batch cultures of a tropical *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae). *Acta Limnologica Brasiliensia* (em submissão).
- VIEIRA, A. A. H.; NASCIMENTO, O. R. e SARTORI, A. L. (1994). Release of Extracellular Polysaccharide by Spondylosium-Panduriforme (Desmidiaceae). *Revista De Microbiologia* **25**(1): 6-10.
- WEISS, P.; SCHWEITZER, B.; AMANN, R. e SIMON, M. (1996). Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (Lake Snow). *Applied and Environmental Microbiology* **62**(6): 1998-2005.
- WORM, J. e SØNDERGAARD, M. (1998). Alcian Blue-stained particles in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research* **20**(2): 179-186.
- ZHOU, J.; MOPPER, K. e PASSOW, U. (1998). The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography* **43**(8): 1860-1871.
- ZOETENDAL, E. G.; AKKERMANS, A. D. L. e DE VOS, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 3854-3859.

ANEXO 1

A rapid spectrophotometric method for the determination of transparent exopolymer particles (TEP) in freshwater

Silvia H.S. Arruda Fatibello^a, Armando Augusto Henriques Vieira^a,
Orlando Fatibello-Filho^{b,*}

^a Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, km 235, Caixa Postal 676, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

^b Laboratório de Química Analítica, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, km 235, Caixa Postal 676, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil

Received 13 January 2003; received in revised form 25 June 2003; accepted 25 June 2003

Abstract

A simple and rapid spectrophotometric method is proposed for the determination of transparent exopolymer particles (TEP) in freshwater samples. In this method, TEP reacts with excess of alcian blue solution yielding a low solubility dye–TEP complex. After centrifugation, the concentration of the remaining dye in the supernatant was determined at 602 nm and its concentration was related to the concentration of TEP in freshwater. The effect of alcian blue concentration from 1.5×10^{-3} to $9.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v), solution pH from 2.5 to 6.9 and stirring time from 20 to 120 s on the analytical curve was investigated. Under the optimum conditions established, such as alcian blue concentration of $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v); pH of 4.0 (0.2 mol l⁻¹ acetate buffer solution) and stirring time of 1 min, the analytical curve was linear from 0.50 to 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($A = 0.34 - 0.037[\text{GX}]$; $r^2 = 0.9999$; where A is the absorbance and $[\text{GX}]$ the gum xanthan concentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$) with a detection limit of 0.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The recovery of TEP (as gum xanthan) for two samples ranged from 95.3 to 108 and the relative standard deviations (R.S.D.s) were lower than 0.8% for gum xanthan solutions at concentrations of 1.0 and 1.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ($n = 8$). The results obtained for TEP in freshwater samples using the proposed spectrophotometric method and those obtained using a literature method are in agreement at the 95% confidence level and within an acceptable range of error.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: TEP; TEP determination; Alcian blue; Spectrophotometry; Freshwater

1. Introduction

Transparent exopolymer particles (TEP) are a class of organic particles present in seawater and freshwater systems and in some microalgae cultures that consist predominantly of polysaccharides [1–4]. These particles are transparent on clear slides and can be directly observed on slides only by a relatively cumbersome sequence of sample filtration onto specific filters, staining with alcian blue, and transferring back again onto clear slides using an FTF (filter–transfer–freezer) technique described by Passow et al. [5,6]. Their abundance and size have been found to be critical to an understanding of the aggregation and sedimentation of diatom blooms [6,7]. It is also important

to study the process of their formation, to understand the function of organic aggregates. The results of such studies show that these formation processes include physical (turbulence and differential settling velocities), chemical (surface change properties, coating by sticky compound), and biological mechanisms [7].

TEP are large, sticky, transparent, discrete particles (operationally defined as being $>0.4 \mu\text{m}$ in diameter) or are attached to other particles, presumably formed abiotically from polysaccharides excreted by phytoplankton and bacterioplankton [1,5,6]. Some algal exopolymers spontaneously form TEP through aggregation and/or coagulation under turbulent conditions in the water column or by bubbling the natural waters or culture media with exopolysaccharides released by diatoms and members of other phytoplankton groups [6,8]. Evidence regarding the physical–chemical nature of algal exopolysaccharides may help clarify these processes of TEP formation. TEP exists at concentrations

* Corresponding author. Tel.: +55-16-260-8208;
fax: +55-16-260-8350.
E-mail address: bello@dq.ufscar.br (O. Fatibello-Filho).

of $10\text{--}10^6\text{ ml}^{-1}$, especially when diatoms are abundant [4,9,10].

The matrix of all marine snow aggregates examined to date, regardless of their origin and composition, consists of TEP [11]. TEP are usually between $1\ \mu\text{m}$ and 1 mm in length, and formed through coagulation and aggregation of dissolved and particulate organic matter, and contribute to glue together smaller particles into larger aggregates known as marine or lake snow [12]. TEP may be used as food by zooplankton, and act as a substrate for bacteria, changing interactions between bacteria and their environment. Apparently these particles can play an important role in an alternative route (to bacteria and microzooplankton uptake) for the conversion of dissolved organic carbon to particulate organic carbon [4,8].

TEP are indiscernible by light microscope but made visible, as discussed, after staining these particles with alcian blue.

The spectrophotometric method for the determination of TEP proposed by Passow and Alldredge [4] is labor-intensive and time-consuming, involving several critical steps, as will be presented in Section 2.3.2. TEP is stained with alcian blue (a copper phthalocyanin with four (methylene-tetramethyl-cisthiouronium-chloride) side chains), a hydrophilic cationic dye that complexes with anionic carboxyl or half-ester-sulfate groups of acidic polymers [4,13]. The strong reaction of TEP with alcian blue indicated that these particles contained abundant polysaccharides. The selectivity of this spectrophotometric method can be made by varying either the solution pH or the salt content of the dye solution. Also, alcian blue has been used in medical and biological research to stain internal and external mucous layers, glycosamines in blood and/or urine, intracellular polysaccharides in seaweed and extracellular polysaccharides in colony matrices or capsules of algae and bacteria as discussed by Passow and Alldredge [4].

In the present work, a simple, reliable, precise, accurate and rapid spectrophotometric method is developed for determining TEP in freshwater samples based on the same reaction between TEP and alcian blue. After the elimination of colloids from the samples, TEP reacts with excess of alcian blue solution yielding a non-ionic pigment of low solubility, and after centrifugation, the concentration of the remaining dye in the supernatant was determined at 602 nm. For the optimisation of this method, the effect of pH, alcian blue concentration and stirring and centrifugation times on the analytical characteristics of the spectrophotometric method was also investigated.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Tangential filtration was carried out in a Karlstein Biologic GmbH (Karlstein, Germany) Model Handy SH 15 us-

ing an A/G Technology Corporation Mid Gee™ MM cartridge ($0.45\ \mu\text{m}$ nominal pore size).

A Hewlett-Packard (Boise, ID, USA) Model 8452 A UV-Vis spectrophotometer with a glass cell (optical path of 1.00 cm) was used in all spectrophotometric measurements.

A DuPont Instruments (Newtown, CN, USA) Model RC-5B centrifuge was used for the separation of suspensions containing TEP–alcian blue precipitate and alcian blue dye solution.

2.2. Reagents and solutions

All reagents were of analytical reagent grade and all solutions were prepared with water from a Millipore (Bedford, MA) Milli-Q system Model UV Plus Ultra Low Organics Water. A $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$ stock gum xanthan (Sigma, St. Louis, MO, USA) solution was prepared in 0.2 mol l^{-1} acetate buffer solution (pH 4). Gum xanthan reference solutions from 0.5 to $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ were prepared from stock solution in 0.2 mol l^{-1} acetate buffer solution (pH 4).

Alcian blue 8 GX (C.I. 74240), Polyscience (Warrington, PA, USA), stock solution at a concentration of $6.0 \times 10^{-2}\%$ (m/v) was prepared in 0.2 mol l^{-1} acetate buffer solution (pH 4).

2.3. Procedures

2.3.1. Sampling, preservation and filtration of the freshwater samples

Freshwater samples (21 volumes) of the Barra Bonita reservoir, SP, Brazil, were collected at 1.0, 1.5, 5.0, 10.0 and 16.0 m depth using a Van Dorn bottle. Within 2 h of collection, samples were filtered in the laboratory using a $70\ \mu\text{m}$ mesh Nylon net in order to remove the larger zooplankton, phytoplankton and mineral particles and fixed with 0.05% (m/v) sodium azide solution (final concentration). In order to eliminate the colloids and concentrate the freshwater samples 5–10-fold, aliquots of 80–100 ml were filtered and stored at $4\ ^\circ\text{C}$ in a refrigerator.

2.3.2. Reference spectrophotometric method

In order to compare the TEP concentrations in freshwater samples obtained using the proposed method, the Passow and Alldredge spectrophotometric reference method [4] was used in this work. Briefly, 3–50 ml of freshwater was filtered at low, constant vacuum (150 mmHg) onto a polycarbonate filter ($0.4\ \mu\text{m}$ pore size) and stained with $500\ \mu\text{l}$ of a 0.02% (m/v) alcian blue in 0.06% (v/v) acetic acid (pH 2.5) solution. After being stained, filters were rinsed once with distilled water to remove excess dye. Rinsing will not wash off the dye bound to substrates. Filters were then transferred to 25 ml beakers. An aliquot of 6 ml of 80% (v/v) sulfuric acid is added and the filters soaked for 2 h. The beakers were gently agitated 3–5 times during this period.

The absorption maximum of the solution lies at 787 nm and the absorbance was measured in a 1.00 cm cell against distilled water as reference, and the absorbance is linearly related to the concentration of stainable TEP present in the water samples. The concentration of TEP (C_{TEP}) is expressed as gum xanthan equivalent ($\mu\text{g l}^{-1}$) and it was determined from the equation $C_{TEP} = (A_{787} - C_{787}) \times (V_f)^{-1} \times f_x$, where A_{787} is the absorbance of the sample, C_{787} is the absorbance of the blank, V_f is the volume filtered in litres and f_x is the calibration factor in μg . This calibration factor, f_x , is calculated by relating dry weight measurements of gum xanthan particles retained on the filters to their staining capacity according to $f_x = W \times [(AA_{787} - C_{787}) \times V_{st}^{-1}]^{-1}$, where W is the dry mass of the reference solution ($\mu\text{g l}^{-1}$), AA_{787} its average absorbance, C_{787} is the blank absorbance and V_{st} the volume (in litres) filtered for staining.

2.3.3. Proposed spectrophotometric method

A volume of 5 ml of previously concentrated freshwater sample without colloids or reference solution was transferred to a 10 ml volumetric flask. Then, 0.5 ml of 0.06% (m/v) alcian blue solution was added and the volume was made up with 0.2 mol l^{-1} acetate buffer solution (pH 4). The volumetric flask was stirred for 1 min. The resulting suspension was then centrifuged at 3000 rpm ($2160 \times g$) for 30 min and the absorbance of the supernatant (alcian blue solution in excess) was measured at 602 nm.

3. Results and discussion

3.1. Reaction between TEP and alcian blue and principle of the analytical method

As discussed, a simple and rapid spectrophotometric method was developed for determining TEP in a freshwater sample based on the same reaction between TEP and alcian blue. TEP reacts with excess of alcian blue solution yielding a non-ionic pigment of low solubility, and after centrifugation, the concentration of the remaining dye in the supernatant was determined at 602 nm. For the optimisation of this method, the effect of pH, alcian blue concentration and stirring and centrifugation times on the analytical characteristics of the spectrophotometric method was initially investigated.

3.2. Effect of pH, stirring and centrifugation times

The effect of pH (2.5, 3.3, 4.0, 4.8 and 6.9) for gum xanthan in the concentration range from 0.5 to $10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v) alcian blue on the analytical response was initially investigated. Table 1 presents the mathematical equations of the analytical curves, r^2 , linearity and limit of detection (three times the signal of standard deviation of the blank solution/slope ratio) obtained in each pH value investigated. As it can be seen from this table, the greatest linearity ($0.50\text{--}10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ of gum xanthan), highest sensitivity (analytical curve slope of 0.037) and lowest detection limit ($0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of gum xanthan) were obtained at pH 4. Therefore, this pH was adopted in all further work.

The effects of stirring and centrifugation times on the analytical response were also evaluated. In these studies stirring times from 20 to 120 s and centrifugation times from 20 to 40 min were evaluated. Best analytical signal was obtained for stirring and centrifugation times of 1 and 30 min, respectively. Therefore, these times were adopted in all further experiments.

3.3. Effect of alcian blue concentration

The effect of the alcian blue concentration was studied in the concentration range from 1.5×10^{-3} to $9.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v) for gum xanthan in the concentration interval from 0.5 to $10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 1). The sensitivity (analytical curve's slope) increased with increases in alcian blue concentration up to $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v), and at higher concentrations the sensitivity was almost constant. Additionally, better repeatability (item 3.4) and greatest linearity (Table 1 and Fig. 1) was obtained in this alcian blue concentration. Consequently, in all further experiments, a concentration of $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v) was selected.

3.4. Study of interference, recovery and repeatability

The effect of sodium azide solution used in the sample preservation on the analytical method was evaluated at a concentration level at least 10-fold that of gum xanthan. No interference in the proposed spectrophotometric method was observed.

Recoveries varying from 95.3 to 108% of gum xanthan (Table 2) from two freshwater samples were obtained using the proposed spectrophotometric method. In this study,

Table 1
Calibration equations obtained for $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v) alcian blue in several pH values as a function of gum xanthan (GX) concentration at 25°C

pH	Equation	r^2	Linearity range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Detection limit ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
2.5	$A = 0.58 - 0.019[\text{GX}]$	0.7816	1.8–8.0	1.5
3.3	$A = 0.62 - 0.020[\text{GX}]$	0.9725	0.80–10.0	0.50
4.0	$A = 0.34 - 0.037[\text{GX}]$	0.9999	0.50–10.0	0.10
4.8	$A = 0.24 - 0.027[\text{GX}]$	0.9847	2.0–7.0	1.2
6.9	$A = 0.055 - 0.007[\text{GX}]$	0.8154	0.50–2.5	0.40

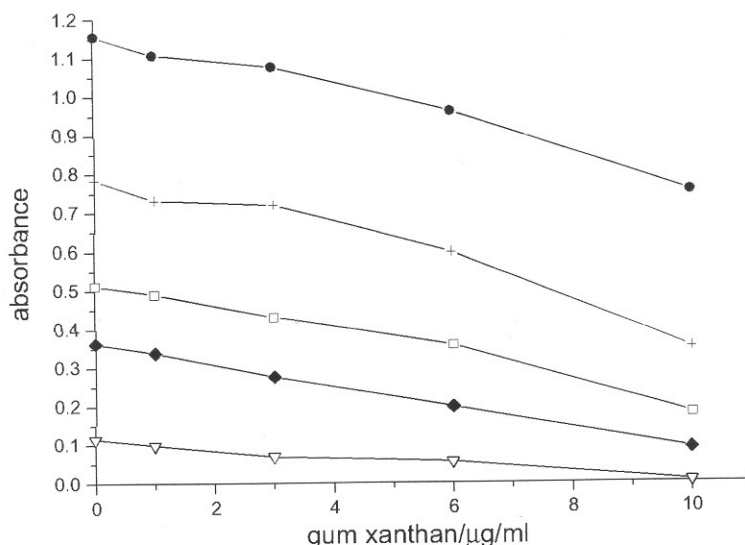


Fig. 1. Effect of the alcin blue concentrations (∇) 1.5×10^{-3} , (\blacklozenge) 3.0×10^{-3} , (\square) 4.0×10^{-3} , (+) 6.0×10^{-3} and (\bullet) 9.0×10^{-3} (m/v) on the analytical (calibration) curves for gum xanthan from 0.50 to $10.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ at pH 4.0 and 25°C .

0.100, 0.300, 0.400, 0.500, 2.00, 4.00 and $6.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ of gum xanthan solutions were added in triplicate to each sample and the absorbances were measured. The recovery results obtained suggest an absence of matrix effects on those determinations.

In the repeatability study, the R.S.D.s were lower than 0.8% for solutions containing 1.0 and $1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of gum xanthan ($n = 8$).

3.5. Analytical characteristics and applications

Under the optimum conditions established—i.e. 0.2 mol l^{-1} acetate buffer solution (pH 4), $3.0 \times 10^{-3}\%$ (m/v) alcin blue solution (final concentration), centrifugation at 3000 rpm ($2160 \times g$) for 30 min at 25°C —the analytical curve was linear from 0.50 to $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($A = 0.34 - 0.037[\text{GX}]$; $r^2 = 0.9999$; where A is the absorbance and $[\text{GX}]$ is the gum xanthan concentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$), with a detection limit of $0.10 \mu\text{g ml}^{-1}$. The accuracy of the proposed spectrophotometric method was checked by ap-

Table 2
Recoveries of gum xanthan from freshwater ($n = 3$)

Sample	Gum xanthan ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Recovery (%)
	Added	Found	
A	0.100	0.100	100
	0.300	0.286	95.3
	0.400	0.433	108
	0.500	0.505	101
B	2.00	2.09	104
	4.00	4.20	105
	6.00	5.92	98.6

Table 3
Determination of TEP in freshwater using the reference [4] and the proposed Spectrophotometric methods

Sample	TEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		Relative error (%)
	Reference method	Spectrophotometric	
A	0.24 ± 0.09	0.26 ± 0.03	7.7
B	0.40 ± 0.07	0.38 ± 0.01	-5.2
C	0.32 ± 0.09	0.35 ± 0.02	8.6
D	0.35 ± 0.09	0.37 ± 0.02	+5.4
E	0.24 ± 0.08	0.25 ± 0.01	4.0

plying it in the determination of TEP in freshwater samples. Table 3 presents the results obtained for five freshwater samples using the Passow and Alldredge spectrophotometric method [4] and the proposed spectrophotometric method. Applying a paired t -test, it was found that all results are in agreement at the 95% confidence level and within an acceptable range of error. The worst coefficients of variation (C.V.s) obtained using the Passow and Alldredge spectrophotometric method indicates the low precision of this method, owing to the several analytical steps involved in this method.

In conclusion, the proposed spectrophotometric method for the determination of TEP in freshwater samples reported in this paper is reliable, simple, rapid, precise, and accurate and does not require extensive preliminary sample treatment.

Acknowledgements

Financial support from FAPESP (process # 99/07766-0) and CNPq and scholarship granted by CAPES to SHSAF are gratefully acknowledged.

References

- [1] A.L. Alldredge, U. Passow, B.E. Logan, *Deep-Sea Res.* 1 40 (1993) 1131.
- [2] P.E. Kepkay, in: P. Wangersky (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. V, Springer-Verlag, Berlin, 2000, p. 35.
- [3] B.E. Logan, U. Passow, A.L. Alldredge, H.P. Grossart, M. Simon, *Deep-Sea Res.* 1 42 (1995) 203.
- [4] U. Passow, A.L. Alldredge, *Limnol. Oceanogr.* 40 (1995) 1326.
- [5] T. Kiorbe, J.L.S. Hansen, *J. Plankton Res.* 15 (1993) 993.
- [6] U. Passow, A.L. Alldredge, B.E. Logan, *Deep-Sea Res.* 1 41 (1994) 335.
- [7] H.P. Grossart, M. Simon, B.E. Logan, *Limnol. Oceanogr.* 42 (1997) 1651.
- [8] U. Passow, *Marine Ecol. Prog. Ser.* 236 (2002) 1.
- [9] U. Passow, *Marine Ecol. Prog. Ser.* 192 (2000) 1.
- [10] A. Engel, *J. Plankton Res.* 22 (2000) 485.
- [11] U. Passow, R.F. Shipe, A. Murray, D.K. Pak, M.A. Brzezinski, A.L. Alldredge, *Cont. Shelf Res.* 21 (2001) 327.
- [12] J. Worm, M. Sondergaard, *Aquatic Microb. Ecol.* 14 (1998) 19.
- [13] K.E. Stoderegger, G.J. Herndl, *Marine Ecol. Prog. Ser.* 189 (1999) 9.