

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Produção de Agregados Gelatinosos em Culturas de Microalgas
de um Reservatório Eutrofizado (Rio Tietê/ SP)**

Pedro Ivo Coelho Ortolano

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

São Carlos
2005

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

O78fa

Ortolano, Pedro Ivo Coelho.

Formação de agregados gelatinosos em culturas de microalgas de um reservatório eutrofizado (rio Tietê/SP) / Pedro Ivo Coelho Ortolano. -- São Carlos : UFSCar, 2005. 72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fitoplâncto. 2. Agregados. 3. Polissacarídeos extracelulares dissolvidos. 4. Barra Bonita (SP). 5. Bacillariophyceae. I. Título.

CDD: 589.4 (20^a)

Armando Augusto Henriques Vieira
Orientador

Cada um de nossos pensamentos não é mais do que um instante de nossa vida. De que serviria a vida se não fosse para corrigir os erros, vencer nossos preconceitos e, a cada dia alargar nosso coração e nossos pensamentos? Nós utilizamos cada dia para alcançar um pouco mais de verdade. Quando chegarmos ao fim, vocês dirão então o que é que valeu a nossa pena.

Romain Rolland, *Jean-Christophe*

Agradecimentos

Ao admirável Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pela estrutura disponibilizada e pela orientação dentro e fora do laboratório, sem as quais esse trabalho não teria se concretizado;

À FAPESP e ao CNPq, pelo imprescindível apoio financeiro;

A todos da secretaria do PPG-ERN, pela importante ajuda e responsabilidade;

Ao Djalma da Oficina Mecânica da UFSCar, que construiu de maneira brilhante o *Floculador de Couette* utilizado nesse trabalho e por toda presteza quando o aparelho necessitou ser reparado;

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini (Depto. Hidrobiologia) e ao Prof. Dr. Cesar Rogério de Oliveira (Depto. Matemática) pela ajuda com os modelos matemáticos;

Ao Prof. Dr. Marcos Arduin (Depto. Botânica) pela ajuda na utilização do microscópio com captura de imagem;

Aos queridos companheiros de laboratório, Aline, Fabrício, Leticia (recém-chegados para ficar, espero!), Mari, Maria, Thaís, Roseli, Sebastião, Sandra, Mic, Vanessa, Zeza, e aos saudosos prof. Dra. Ana Lombardi e prof. Dr. Danilo Giroldo, por todas as importantes trocas de experiência, conselhos, amizade, companhia nas noites e finais de semana de trabalho...

Ao grande técnico do laboratório, Luiz Sartori, e ao fenomenal técnico de campo Luizinho pelo apoio técnico, eficiência e amizade;

Aos amigos da Hidrobiologia e do DEBE (em especial à Magda) que me aturaram em minhas incursões a esses departamentos;

Aos meus queridos amigos de “lá em casa”, que ainda moram comigo ou se mudaram durante essa caminhada, Sadao, Felipe, Cleo, Julião, Wil, Lays, Elliot, Miguel, Denis, Bill, Gustavos, Gilberto, Baltazar, Max, Baco e Gerônimo!

A todos meus amigos de São Carlos e Campinas por toda a força e ajuda nos momentos de descontração e pelo amparo nas horas de desengano!

Aos meus pais, Ana Maria e Belmiro, com especial carinho, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, durante minha formação;

Aos meus irmãos Paulo e João pelas cumplicidades, apoio e os merecidos tapas na infância,

Aos meus parentes que, mesmo distantes, se preocuparam comigo e torceram por meu trabalho;

A todos que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1: Floculador Couette construído na oficina mecânica da UFSCar.

Figura 2: Curva de crescimento de *Thalassiosira cf. duostra*. Variação na densidade celular ($\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) da cultura durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao desvio padrão ($n=6$). As setas correspondem aos dias de experimentos de floculação.

Figura 3: Curva de crescimento de *Aulacoseira granulata*. Variação na densidade celular ($\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) da cultura durante 38 dias (R1 e R2 são réplicas). As barras de erro correspondem ao desvio padrão ($n=6$). As setas correspondem aos dias de experimentos de floculação.

Figura 4: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração do EPS excretado ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=2$).

Figura 5: *Aulacoseira granulata*. Concentração do EPS ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) produzido (A) durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=2$).

Figura 6: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo de floculação, em diferentes gradientes de cisalhamento: (A) $G=3 \text{ s}^{-1}$; (B) $G=10 \text{ s}^{-1}$; (C) $G=30 \text{ s}^{-1}$. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 7: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo em diferentes taxas de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 8: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo em diferentes taxas de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 9: *Aulacoseira granulata*. Modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo. (A) com os precipitados e (B) sem os precipitados. ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $t = 150$ minutos). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 10: *Aulacoseira granulata*. Modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo. (A) com os precipitados e (B) sem os precipitados. ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $t = 150$ minutos). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 11: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), na ausência de EPS, em função do tempo de floculação. (A) fase 8 dias; (B) fase 27 dias; (C) fase 34 dias ($G= 10 \text{ s}^{-1}$, $t= 210$ min). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 12: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), em função do tempo ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150$ min), na ausência de EPS. R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 13: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), em função do tempo ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150$ min), na ausência de EPS. R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Figura 14: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), em função do tempo de floculação (min), na presença de EPS ($G= 10 \text{ s}^{-1}$ e $t= 210$ min). (A) fase 8 dias; (B) fase 27 dias; (C) fase 34 dias. As barras de erro correspondem ao erro médio.

Figura 15: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$), na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n= 3$).

Figura 16: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$), na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n= 3$).

Figura 17: Agregado de *Thalassiosira cf. duostra* na fase 27 dias formado na presença de EPS, corado com Alcian Blue 0,06%.

Figura 18: Agregado de *Aulacoseira granulata* na fase 28 dias formado na ausência de EPS, corado com Alcian Blue 0,06%.

Figura 19: Agregados de *Aulacoseira granulata* na fase 28 dias formados na presença de EPS. (A) corado com Alcian Blue 0,06%; (B) negativamente corado com Nankin.

Figura 20: *A. granulata*. Relação entre a concentração de carbono celular $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e concentração de células em diferentes fases de crescimento. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n= 3$).

Figura 21: Distribuição (%) em classes de tamanho (área, μm^2) dos agregados formados nos experimentos de floculação ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 180 \text{ min}$) na água integral de Barra Bonita (1); água de Barra Bonita com adição de EPS (2); água integral de Barra Bonita com adição de células (3). As setas indicam diferença significativa entre o número de agregados da classe apontada em relação à classe correspondente na floculação da água integral de Barra Bonita.

Figura 22: Agregados formados na água integral de Barra Bonita. Nota-se um filamento de *Aulacoseira granulata* no agregado superior.

Figura 23: Agregado formado na água de Barra Bonita com adição de EPS de *Aulacoseira granulata*, corado Alcian Blue 0,06%. Nota-se um filamento dessa espécie no centro do agregado e grande quantidade de polissacarídeos ácidos (corados em azul).

Figura 24: Agregado formado na água integral de Barra Bonita com adição de células de *Aulacoseira granulata*. Nota-se que os filamentos dessa espécie compuseram abundantemente o agregado.

Figura 25: *Thalassiosira cf. duostra*. Células associadas a fibras de quitina (n-acetilglicosamina) evidenciadas por corante específico (Chlorazol Black-E 0,2% em etanol 70%). Aumento 1000 x.

Figura 26: *Aulacoseira granulata*, negativamente corada com Nankin. Filmes de EPS em volta de células: (A) fase 8 dias; (B) fase 18 dias; (C) fase 28 dias e (D) fase 34 dias. Escala 20 µm.

Lista de tabelas

Tabela 1: *Thalassiosira cf. duostra*. Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento. O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tabela 2: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tabela 3: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tabela 4: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação após 120 min de floculação a diferentes taxas de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}).

Tabela 5: *Aulacoseira granulata*. Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento na presença e ausência de precipitados ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=150 \text{ min}$). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tabela 6: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo de floculação e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento, na ausência de EPS ($G=10 \text{ s}^{-1}$, $t=210 \text{ min}$) O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tabela 7: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 150 \text{ min}$), na ausência de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio ($n= 3$)

Tabela 8: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 150 \text{ min}$), na ausência de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio ($n= 3$).

Tabela 9: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento (k) e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 180 \text{ min}$) de floculação na ausência de EPS em diferentes fases de crescimento.

Tabela 10: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 10 \text{ s}^{-1}$ e $t= 210 \text{ min}$), na presença de EPS, em três idades (fases 8 dias, 27 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tabela 11: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$), na presença de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tabela 12: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$), na presença de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tabela 13: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento (k) e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=150 \text{ min}$) na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Tabela 14: *Thalassiosira cf. duostra*. Coeficientes de decaimento (k) das floculações ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=210 \text{ min}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 27 dias e 34 dias).

Tabela 15: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Coeficientes de decaimento (k) das floculações ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=150 \text{ min}$) e número de partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Tabela 16: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Coeficientes de decaimento (k) das floculações ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=150 \text{ min}$) e número de partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Tabela 17: *Aulacoseira granulata*. Concentração de células antes (Inicial) e depois (Final) da floculação ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=180 \text{ min}$), porcentagem de agregação de células e seqüestro de carbono na forma de células. da água integral de Barra Bonita; água com adição de EPS e água integral com adição de células. O erro corresponde ao desvio padrão ($n=8$).

Tabela 18: Frequência de ocorrência em classes de tamanho (área, μm^2) e densidade ($\text{agreg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos agregados formados nos experimentos de floculação ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=180 \text{ min}$) na água integral de Barra Bonita (BB Integral); água de Barra Bonita com adição de EPS (BB + Poliss); água integral de Barra Bonita com adição de células (BB + Células). O erro corresponde ao desvio padrão ($n=6$). Os asteriscos indicam que houve diferença significativa em relação aos agregados formados na água integral de Barra Bonita.

Sumário

Introdução.....	01
Objetivos.....	04
Material e Métodos.....	05
1. <i>Organismos e condições de cultivo</i>	05
2. <i>Amostragens</i>	05
3. <i>Quantificação dos polissacarídeos</i>	06
4. <i>Formação de agregados</i>	07
4.1. <i>Floculador de Couette</i>	07
4.2. <i>Formação de agregados em culturas de T. cf. duostra e A. granulata</i>	09
4.2.1. <i>Quantificação da agregação</i>	09
4.2.2. <i>Efeito das taxas de cisalhamento na agregação</i>	11
4.2.3. <i>Efeito dos precipitados do meio WC na agregação</i>	11
4.2.4. <i>Efeito da idade da cultura e do EPS na agregação</i>	12
4.3. <i>Papel de A. granulata na formação de agregados na água de Barra Bonita</i>	13
4.3.1. <i>Efeito do EPS de A. granulata na agregação</i>	13
4.3.2. <i>Efeito da densidade de células de A. granulata na agregação</i>	13
4.3.4. <i>Quantificação da formação de agregados na água de Barra Bonita</i>	14
Resultados.....	14
1. <i>Curvas de crescimento</i>	14
2. <i>Concentração de EPS</i>	16
3. <i>Formação de agregados em culturas</i>	18
3.1 <i>Efeito das taxas de cisalhamento na agregação</i>	18
3.2. <i>Efeito dos precipitados do meio WC na agregação</i>	26

3.3. Efeito da idade de cultivo na agregação.....	28
3.3.1. Formação de agregados na ausência de EPS.....	28
3.3.2. Formação de agregados na presença de EPS.....	36
3.3.3. Influência do EPS na formação de agregados.....	44
4. Papel de <i>A. granulata</i> na formação de agregados na água de Barra Bonita.....	50
4.1. Efeito do EPS de <i>A. granulata</i> na agregação.....	50
4.2. Efeito da densidade de células de <i>A. granulata</i> na agregação.....	51
Discussão e conclusões.....	58
1. Floculador Couette.....	58
2. Modelos matemáticos.....	58
3. Efeito das taxas de cisalhamento na agregação.....	60
4. Efeito da idade e do EPS na formação de agregados.....	61
5. Formação de agregados na água de Barra Bonita.....	65
6. Características físico-químicas dos polissacarídeos e agregação.....	66
Referências.....	68

Resumo

Foi realizado o estudo inédito no país sobre a formação de agregados por duas espécies de diatomáceas isoladas do Reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê/ SP), *Aulacoseira granulata* e *Thalassiosira cf. duostra*. Para tanto, utilizou-se um floculador Couette, aparelho constituído por dois cilindros que, quando em rotação, promovem a formação de um gradiente de cisalhamento em que partículas movendo-se com diferentes velocidades de deslocamento irão chocar-se. Tais partículas poderão permanecer aderidas ou não, dependendo de sua adesividade (*stickiness*). Foram determinados o coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) e o número de partículas agregadas ao final do experimento.

Determinou-se que diferentes taxas de cisalhamento (G, s^{-1}) afetam distintamente a formação de agregados em espécies diferentes de algas. *T. cf. duostra* apresentou maior agregação quando submetida a $G= 10 \text{ s}^{-1}$, apresentando coeficiente de decaimento e número de partículas agregadas aproximadamente 1,5 vez maiores que a $G= 3 \text{ s}^{-1}$. *A. granulata* agregou aproximadamente 1,5 vez mais partículas quando submetida a $G= 3 \text{ s}^{-1}$ do que a $G= 10 \text{ s}^{-1}$.

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *T. cf. duostra* aumentaram mais de duas vezes o número de partículas agregadas no final da fase exponencial de crescimento em relação ao mesmo processo na ausência desses compostos. O EPS produzido por *A. granulata* aumentou em mais de uma vez a agregação no final da fase exponencial e no início da fase estacionária

A adição de EPS produzido por *A. granulata* à água do Reservatório de Barra Bonita aumentou área relativa dos agregados em relação aos agregados formados sem a adição desses compostos, o que pode estar relacionado ao caráter hidrofóbico desse EPS. A adição das células dessa diatomácea à água do Reservatório também aumentou a área dos agregados formados. O aumento da área dos agregados provoca aumento das taxas de afundamento dessas partículas e representa importantes implicações na ciclagem de matéria no Reservatório de Barra Bonita.

Abstract

This work presents original data about aggregate formation by two diatoms, *Aulacoseira granulata* and *Thalassiosira cf. duostra*, isolated from Barra Bonita reservoir (Tietê river/ SP). Experiments were performed using a Couette flocculator, a machine that promotes laminar fluid shear rates (G, s^{-1}), in which particles in movement with several velocities will shock. Depending on their stickiness, the particles may or may not form aggregates. It was determined that different fluid shear rates can affect distinctly aggregate formation by the two algal species. At shear rates of $10 s^{-1}$, *T. cf. duostra* formed aggregates more intensively than *A. granulata*. However, aggregate formation by *A. granulata* was greater at a lower shear rate ($3 s^{-1}$).

The role of exopolysaccharides (EPS) produced by these species in aggregate formation by their cells/chains was also studied. The results showed that these compounds enhanced aggregation by both species.

The addition of *A. granulata* EPS in Barra Bonita water, led to the formation of aggregates with larger relative surfaces (μm^2) when compared to aggregates formed in Barra Bonita water in the absence of these compounds. This effect could be related to the hydrophobic characteristics of *A. granulata* EPS, which is composed of large amounts of terminal deoxy-sugars (fucose and rhamnose). When *A. granulata* chains were added to Barra Bonita water, the formed aggregates presented also larger relative surfaces. This increment leads to greater sinking rates and can promote important consequences for the cycling of matter in Barra Bonita reservoir.

Introdução

Agregados gelatinosos são partículas ubíquas em todos os oceanos do mundo, de composição variável, amorfas, flocosas, de tamanho que varia de menos de 0,5 mm até vários milímetros (Simon et al, 2002), mas podendo alcançar dimensões surpreendentes, na escala de metros, como aquelas que periodicamente ocorrem no Mar Adriático (Alcoverro et al, 2000). Na literatura, são conhecidas como "marine snow" nos oceanos e como "lake snow" em água doce. Estas partículas começaram a ser observadas na década de 60 do século passado e Riley (1963) foi, talvez, o primeiro autor a iniciar os estudos sistemáticos dos agregados, seguido por Silver et al (1978) e Alldredge (1979). Em 1967, Eppley et al, já descreviam o fato de diatomáceas marinhas afundarem mais rapidamente quando formando agregados.

Tais partículas possuem uma matriz gelatinosa formada por polissacarídeos extracelulares de origem algal, mas também de bactérias (Heissenberger et al, 1996; Decho, 1990) e, possivelmente, de outros organismos. A essa matriz polimérica se agregam, em concentrações que podem ser 5 vezes maiores do que as encontradas na água circundante, células algais vivas e mortas, bactérias, restos de organismos zooplanctônicos e outros detritos orgânicos e componentes inorgânicos, incluindo nutrientes (Shanks & Trent, 1979) e até protozoários (Caron et al, 1982). Essa diversidade de organismos dá-nos indícios da variedade de processos metabólicos que podem ocorrer nos agregados. Obviamente, a predominância de uma determinada partícula sólida agregada irá depender da sua concentração na água circundante. Assim, logo após um florescimento de diatomáceas no oceano, os agregados formados serão ricos em diatomáceas, e uma região com muitos detritos em suspensão irá produzir agregados ricos em detritos (Alldredge & Gotschalk, 1990).

Na literatura são descritos alguns mecanismos básicos na formação de agregados, mas aparentemente uma outra categoria de partículas, os TEP (transparent exopolymer particles), formados basicamente por polissacarídeos, são freqüentes na sua formação (Passow et al, 2001). Os TEP, por sua vez, são formados a partir dos polissacarídeos coloidais livres na água através de sua "coagulação", causada pelo colapso de bolhas e/ou por choque entre colóides com diferentes velocidades em um gradiente de cisalhamento,

processo que tem sido chamado "formação abiótica" (Mopper et al, 1995; Zhou et al, 1998). No entanto, essas partículas podem também ter origem biótica, a partir de cápsulas de polissacarídeos produzidas por microalgas (Bittar, 2005).

Os mecanismos básicos na formação de agregados são o choque de células com células ou com outras partículas como TEP, ou choques TEP/ TEP com posterior agregação de células, também por choques, em um gradiente de cisalhamento. O choque entre diatomáceas marinhas recobertas por polissacarídeos com alto poder adesivo pode, também, iniciar a formação de agregados, neste caso ricos em diatomáceas (Kjørboe & Hansen, 1993).

Uma vez iniciada a formação do agregado, este pode ir aumentando o tamanho através da agregação contínua de partículas sólidas e de material polimérico, como colóides e TEP. Em decorrência do aumento do seu tamanho, as taxas de afundamento dos agregados vão aumentando e acelerando a remoção de material particulado da coluna d'água, diminuindo sua concentração (Eppley et al, 1967; Wassmann, 1983). Com taxas de afundamento maiores do que qualquer célula ou filamento do fitoplâncton, as implicações ecológicas e biogeoquímicas associadas ao transporte de material em direção ao fundo são óbvias.

Como já foi dito, a presença de agregados nos oceanos é ubíqua e suas concentrações podem variar de algumas partículas por metro cúbico em regiões pelágicas oligotróficas (Alldredge & Youngbluth, 1985) até milhares por metro cúbico (Shanks & Trent, 1980). Entretanto, os dados sobre concentrações para lagos e reservatórios são muito escassos e os disponíveis, majoritariamente, referem-se ao grande, mesotrófico e pré-alpino lago Constance, na Alemanha (Grossart & Simon, 1993). Neste lago foram encontradas concentrações de 5 a 20 agregados por litro, com tamanhos que variaram de 3 a 10 mm (Grossart & Simon, 1993, 1998; Weiss et al, 1996).

Sendo partículas razoavelmente grandes e com altas taxas de afundamento, um dos importantes papéis dos agregados em ambientes marinhos, e provavelmente em lagos ou reservatórios com grande profundidade, é o transporte de matéria para o sedimento. Em ambientes marinhos, a importância dos agregados, a "marine snow", como fonte de nutrição para comunidades batipelágicas e abissopelágicas é considerada vital (Fowler & Knauer, 1986). Durante o afundamento, os agregados vão sofrendo profundas

modificações, ocasionadas pela colonização bacteriana, agregação de novas partículas e colóides e pela retirada de compostos orgânicos da água circundante.

Os grandes agregados, com sua geometria fractal, têm uma grande área relativa de superfície (Logan & Wilkinson, 1990) e, portanto, um grande potencial de adsorção. Conseqüentemente, durante sua queda, os agregados podem remover fósforo, nitrogênio, metais, elementos-traço, aminoácidos e proteínas das águas circundantes, o que os vai enriquecendo em termos nutricionais (Fowler & Knauer, 1986; Grossart & Simon, 1998).

As bactérias podem modificar os agregados pelo menos de duas maneiras distintas: pela decomposição do substrato orgânico (Simon et al, 2002) e, através de sua excreção de matéria orgânica, adicionar novos colóides e outras moléculas não glicídicas, como compostos nitrogenados, por exemplo (Decho, 1990). Além disso, as bactérias podem promover remineralização, enriquecendo os agregados com fósforo e várias formas de nitrogênio inorgânico, o que faz destas partículas importantes sítios para a produção primária, fato que representa, segundo Smetacek (1985), importante etapa nos ciclos biológicos de diatomáceas marinhas planctônicas. Através dos agregados, as diatomáceas, depois de um grande florescimento, podem efetuar migrações na coluna d'água, saindo da superfície exaurida de nutrientes para regiões mais profundas da zona eufótica. Para as diatomáceas neríticas, os agregados poderiam fornecer nutrientes necessários para que as células estruturam esporos de resistência rumo ao fundo, ou simplesmente aumentando a velocidade de chegada ao fundo, o que evitaria a dispersão por advecção (Smetacek, 1985). Em regiões pelágicas, com colunas d'água profundas, os agregados retirariam as diatomáceas depletadas de nutrientes das regiões superficiais, com águas mais quentes e com altas intensidades de luz, uma combinação letal para células vegetativas desses organismos depletados, além de não ser propícia à formação de esporos de resistência, e as arrastariam para regiões mais frias e escuras, onde tanto as células vegetativas quanto os esporos de resistência podem subsistir e iniciarem recrutamentos posteriores (Hargraves & French, 1983). Os agregados, além de retirarem rapidamente as células vegetativas das regiões superficiais, forneceriam os nutrientes necessários para a formação de esporos ou, nas espécies que não os produzem, divisões celulares necessárias para o recrutamento (Smetacek, 1985).

Entretanto, como foi citado, a grande maioria dos trabalhos envolvendo agregados é referente a ambientes marinhos e, portanto, o papel dessas partículas em ambientes lacustres é ainda pouco documentado. Para ilustrar esse desconhecimento poderiam ser feitas as seguintes perguntas. Em um lago ou reservatório eutrofizado, com grande produção de biomassa fitoplanctônica e, portanto, com grande quantidade de matéria orgânica particulada sendo sedimentada, que importância teriam os agregados no fluxo de matéria rumo ao sedimento? Que importância teriam os agregados nas estratégias reprodutivas de diatomáceas em um lago ou reservatório eutrofizado, polimítico e com pequena profundidade? As diatomáceas de um reservatório eutrofizado "utilizariam" os agregados no seu ciclo biológico da mesma maneira que as marinhas? Que importância teriam os agregados na "imobilização" de metais e compostos orgânicos tóxicos, como pesticidas e outras toxinas, de ocorrência constante em reservatórios eutrofizados?

O fato de não haver estudos sobre a produção de agregados em culturas de espécies tropicais de água doce, incluindo as diatomáceas, suscita uma outra importante questão. As espécies dominantes no Reservatório de Barra Bonita produzem agregados?

A presente proposta tem o intuito de iniciar trabalhos que forneçam subsídios para formulação das respostas a essas questões e a melhor abordagem é primeiro averiguar o papel das mais importantes espécies da comunidade, em termos de produção de biomassa, na formação de agregados gelatinosos.

Objetivos

O objetivo geral do trabalho é estudar o potencial de formação de agregados por *Aulacoseira granulata* e *Thalassiosira* cf. *duostr*a (Bacillariophyceae). A primeira espécie tem sido descrita por formar densas populações no Reservatório de Barra Bonita e por se apresentar com alta frequência nos agregados formados nesse reservatório. *T.* cf. *duostr*a forma populações pouco numerosas, porém frequentes, nesse reservatório, e foi utilizada em estudos iniciais de agregação devido a seu formato aproximadamente esférico.

Os objetivos específicos foram estudar, para *Aulacoseira granulata* e *Thalassiosira* cf. *duostr*a, os efeitos das taxas de cisalhamento, da idade da cultura e dos EPS produzidos por essas espécies na formação de agregados em culturas. Para *A. granulata*, estudar os

efeitos das células e do EPS dessa espécie na formação de agregados na água do Reservatório de Barra Bonita.

Material e métodos

1. Organismos e condições de cultivo

Aulacoseira granulata var. *granulata* (Ehrenberg) Simonsen e *Thalassiosira* cf. *duostra* (Pienaar) foram isoladas do reservatório de Barra Bonita, estado de São Paulo (22° 29'S, 48° 34'W) e estão agora inseridas no acervo da coleção de culturas do Departamento de Botânica da UFSCar (WCDM), com os códigos BB001 e BB028, respectivamente. As culturas experimentais foram efetuadas em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) modificado pela adição de mais 50 μM $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (WC sílica plus) a pH 7,0 e mantidas sob irradiâncias (E) de 100 -120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, em fotoperíodo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura de $21^\circ \pm 1^\circ \text{C}$. A irradiância escalar (E) foi medida com um sensor *quantameter* esférico (Biospherical Instruments™ QSL-100) em frascos de cultivo de vidro (1 L) preenchidos com água destilada. As culturas de *T. cf. duostra* e *A. granulata* foram efetuadas em garrações Pirex de 9 litros de capacidade com 7 litros de meio ou em garrações Pirex de 20 litros de capacidade com 16 litros de meio. Todas as culturas experimentais foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente e foram borbulhadas suavemente com ar filtrado apenas para sua homogeneização.

2. Amostragens

O crescimento de *A. granulata* e de *Thalassiosira* cf. *duostra* foi periodicamente (a cada 3-5 dias) monitorado por contagens de células (em seis réplicas) em câmara Palmer-Maloney e hemocítômetro Fuchs-Rosenthal, respectivamente, para se determinar as fases de crescimento nas quais seriam realizados os experimentos. Alíquotas foram retiradas para executar os experimentos de agregação em quatro diferentes idades da cultura de *A. granulata* (início, meio e final da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária de crescimento). *T. cf. duostra* teve alíquotas retiradas no início e final da fase exponencial de crescimento e na fase estacionária. Foram coletadas amostras para

quantificação, em HPLC- PAD, da concentração dos polissacarídeos extracelulares produzidos por essas espécies em cada idade de cultivo antes de cada experimento no floculador Couette. Os filmes de EPS presentes na superfície das células de *A. granulata* foram observados em cada idade descrita anteriormente utilizando microscópio Zeiss Axioplan 2 acoplado à câmera fotográfica Zeiss MC 200. Células e agregados foram corados negativamente com Nankin ou corados com Alcian Blue 0.06% (corante específico para polissacarídeos que apresentam grupos carboxila (-COOH), ou seja, polissacarídeos ácidos), examinados e fotografados.

3. *Quantificação dos polissacarídeos*

As alíquotas (20 mL) das culturas de *A. granulata* e da água da represa de Barra Bonita foram filtradas por filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poro 0,65 µm (A/G Technology, Amersham, UK) e as de *T. duostra* filtradas em filtros de fibra de vidro GF/ 52C (Schleicher & Schüll®) de poro 1,2 µm. O filtrado foi separado em duas alíquotas. Uma delas foi hidrolisada segundo Gremm & Kaplan (1997) (12h in 6 M HCl a 120° C), correspondendo à fração dos carboidratos totais. A outra alíquota, não hidrolisada, foi utilizada para se determinar a concentração de monossacarídeos livres, sendo a diferença entre essas duas frações a concentração de exopolissacarídeos (EPS). As análises foram feitas por detecção de pulso amperométrico em cromatografia líquida de alta performance (HPLC-PAD) (Gremm & Kaplan 1997). As análises em HPLC-PAD foram realizadas em Dionex™ (Sunnyvale, California) DX500, que consiste de uma versão com módulo de gradiente PEEK GP40, um detector eletroquímico ED40, e um injetor manual LC5 com uma válvula Rheodyne 9125 e um loop amostral de 25 µL. A ED40 é equipada com uma célula de fluxo amperométrico, um eletrodo-trabalho de ouro, e um eletrodo de referência Ag/AgCl. Uma coluna analítica de troca iônica PA-10 (4 x 250 mm; Dionex™, Sunnyvale, California), equipada com apropriada pré-coluna (4 x 50 mm), foi usada para separar os monossacarídeos. O eluente utilizado para a separação foi 18 mM NaOH, e para regeneração da coluna foi 200 mM NaOH a um fluxo de 1 mL · min⁻¹.

4. Formação de agregados

4.1. Floculador de Couette

O floculador Couette (figura 1) utilizado foi construído nas oficinas da UFSCar, segundo descrição de van Duuren (1968), e consiste em um cilindro externo rotatório, com velocidade variável, com diâmetro de 11,30 cm e um cilindro interno fixo, com diâmetro de 8,70 cm, ambos de acrílico e com altura de 24,9 cm. A distância entre os dois cilindros, onde é colocada a amostra a ser estudada, é de 1,3 cm, o que significa um volume de aproximadamente 1,0 litro. Entre os dois cilindros, quando o externo está em rotação, é criado um gradiente de cisalhamento laminar. A taxa de cisalhamento pode ser variada modificando-se a velocidade de rotação do cilindro externo, por intermédio de um motor cuja rotação (rpm) pode ser variada através de um potenciômetro. Essa taxa média de cisalhamento laminar (G, s^{-1}) pode ser calculada segundo a equação de van Duuren (1968):

$$G = 4\pi NR_1R_2(R_2^2 - R_1^2)^{-1}$$

Onde: R_1 = raio do cilindro interno; R_2 = raio do cilindro externo; N = velocidade do cilindro externo (rotações $\cdot s^{-1}$).

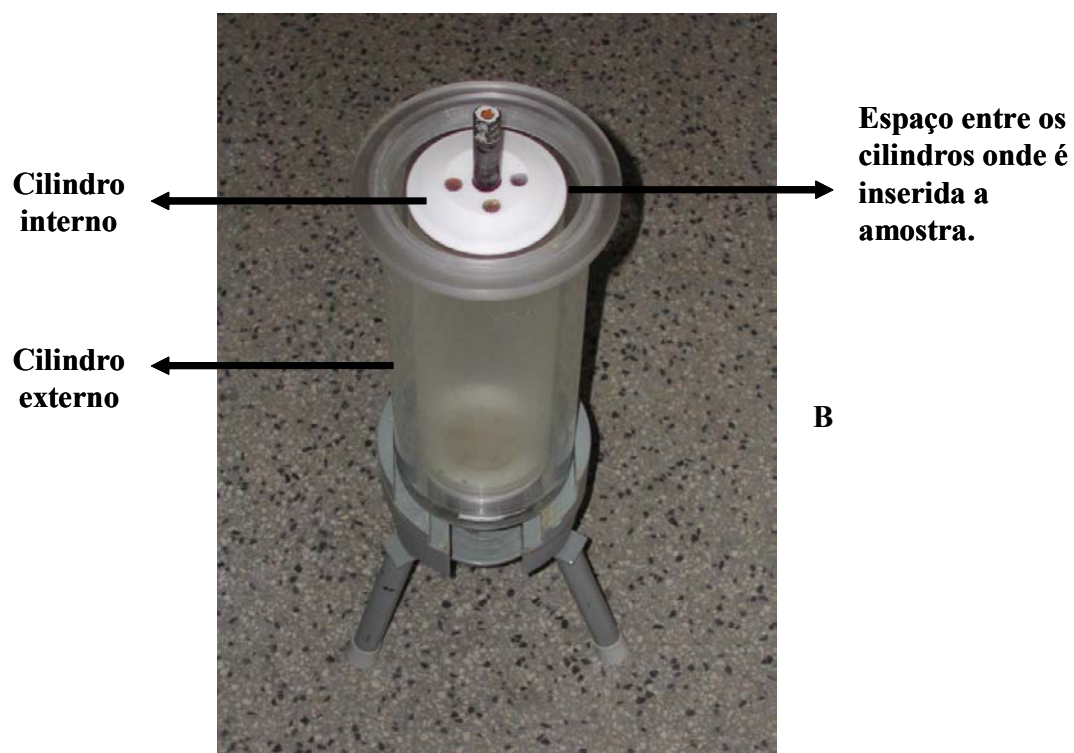
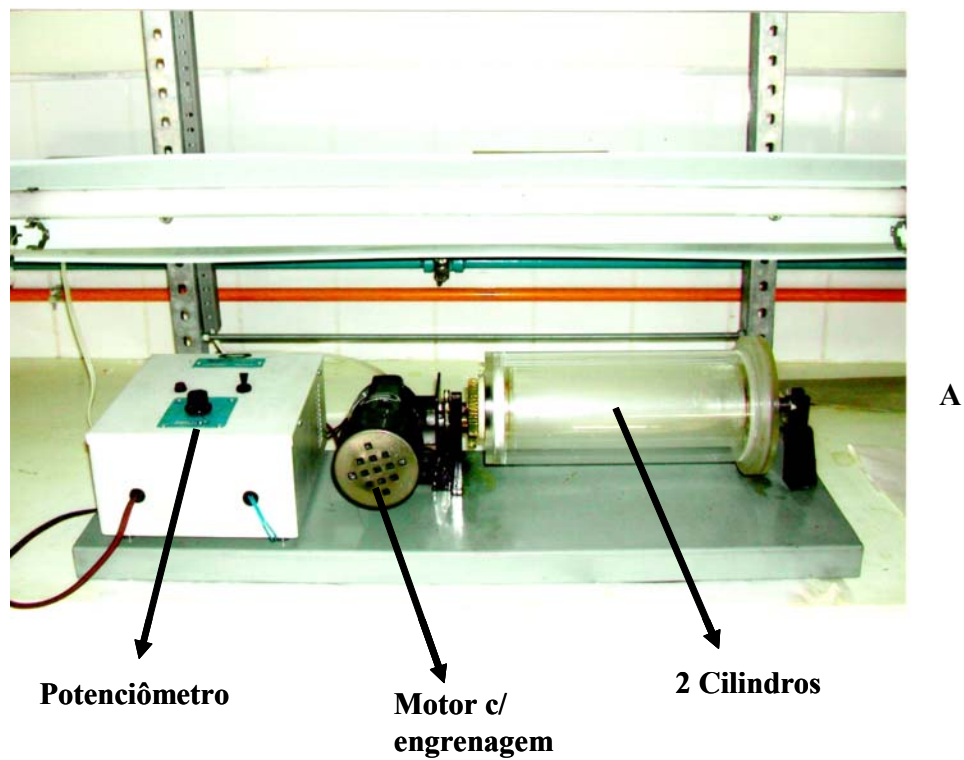


Figura 1: Floculador Couette construído na oficina mecânica da UFSCar. (A) Vista lateral. (B) Vista dos cilindros entre os quais a amostra em estudo é inserida.

Em um ambiente de cisalhamento, onde as partículas movem-se em diferentes velocidades, as células irão se chocar umas com as outras e poderão formar agregados, o que dependerá do grau de adesão (*stickiness*) dos polissacarídeos extracelulares que recobrem as células, na forma de bainhas, cápsulas ou simples filmes, e dos polissacarídeos extracelulares livres no meio. Alguns gêneros como *Chaetoceros* (marinho), que apresentam cerdas recurvadas em suas frústulas, a formação de agregados pode ser facilitada por essas estruturas que se engancham umas às outras. Nos experimentos realizados com a espécie *Thalassiosira* cf. *duostr*a, conforme será discutido posteriormente, fibras de quitina (n-acetil-glicosamina), sintetizadas por esta alga, também poderiam ter contribuído para o processo de agregação, um mecanismo apenas descrito superficialmente na literatura (ver figura 25, Discussão).

4.2. Formação de agregados em culturas de *T.* cf. *duostr*a e *A. granulata*

4.2.1. Quantificação da agregação

Com a formação de agregados em uma cultura unialgal, a concentração de partículas em suspensão tende a diminuir, enquanto seu tamanho médio aumenta em função do tempo de experimento (Kjørboe et al, 1990; Kjørboe & Hansen, 1993). Considerou-se uma partícula como sendo uma célula solitária e/ou um filamento, bem como um agregado de células.

A agregação foi quantificada pela retirada cautelosa de sub-amostras (3-5 mL, com pipeta de Pasteur de boca larga) a cada 15 minutos e contagem da concentração de partículas por mililitro ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em câmara Palmer-Malloney em três ou quatro réplicas. A cada amostragem, o volume retirado foi repostado com a suspensão fitoplanctônica. Um teste piloto foi realizado com Nankin, mostrando que durante a floculação as partículas distribuem-se de maneira homogênea dentro do floculador em tempo inferior a 15 minutos, garantindo uma amostragem segura.

O decaimento na concentração de partículas em suspensão foi descrito por modelos matemáticos, que foram escolhidos de acordo com o tipo de comportamento das partículas durante o processo de agregação. Assim, no caso de *T.* cf. *duostr*a, aplicou-se um modelo linear de primeira ordem, pois as partículas descreveram um decaimento linear:

$$C = kt + C_0,$$

onde C = concentração de partículas no tempo t , C_0 = concentração inicial de partículas; t = tempo de experimento e k = coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão.

Nos experimentos com *A. granulata*, foram aplicados dois modelos diferentes, pois o processo de agregação pode ser interpretado de duas maneiras. As parametrizações foram obtidas por regressões não-lineares (algoritmo iterativo de Levenberg-Marguardt, descrito em Press et al, 1993):

a) O primeiro modelo, modelo bifásico, considera que o processo de agregação ocorre em duas etapas, sendo a primeira mais rápida, seguida de uma segunda etapa mais lenta:

$$C_t = C_0 e^{-k_1 t} + C_0' e^{-k_2 t},$$

onde C_t = concentração de partículas em suspensão no tempo t ; C_0 = concentração inicial de partículas envolvidas no processo de agregação na primeira etapa; k_1 = coeficiente de decaimento de partículas na primeira etapa do processo de agregação; C_0' = concentração inicial de partículas envolvidas no processo de agregação na segunda etapa, k_2 = coeficiente de decaimento de partículas na segunda etapa do processo de agregação, t = tempo de experimento;

b) O segundo modelo utilizado, modelo exponencial, assume que a agregação ocorre em apenas uma etapa exponencial:

$$C_t = C_0 + C' e^{-kt},$$

onde C_t = concentração de partículas em suspensão no tempo t ; C_0 = limite mínimo teórico da concentração de partículas, C' = concentração de partículas envolvidas na agregação; k = coeficiente de decaimento de partículas no processo de agregação e t = tempo de experimento.

A quantificação da agregação de células foi obtida pela comparação dos coeficientes de decaimento e o respectivo número de partículas envolvido na agregação durante o tempo total de experimento (120-210 minutos). O número de partículas envolvido foi calculado como a média do número de partículas inicial \pm desvio padrão subtraída da média do número de partículas final em suspensão \pm desvio padrão.

4.2.2. Efeito das taxas de cisalhamento na agregação

A taxa de cisalhamento influi diretamente na agregação, já que determina o padrão de movimento e a velocidade das partículas em suspensão e, portanto, as colisões entre elas no ambiente aquático natural. Portanto, os estudos foram iniciados tendo como foco principal determinar o papel da taxa média de cisalhamento (G, s^{-1}) na agregação das duas espécies de diatomáceas.

Como em ensaios prévios obteve-se formação de agregados com a água da represa de Barra Bonita, decidiu-se utilizar a concentração de partículas próxima à encontrada comumente na represa (Dellamano-Oliveira, comunicação pessoal). Desse modo, de culturas de *T. cf. duostra* e *A. granulata* na metade final da fase exponencial de crescimento, retirou-se uma alíquota e esta foi diluída, utilizando-se meio WC pH 7,0 sem adição de fosfato, nitrato e micronutrientes (tampão WC), a uma concentração final de $1,0 \times 10^4 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$. Essas suspensões de células foram submetidas a três diferentes velocidades de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}) durante 180 minutos nos experimentos com *T. cf. duostra* e durante 120 minutos com *A. granulata*. Nos experimentos realizados com *A. granulata*, o tampão WC foi filtrado em cartucho de fibra oca com poro $0,65 \mu\text{m}$ (A/G Technology, Amersham, UK) para reter possíveis precipitados do meio.

4.2.3. Efeito dos precipitados do meio WC na agregação

Para estudar se os precipitados do meio WC influem no processo de formação de agregados, foi utilizada uma cultura de *A. granulata* na fase final do crescimento exponencial, como descrito a seguir. A cultura foi submetida à filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poro $0,65 \mu\text{m}$ para separar as células e o EPS a serem empregados no experimento. O filtrado contendo o EPS da diatomácea foi concentrado (20 x) por filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poro 10000 D (massa molecular). 2 L de tampão WC pH 7,0 foram divididos em duas frações de 1L, sendo uma delas filtrada em filtro de fibra de vidro GF/ 52C (Schleicher & Schüll®) de poro $1,2 \mu\text{m}$ e a outra fração filtrada em filtro de fibra vidro $0,45 \mu\text{m}$, para retirar os precipitados. Em seguida, as células foram ressuspensas ($1,0 \times 10^4 \text{ Part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em cada fração de meio WC, com adição do

EPS obtido em concentração igual à originalmente encontrada na cultura (medida pelo método fenol-sulfúrico de Dubois, 1956).

4.2.4. Efeito da idade da cultura e do EPS na agregação

Adotando a concentração inicial de partículas como $1,0 \times 10^4$ part · mL, seguiu-se para a determinação do potencial de agregação em diferentes idades da cultura de ambas as espécies para se observar se a agregação seria influenciada pela idade de cultivo e pelo EPS excretado.

O aumento da concentração e a modificação, em função do tempo de cultivo (ou idade celular), da composição e das propriedades físicas e químicas dos exopolissacarídeos (EPS) pode aumentar a adesividade das células. Para a averiguação desse efeito, foram montadas culturas de *T. cf. duostra* e *A. granulata*, e, nas diferentes idades, as suspensões de células foram submetidas à floculação. O tempo de exposição à floculação foi de 3 horas e 30 minutos (210 minutos) e taxa de cisalhamento de $G = 10 \text{ s}^{-1}$ para *T. cf. duostra* e $G = 3 \text{ s}^{-1}$ durante 180 minutos para *A. granulata*. Foram escolhidas as taxas de cisalhamento ótimas para cada espécie, determinadas previamente com o estudo do efeito de G na agregação. As idades de cultivo utilizadas para *T. duostra* foram: início e final da fase exponencial e fase estacionária (8, 27 e 34 dias de cultivo, respectivamente). Os experimentos com *A. granulata* foram realizados no início, meio, final da fase exponencial e início da fase estacionária (8, 18, 28 e 34 dias de cultivo, respectivamente).

Os experimentos foram executados como descrito a seguir: em cada idade, foi retirada uma alíquota de cada cultura. As células foram separadas do meio de cultura (incluindo o EPS) por filtração em filtros de fibra de vidro GF/ 52C (Schleicher & Schüll®) de poro $1,2 \mu\text{m}$ para os experimentos com *T. cf. duostra*; e por filtração em cartucho de fibra oca com poro $0,65 \mu\text{m}$ para os experimentos realizados com *A. granulata*. Ambas porosidades não retêm os polissacarídeos coloidais excretados. Para retirar o EPS, as células foram lavadas por centrifugação com tampão WC. Após a centrifugação, cada alíquota de células foi dividida em duas alíquotas iguais. Uma delas foi ressuspensa em tampão WC novo e a outra alíquota foi ressuspensa no filtrado, contendo o EPS da cultura. Desse modo, a influência da idade na agregação de ambas espécies pôde ser estudada na ausência e na presença do EPS.

4.3. Papel de *Aulacoseira granulata* na formação de agregados na água de Barra Bonita

4.3.1. Efeito do EPS de *A. granulata* na agregação

Para se estudar o efeito do EPS dissolvido de *A. granulata* na formação de agregados na água integral de Barra Bonita, extraíram-se os polissacarídeos de uma cultura de 16 L da diatomácea, cultivada nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se o seguinte método: quando a cultura atingiu o final da fase exponencial de crescimento, foi filtrada tangencialmente em cartucho de fibra oca com poro 0,65 μm para se retirar as células. Em seguida, isolou-se o EPS por filtração tangencial em cartucho de fibra oca com poro 10000 D. Os polissacarídeos da água de Barra Bonita (entre 0,65 μm e 10000 D) foram extraídos pelo mesmo processo de filtração tangencial e o EPS de *A. granulata* foi então adicionado à água da represa no lugar dessa fração.

Foram realizados, em duplicata, dois experimentos de agregação utilizando-se o floculador Couette ($G=3\text{ s}^{-1}$, durante 3 horas): (a) água integral de Barra Bonita (controle); (b) água de Barra Bonita com o EPS de *A. granulata*. A concentração de EPS adicionada foi igual àquela presente na água de Barra Bonita, que foi determinada pelo método fenol-sulfúrico como igual a $2,335 \pm 0,063\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.3.2. Efeito da densidade de células de *A. granulata* na agregação

Para se estudar o efeito das células de *A. granulata* na formação de agregados na água integral de Barra Bonita, adicionou-se células da diatomácea no final da fase exponencial de crescimento da cultura a uma concentração final de $1,0 \times 10^4$ filamentos por mililitro ($\text{fil} \cdot \text{mL}^{-1}$) (cerca de $4,0 \times 10^4\text{ Cel} \cdot \text{mL}$), simulando um *bloom* da espécie no reservatório (Jati, 1998 e Calijuri et al, 2002 descreveram densidades superiores a $10^4\text{ fil} \cdot \text{mL}^{-1}$). As células foram obtidas por filtração tangencial da cultura utilizada na extração do EPS (item anterior) em cartucho de fibra oca com poro 0,65 μm e lavadas uma vez por centrifugação com tampão WC para a retirada do EPS remanescente.

A água de Barra Bonita com adição das células de *A. granulata* foi então floculada em duplicata em floculador Couette à taxa de cisalhamento $G=3\text{ s}^{-1}$, durante 3 horas.

4.3.3. Quantificação da formação de agregados na água de Barra Bonita

Contagens da concentração de células de *Aulacoseira granulata* livres em suspensão foram feitas a partir de alíquotas retiradas antes e imediatamente após 3 horas de experimento para se determinar a participação dessa diatomácea nos agregados. Uma cultura de *A. granulata*, cultivada sob as mesmas condições descritas anteriormente, foi utilizada para se obter uma curva-padrão montada com várias concentrações celulares ($\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) em relação ao conteúdo celular de carbono ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em diferentes idades (início, meio e final da fase exponencial e fase estacionária). As células foram lavadas por centrifugação em tampão WC para retirada do EPS, ressuspensas em diferentes concentrações conhecidas em tampão WC e tiveram seu teor de carbono (celular) determinado (TOC-Vcph, Shimadzu). Dessa maneira, pôde-se transformar concentração de células em concentração de carbono celular (foi descontado o teor de carbono do tampão WC). As curvas relativas a cada idade (regressões lineares, com $R^2 > 0,90$) foram integradas em uma única curva-padrão após teste de análise de variância (Coeficiente de variação $< 15\%$ e teste ANOVA, $p > 0,1$).

Os agregados formados foram coletados com pipeta de Pasteur de boca larga, contados e tiveram as áreas medidas em câmara de sedimentação (volume= 0,628 mL, diâmetro= 2 cm e altura= 0,2 cm) utilizando microscópio Olympus BX41 com equipamento de captura de imagem. As medidas de área foram realizadas com o Software Image Pro-Plus, Microsoft®.

Resultados

1. Curvas de crescimento

Thalassiosira cf. duostra

A figura 2 mostra a curva de crescimento de *T. cf. duostra* na cultura utilizada nos experimentos de floculação na presença e ausência de EPS. O padrão de crescimento correspondeu a uma fase lag inicial, seguida de uma fase exponencial até aproximadamente 29 dias, quando o crescimento declinou, iniciando-se a fase estacionária. A densidade celular máxima atingida foi de cerca de $2,7 \times 10^6 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ no início da fase estacionária.

Aulacoseira granulata

A figura 3 apresenta as curvas de crescimento das culturas de *A. granulata* utilizadas nos experimentos do efeito da idade na formação de agregados pela espécie na presença de EPS e ausência de EPS. As culturas apresentaram o padrão de crescimento de uma fase lag, seguida de uma fase exponencial e, após declínio do crescimento, fase estacionária inicial.

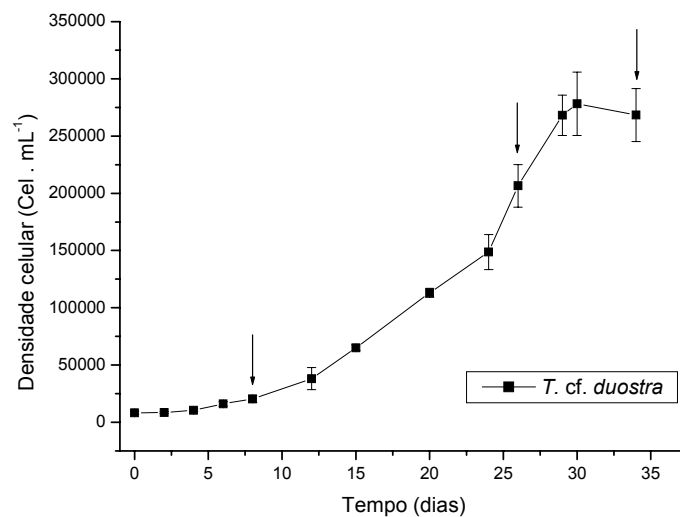


Figura 2: Curva de crescimento de *Thalassiosira cf. duostra*. Variação na densidade celular (Cel · mL⁻¹) da cultura durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao desvio padrão (n= 6). As setas correspondem aos dias de experimentos de floculação.

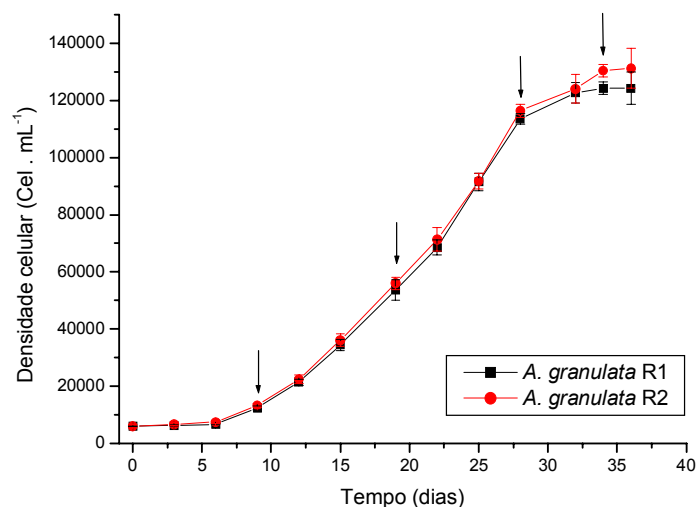


Figura 3: Curva de crescimento de *Aulacoseira granulata*. Variação na densidade celular ($\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) da cultura durante 36 dias (R1 e R2 são réplicas). As barras de erro correspondem ao desvio padrão ($n=6$). As setas correspondem aos dias de experimentos de floculação.

2. Concentração de EPS

Thalassiosira cf. duostra

A figura 4 mostra a concentração de EPS excretado por *T. cf. duostra* durante seu ciclo de crescimento. A concentração desses compostos no meio aumenta desde $0,013 \text{ mg} \cdot \text{L}$ até atingir o máximo de $1,45 \pm 0,34 \text{ mg} \cdot \text{L}$ na fase estacionária.

Aulacoseira granulata

A figura 5 mostra a concentração de EPS produzido por *A. granulata* durante seu ciclo de crescimento, utilizada nos experimentos de floculação em presença e ausência de EPS. Observa-se que a concentração de EPS aumenta com o tempo de cultivo, alcançando as maiores concentrações no final da fase exponencial ($0,358 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{L}$) e início da fase estacionária ($0,79 \pm 0,03 \text{ mg} \cdot \text{L}$).

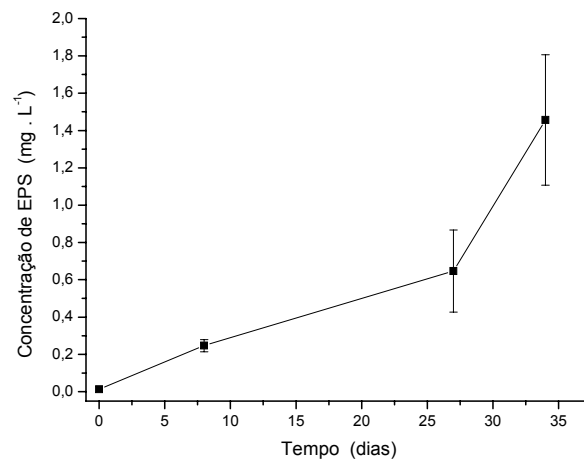


Figura 4: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração do EPS excretado (mg · L⁻¹) durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao erro médio (n= 2).

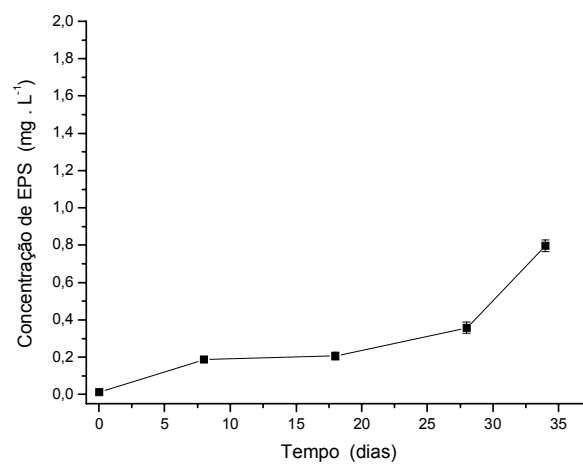


Figura 5: *Aulacoseira granulata*. Concentração do EPS (mg · L⁻¹) produzido (A) durante 34 dias de cultivo. As barras de erro correspondem ao erro médio (n= 2).

3. Formação de agregados em culturas

3.1 Efeito das taxas de cisalhamento na agregação

Nesse experimento, alíquotas de culturas de *T. cf. duostra* e *A. granulata* no final da fase exponencial de crescimento foram diluídas à concentração de $1,0 \times 10^4$ part · mL⁻¹ e submetidas à floculação sob 3 diferentes taxas de cisalhamento ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $G = 10 \text{ s}^{-1}$ e $G = 30 \text{ s}^{-1}$).

Thalassiosira cf. duostra

Como pode ser observado na tabela 1 e figura 6, as amostragens periódicas permitem que se detecte a diminuição na concentração de partículas de *T. cf. duostra* em suspensão ao longo do tempo de experimento. A concentração de partículas em suspensão declinou em função do tempo de exposição à floculação em $G = 3 \text{ s}^{-1}$ e $G = 10 \text{ s}^{-1}$, mas não em $G = 30 \text{ s}^{-1}$. O número de partículas envolvidas na agregação com $G = 3 \text{ s}^{-1}$ foi $3838,37 \pm 74,09$ part · mL⁻¹ (37,29%). Em taxa de $G = 10 \text{ s}^{-1}$, o número de partículas agregadas foi de $6805,14 \pm 456,41$ part · mL⁻¹ (65,25%). Em $G = 30 \text{ s}^{-1}$, não houve agregação significativa após 3 horas de experimento (teste “t” de Student, $p = 0,2778$). O maior coeficiente de decaimento do número de partículas por mililitro (part · mL⁻¹) ocorreu quando a suspensão da diatomácea foi submetida a $G = 10 \text{ s}^{-1}$, com $k = 23,796$, contra $k = 13,487$, em $G = 3 \text{ s}^{-1}$ e $k = 8,917$ em $G = 30 \text{ s}^{-1}$. O coeficiente de decaimento em $G = 10 \text{ s}^{-1}$ é 1,7 vez maior que aquele encontrado em $G = 3 \text{ s}^{-1}$, indicando que o processo de agregação em 10 s^{-1} ocorre mais rapidamente que em 3 s^{-1} .

Tabela 1: *Thalassiosira cf. duostra*. Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento. O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	$G=3 \text{ s}^{-1}$	$G=10 \text{ s}^{-1}$	$G=30 \text{ s}^{-1}$
0	10293,37 ± 123,30	10428,9 ± 636,10	10560,08 ± 855,40
15	7993,86 ± 170,44	7933,79 ± 78,57	10318,98 ± 745,23
30	9125,13 ± 85,45	7814,66 ± 89,89	9846,86 ± 539,15
45	9818,70 ± 32,48	7815,38 ± 590,91	10544,05 ± 234,72
60	8504,97 ± 274,67	6581,68 ± 94,74	10253,49 ± 883,41
75	9270,84 ± 394,89	7214,09 ± 156,86	10425,22 ± 203,80
90	8286,37 ± 687,21	7503,04 ± 293,12	10283,54 ± 695,10
105	7847,95 ± 273,39	6127,83 ± 417,16	9368,14 ± 239,82
120	8322,92 ± 738,90	6209,67 ± 350,90	8476,98 ± 258,18
135	8394,81 ± 396,60	6613,38 ± 230,41	9269,23 ± 379,70
150	8059,60 ± 252,07	5950,46 ± 438,06	8691,64 ± 299,74
165	7300,29 ± 117,47	5686,07 ± 369,07	9143,91 ± 376,93
180	6454,99 ± 49,21	3623,80 ± 179,69	9657,96 ± 121,60
% agreg	37,29	65,25	8,54

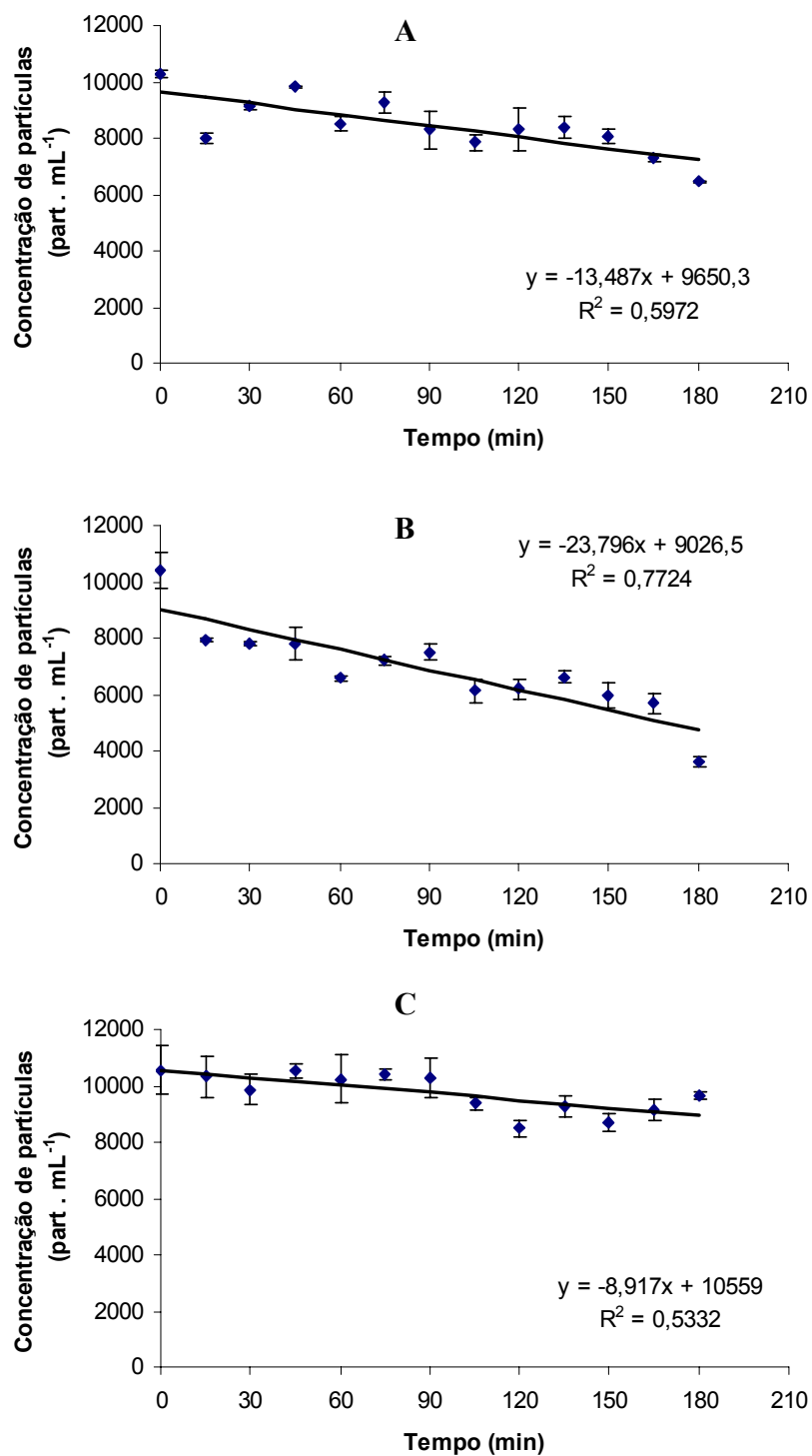


Figura 6: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹) em função do tempo de floculação, em diferentes gradientes de cisalhamento: (A) $G = 3 \text{ s}^{-1}$; (B) $G = 10 \text{ s}^{-1}$; (C) $G = 30 \text{ s}^{-1}$. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n = 3$).

Aulacoseira granulata

A figura 7 e a tabelas 2, 3 e 4 mostram que a agregação por *A. granulata* foi dependente das taxas de cisalhamento no intervalo entre 3-30 s⁻¹. A mais baixa taxa de cisalhamento (3 s⁻¹) proporcionou o maior coeficiente de decaimento $k= 0,118 \pm 0,036$ no primeiro estágio do processo de agregação (tabela 4), quando comparada a $k= 0,0201 \pm 0,005$ ocorrido à taxa de 10 s⁻¹ (teste “t” de Student, $p= 0,0359$) e $k= 0,0084 \pm 0,0009$ à taxa de 30 s⁻¹ (teste “t” de Student, $p= 0,0446$). Além disso, a figura 7 mostra que houve formação de agregados após 80 minutos de experimento apenas quando as células de *A. granulata* foram submetidas à floculação a uma taxa de 3 s⁻¹ ($k= 0,0053 \pm 0,001$). O teste ANOVA ($p=0,0081$, teste Tukey, $3 \text{ s}^{-1} < 10 \text{ s}^{-1} = 30 \text{ s}^{-1}$) determinou que o número de partículas envolvidas na agregação ao final de duas horas de floculação (tabela 2) foi maior à taxa de 3 s⁻¹ ($6226,66 \pm 306,66 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$), quando comparado a 10 s⁻¹ ($3553,33 \pm 576,66 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 30 s⁻¹ ($1726,66 \pm 70 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$).

De acordo com o modelo exponencial (figura 8, tabela 4), o coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão $k= 0,0256 \pm 0,009$ apresentado em $G= 3 \text{ s}^{-1}$ foi igual ao coeficiente $k= 0,0201 \pm 0,006$, apresentado em $G= 10 \text{ s}^{-1}$ (teste “t” de Student, $p= 0,2902$). O coeficiente descrito nos experimentos com $G= 30 \text{ s}^{-1}$ foi $k= 0,0084 \pm 0,0009$, significativamente menor que os coeficientes às taxas 3 s⁻¹ (teste “t” de Student, $p= 0,0472$) e 10 s⁻¹ (teste “t” de Student, $p= 0,0470$). Como os coeficientes de decaimento em 3 s⁻¹ e 10 s⁻¹ foram iguais e o número de partículas agregadas foi maior na mais baixa taxa de cisalhamento, o processo de agregação ocorreu mais rapidamente quando *A. granulata* foi submetida a $G= 3 \text{ s}^{-1}$.

A comparação entre os modelos bifásico e exponencial (tabela 4) mostra que a diferença entre os coeficientes de decaimento (k) apresentados por cada modelo foi significativa (teste “t” de Student, $p= 0,0450$) apenas quando o modelo bifásico detectou que o processo de agregação ocorreu em duas etapas ($G=3 \text{ s}^{-1}$).

Tabela 2: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	G= 3 s^{-1}	G= 10 s^{-1}	G= 30 s^{-1}
0	10470,00 ± 200,00	10096,66 ± 402,22	10386,66 ± 88,89
15	7773,33 ± 142,22	9040,00 ± 213,33	9720,00 ± 146,66
30	6740,00 ± 173,33	8336,66 ± 164,44	9386,66 ± 108,88
45	6226,66 ± 204,44	8000,00 ± 273,33	9890,00 ± 133,00
60	5606,66 ± 202,22	7736,66 ± 242,33	9243,33 ± 357,70
75	5320,00 ± 106,66	7170,00 ± 413,33	8860,00 ± 300,00
90	5463,33 ± 217,77	7040,00 ± 73,33	8450,00 ± 146,66
105	4563,33 ± 168,00	7036,66 ± 188,88	8433,33 ± 295,55
120	4550,00 ± 166,60	7140,00 ± 226,66	8730,00 ± 353,33
% agreg	56,54	29,28	15,94

Tabela 3: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento em três gradientes de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	G= 3 s^{-1}	G= 10 s^{-1}	G= 30 s^{-1}
0	10636,66 ± 137,77	10720 ± 293,33	10276,66 ± 115,55
15	8203,33 ± 195,50	9586,66 ± 297,70	9606,66 ± 131,11
30	6986,66 ± 97,77	8956,66 ± 302,22	10036,66 ± 308,80
45	6766,66 ± 162,22	8356,66 ± 262,22	9346,66 ± 188,89
60	6176,66 ± 235,50	7406,66 ± 395,55	9086,66 ± 124,44
75	4920,00 ± 173,33	6606,66 ± 302,30	8580,00 ± 313,33
90	4776,66 ± 184,44	6430,00 ± 233,33	9023,33 ± 197,70
105	4173,33 ± 164,44	6180,00 ± 253,33	8486,66 ± 288,88
120	4103,33 ± 142,00	6610,00 ± 280,00	8480,00 ± 326,66
% agreg	61,42	38,34	17,48

Tabela 4: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação após 120 min de floculação a diferentes taxas de cisalhamento (3 s^{-1} , 10 s^{-1} e 30 s^{-1}).

G (s^{-1})	Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Coefficiente de decaimento (k)	
		Bifásico	Exponencial
3	$6226,66 \pm 306,66$	$0,118 \pm 0,036$	$0,0256 \pm 0,009$
10	$3533,33 \pm 576,66$	$0,0201 \pm 0,005$	$0,0201 \pm 0,006$
30	$1726,33 \pm 70,00$	$0,0084 \pm 0,0009$	$0,0084 \pm 0,0009$

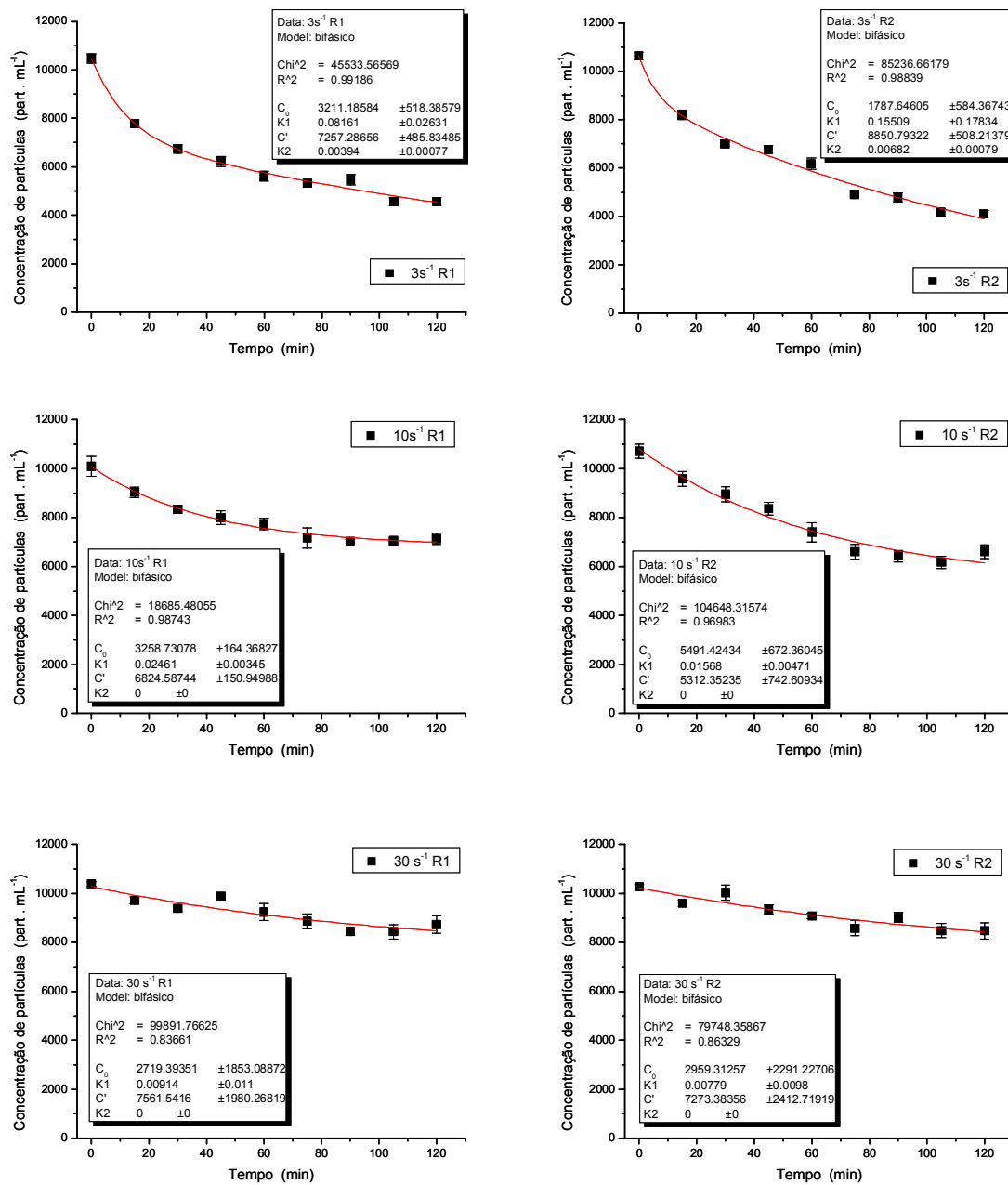


Figura 7: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹) em função do tempo em diferentes taxas de cisalhamento (3 s⁻¹, 10 s⁻¹ e 30 s⁻¹). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio (n= 3).

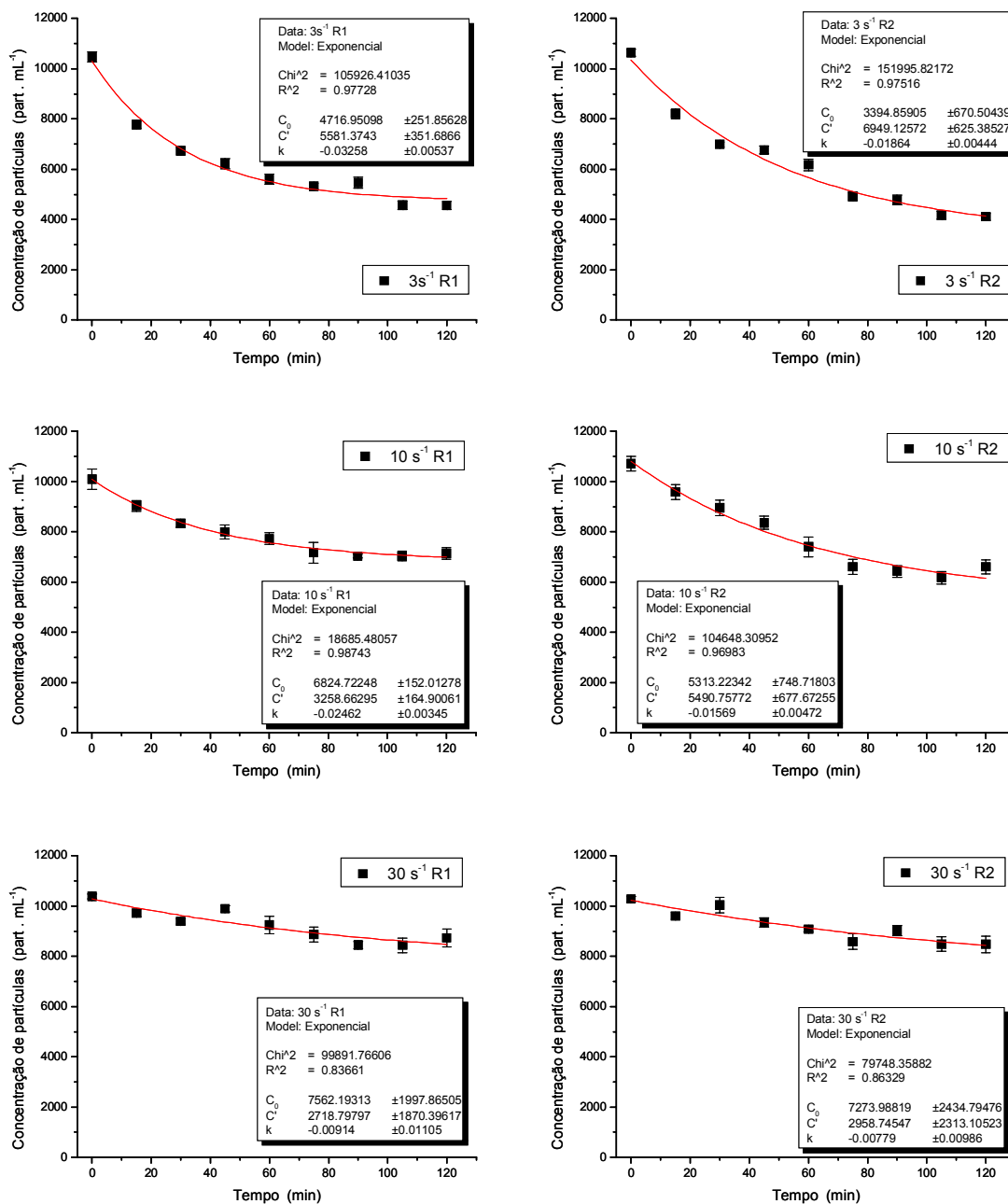


Figura 8: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹) em função do tempo em diferentes taxas de cisalhamento (3 s⁻¹, 10 s⁻¹ e 30 s⁻¹). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio (n=3).

3.2. Efeito dos precipitados do meio WC na agregação

A figura 9 e a tabela 5 mostram os resultados das floculações de *A. granulata* na presença e na ausência de precipitados do meio WC. O número de partículas agregadas ao final do experimento na presença dos precipitados foi $7160 \pm 429,37 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ (68,29 %), consideravelmente maior que na sua ausência ($5096,66 \pm 154,75 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$; 49,73%). De acordo com o modelo exponencial, o coeficiente de decaimento na presença dos precipitados ($k = 0,026 \pm 0,005$) foi próximo ao obtido em sua ausência ($k = 0,024 \pm 0,004$).

Os coeficientes de decaimento obtidos com o modelo bifásico (figura 10) foram os mesmos apresentados pelo modelo exponencial.

Tabela 5: *Aulacoseira granulata*. Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento na presença e ausência de precipitados ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $t = 150 \text{ min}$). O erro corresponde ao erro médio ($n = 3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	Com precipitado	Sem precipitado
0	$10483,33 \pm 328,68$	$10246,66 \pm 274,65$
30	$6883,33 \pm 631,37$	$7646,66 \pm 227,22$
60	$4640 \pm 494,87$	$5803,33 \pm 240,06$
90	$3623,33 \pm 365,28$	$5336,66 \pm 508,46$
120	$4200 \pm 320,46$	$4843,33 \pm 320,36$
150	$3323,33 \pm 250,06$	$5150 \pm 165,22$
% agreg	68,29	49,73

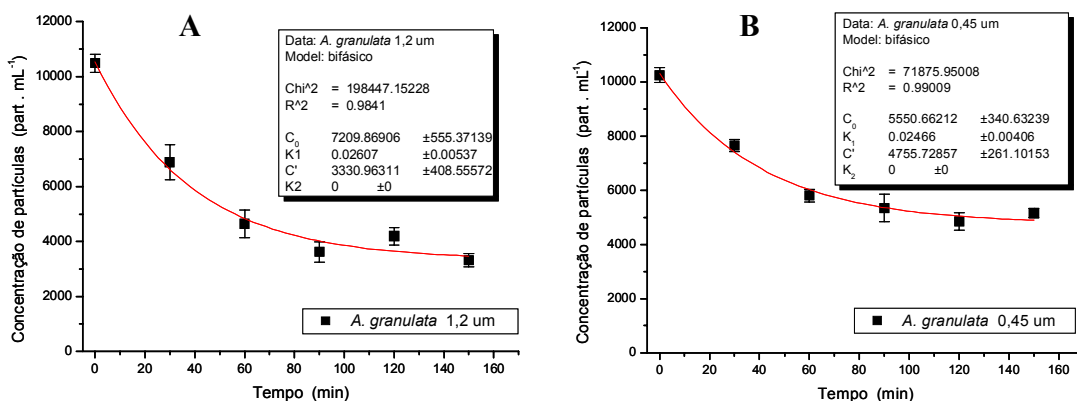


Figura 9: *Aulacoseira granulata*. Modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo. (A) com os precipitados e (B) sem os precipitados. ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $t = 150$ minutos). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

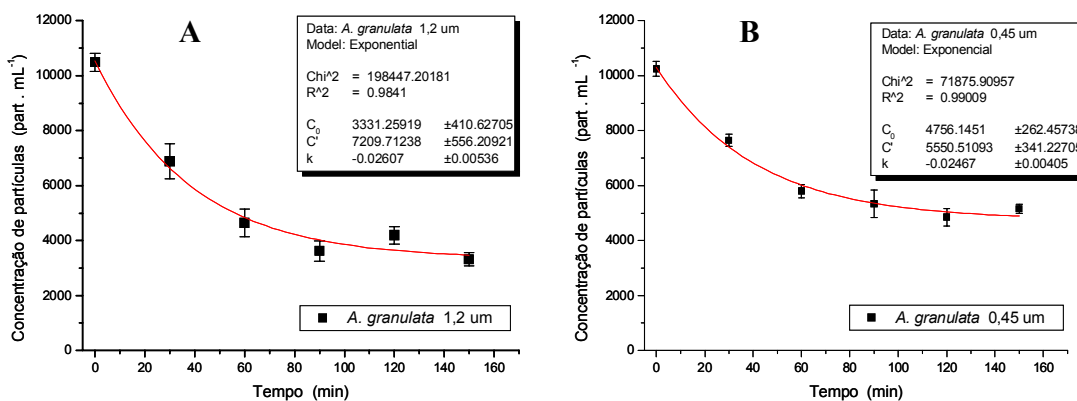


Figura 10: *Aulacoseira granulata*. Modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo. (A) com os precipitados e (B) sem os precipitados. ($G = 3 \text{ s}^{-1}$, $t = 150$ minutos). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

3.3. Efeito da idade de cultivo na agregação

As idades de cultivo utilizadas para *T. duostra* foram : início e final da fase exponencial e fase estacionária (8, 27 e 34 dias, respectivamente). Os experimentos com *A. granulata* foram realizados no início, meio, final da fase exponencial e início da fase estacionária (8, 18, 28 e 34 dias, respectivamente). A partir deste ponto, as fases de crescimento serão chamadas, por motivo de clareza, pelo número de dias de cultivo (por exemplo, início da fase exponencial será referido como fase 8 dias e assim sucessivamente).

3.3.1. Flocculação na ausência de EPS

Thalassiosira cf. duostra

Como se pode observar na tabela 6 e figura 11, a flocculação de células de *T. cf. duostra* na ausência de EPS forma agregados significativamente apenas na fase 27 dias. Nessa idade, o coeficiente de agregação descrito pelo modelo linear foi $k= 3,74$. Na fase 8 dias, o coeficiente de decaimento (k) foi calculado como igual a 1,69, apesar de a agregação não ter sido significativa após 210 minutos de experimento (teste “t” de Student, $p= 0,1443$). Na fase 34 dias, não houve agregação, como mostrado pelo valor positivo de k e pelo teste “t” de Student ($p= 0,2274$) entre os números inicial e final de partículas em suspensão. Após 210 minutos de experimento com a cultura na fase 27 dias, a flocculação envolve $1247,5 \pm 131,73 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$, tendo sido agregadas 12,69% das partículas em suspensão (teste “t” de Student, $p= 0,0067$).

Tabela 6: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo de floculação e porcentagem de agregação (% agreg) ao final do experimento, na ausência de EPS ($G= 10 \text{ s}^{-1}$, $t= 210 \text{ min}$) O erro corresponde ao erro médio ($n= 3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	Fase 8 dias	Fase 27 dias	Fase 34 dias
0	10445,0 ± 354,26	9827,50 ± 364,72	10447,50 ± 337,47
15	10010,60 ± 624,89	8779,24 ± 845,69	9566,70 ± 211,88
30	9567,66 ± 896,48	9000,55 ± 452,10	10059,32 ± 333,21
45	9874,58 ± 632,11	8623,14 ± 289,70	10248,79 ± 548,70
60	10654,15 ± 452,88	8244,70 ± 234,11	9875,58 ± 471,26
75	10530,60 ± 447,95	9110,55 ± 124,10	9542,00 ± 655,30
90	10152,66 ± 554,60	8746,95 ± 412,92	10056,90 ± 239,44
105	9642,30 ± 199,34	8598,47 ± 398,67	10448,60 ± 198,46
120	10402,50 ± 229,55	8345,66 ± 201,60	9810,74 ± 235,68
135	10000,55 ± 547,25	8725,66 ± 199,55	10166,54 ± 548,91
150	10358,60 ± 336,57	8425,11 ± 305,31	9744,56 ± 132,90
165	9245,00 ± 487,33	8914,77 ± 504,60	10248,40 ± 369,77
180	9568,30 ± 745,22	8147,82 ± 368,40	9988,51 ± 403,85
195	10115,22 ± 610,20	8235,21 ± 258,90	10412,85 ± 315,69
210	9875,00 ± 579,45	8580,00 ± 496,45	10180,32 ± 210,37
% agreg	5,45	12,69	2,56

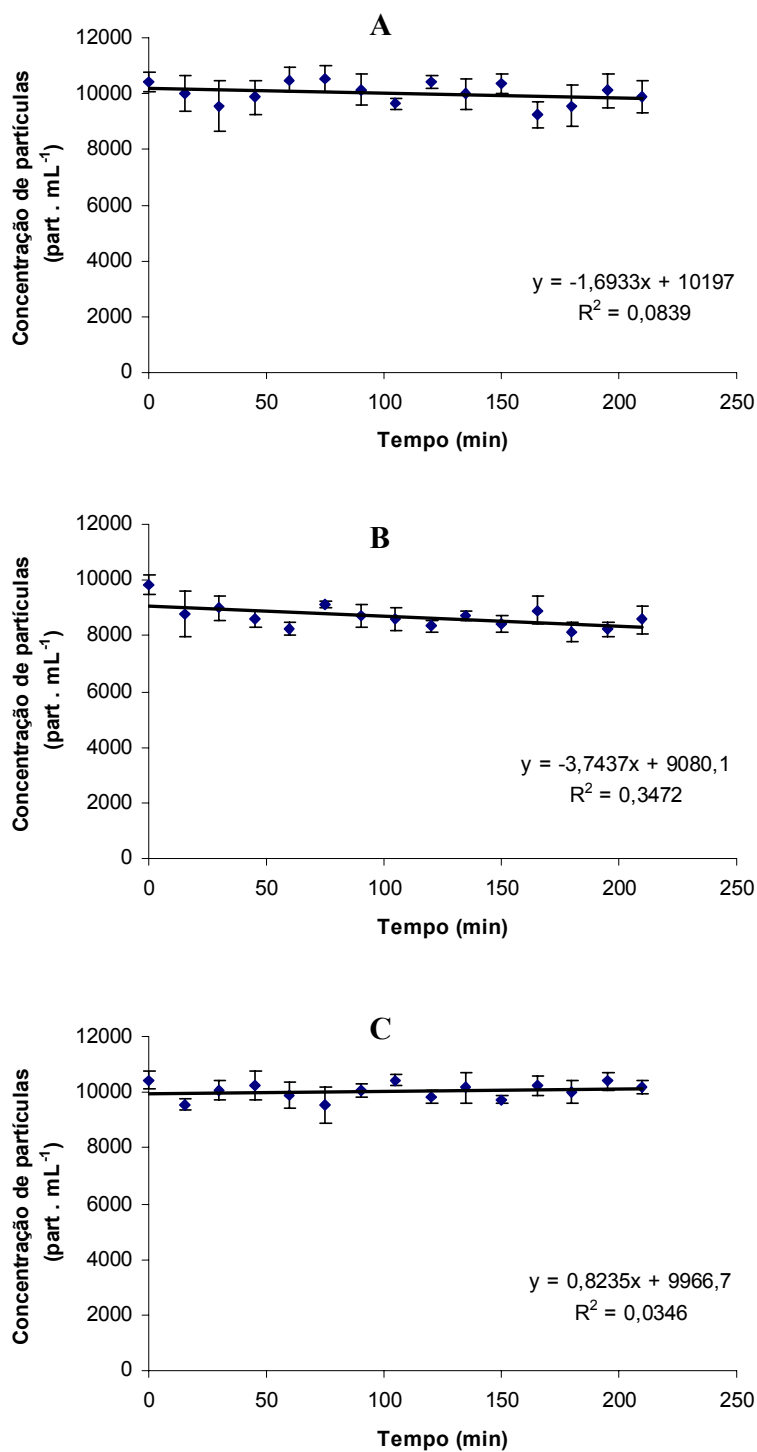


Figura 11: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹), na ausência de EPS, em função do tempo de floculação. (A) fase 8 dias; (B) fase 27 dias; (C) fase 34 dias ($G = 10 \text{ s}^{-1}$, $t = 210 \text{ min}$). As barras de erro correspondem ao erro médio ($n = 3$).

Aulacoseira granulata

A figura 12 e tabelas 7, 8 e 9 mostram que não houve agregação significativa das células na fase 8 dias na ausência de EPS. Em contraste, houve formação de agregados nas fases 18 dias, 28 dias e 34 dias, mostrando que nessas idades os filamentos de *A. granulata* aderem-se uns aos outros (adesão filamento-filamento).

De acordo com o modelo bifásico, a formação de agregados apenas foi contínua até o final do experimento na floculação das células da fase 18 dias. O coeficiente de decaimento da concentração de partículas em suspensão da primeira etapa do processo de agregação ($k = 0,057 \pm 0,009$), foi cerca de uma ordem de magnitude maior que o coeficiente da segunda etapa. O processo de agregação das células da fase 28 dias (tabela 9) apresentou coeficiente de decaimento $k = 0,043 \pm 0,015$, não diferindo significativamente do coeficiente descrito na primeira etapa da idade anterior (teste “t” de Student, $p = 0,3754$). Mas, após 2,5 horas de experimento, o número total de partículas envolvidas na agregação da fase 28 dias foi $4534,33 \pm 45,5 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$, significativamente maior que $3373,33 \pm 310 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ agregadas na fase 18 dias (teste “t” de student, $p = 0,0329$). Na fase 8 dias não houve agregação ao final do experimento (teste “t” de Student, $p > 0,1$). Embora a agregação na fase 34 dias tenha apresentado coeficiente k cerca de uma ordem de grandeza menor que o coeficiente obtido na fase 18 dias, o número de partículas envolvidas na agregação ao final do experimento (tabela 9) foi o mesmo em ambas idades (teste “t” de Student $p = 0,1026$), mostrando que a agregação foi mais efetiva na fase 34 dias (tabela 9).

Segundo o modelo exponencial (figura 13), na fase 8 dias não ocorre agregação. Nos experimentos realizados na fase 18 dias, o valor de k foi $0,036 \pm 0,011$, considerado igual ao apresentado na fase 28 dias, $k = 0,037 \pm 0,0077$ (teste “t” de Student, $p = 0,8914$). Na fase 34 dias, o coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão foi $k = 0,0080 \pm 0,0002$, significativamente menor que os obtidos na fase 18 dias (teste “t” de Student, $p = 0,0363$) e na fase 28 dias (teste “t” de Student, $p = 0,0330$).

Como os coeficientes de decaimento obtidos nas fases 18 dias e 28 dias foram iguais e o número de partículas envolvidas na agregação após 150 minutos de experimento foi maior na fase 28 dias, a formação de agregados ocorreu mais rapidamente nessa idade.

A comparação entre os modelos bifásico e exponencial (tabela 9) mostra que os coeficientes não foram significativamente diferentes nas fases 18 dias (teste “t” de Student,

$p=0,2233$) e 28 dias (teste “t” de Student, $p=0,7065$). Na fase 34 dias, o valor dos coeficientes foi idêntico.

Tabela 7: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=150 \text{ min}$), na ausência de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio ($n=3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	Fase 8 dias	Fase 18 dias	Fase 28 dias	Fase 34 dias
0	10246,66 ± 157,77	10440 ± 133,33	10326,66 ± 197,77	9876,66 ± 271,11
15	9330 ± 206,66,00	8686,66 ± 208	7733,33 ± 208,88	8946,66 ± 162,22
30	9206,66 ± 137,77	8276,66 ± 215,55	6700,00 ± 166,00	8750,00 ± 175,55
45	8810,00 ± 180,00	8183,33 ± 215,55	6140,00 ± 133,00	7910,00 ± 233,33
60	8653,33 ± 111,11	7920,00 ± 380,00	5650,00 ± 193,33	8350,00 ± 137,77
75	9500,00 ± 306,66	6956,66 ± 184,44	5945,33 ± 264,44	7010,00 ± 180,00
90	9656,66 ± 224,44	7316,66 ± 88,88	5716,66 ± 314,44	7390,00 ± 211,11
105	9790,00 ± 166,66	6820,00 ± 140,00	5376,00 ± 224,00	6153,33 ± 171,11
120	9780,00 ± 397,77	7053,33 ± 155,55	4839,33 ± 171,11	6223,33 ± 217,77
135	9613,33 ± 195,55	7263,33 ± 248,00	4876,66 ± 183,55	6093,33 ± 164,44
150	9520,00 ± 286,66	6756,66 ± 157,77	5838,00 ± 308,88	6226,66 ± 308,88
% agreg	-	35,28	43,46	36,95

Tabela 8: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 150 \text{ min}$), na ausência de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio ($n= 3$).

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	Fase 8 dias	Fase 18 dias	Fase 28 dias	Fase 34 dias
0	9823,33 ± 131,00	10103,33 ± 231,00	10026,66 ± 162,22	10326,66 ± 131,11
15	9583,33 ± 122,22	8363,33 ± 268,88	7880,00 ± 293,00	9466,66 ± 171,11
30	9446,66 ± 291,11	8116,66 ± 191,11	6896,66 ± 137,77	9320,00 ± 200,00
45	9396,66 ± 237,77	7586,66 ± 242,22	7486,66 ± 115,55	8490,00 ± 233,33
60	8583,33 ± 115,55	7130,00 ± 146,60	5786,66 ± 197,77	9000,00 ± 166,66
75	9523,33 ± 215,00	7223,33 ± 224,44	5492,66 ± 161,77	6800,00 ± 306,66
90	9066,66 ± 477,77	7003,33 ± 211,00	5828,66 ± 211,55	7206,66 ± 331,00
105	9546,66 ± 235,55	7286,66 ± 237,78	5376,00 ± 224,00	6093,33 ± 211,11
120	9486,66 ± 102,22	7256,66 ± 91,11	5441,33 ± 199,11	6266,66 ± 191,11
135	9443,33 ± 268,88	6920,00 ± 133,33	5791,33 ± 351,55	6466,66 ± 182,00
150	9493,33 ± 188,88	7040,00 ± 186,66	5446,00 ± 196,00	6266,66 ± 315,55
% agreg	-	30,32	45,68	39,31

Tabela 9: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento (k) e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$) de floculação na ausência de EPS em diferentes fases de crescimento.

Idade	Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Coeficiente de decaimento (k)	
		Bifásico	Exponencial
Fase 8 dias	-	-	-
Fase 18 dias	3373,33 ± 310	0,057 ± 0,009	0,036 ± 0,011
Fase 28 dias	4534,33 ± 45,66	0,043 ± 0,015	0,037 ± 0,0077
Fase 34 dias	3875,33 ± 224,66	0,0080 ± 0,0002	0,0080 ± 0,0002

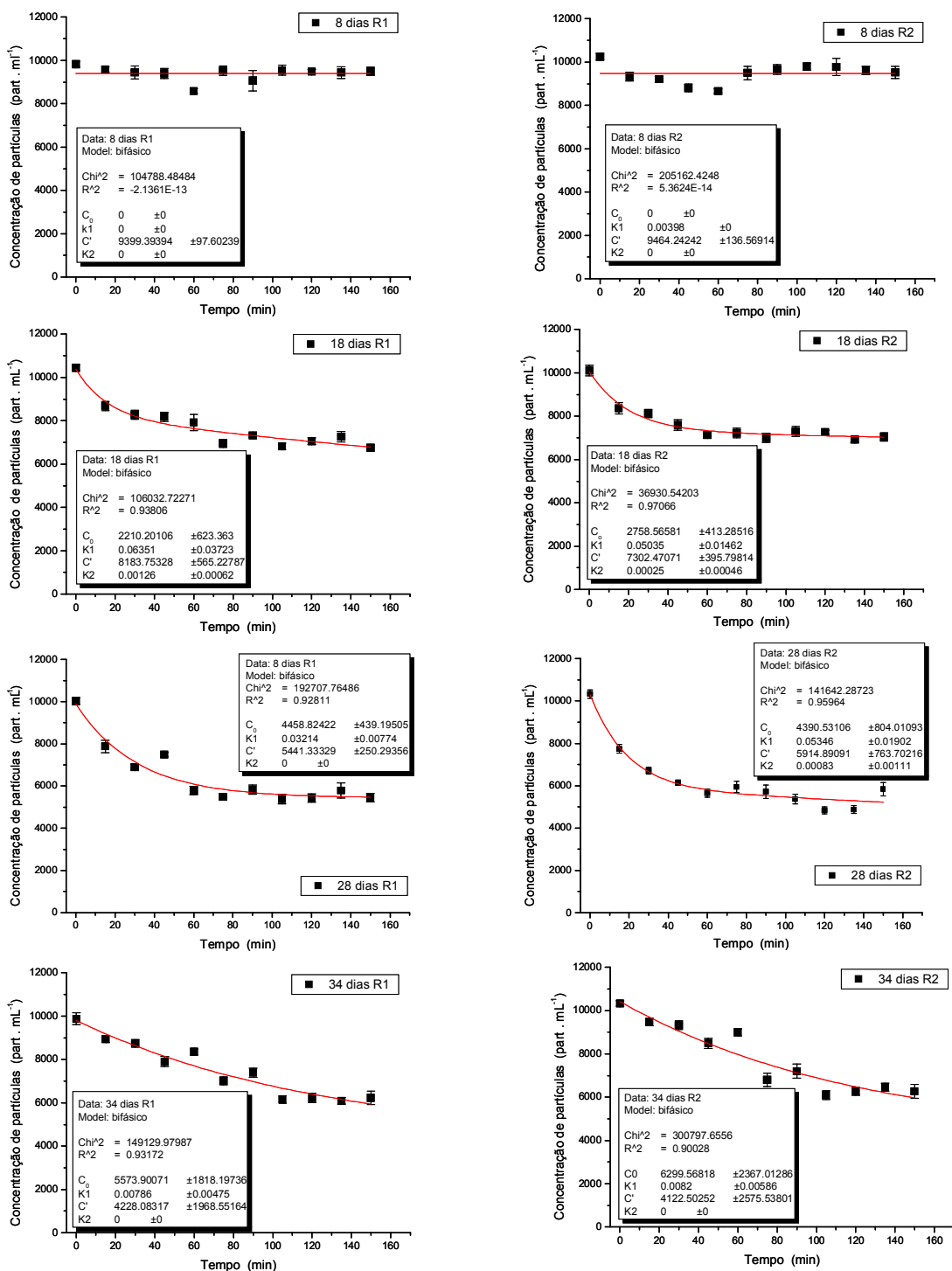


Figura 12: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹), em função do tempo ($G = 3 \text{ s}^{-1}$ e $t = 150 \text{ min}$), na ausência de EPS. R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n = 3$).

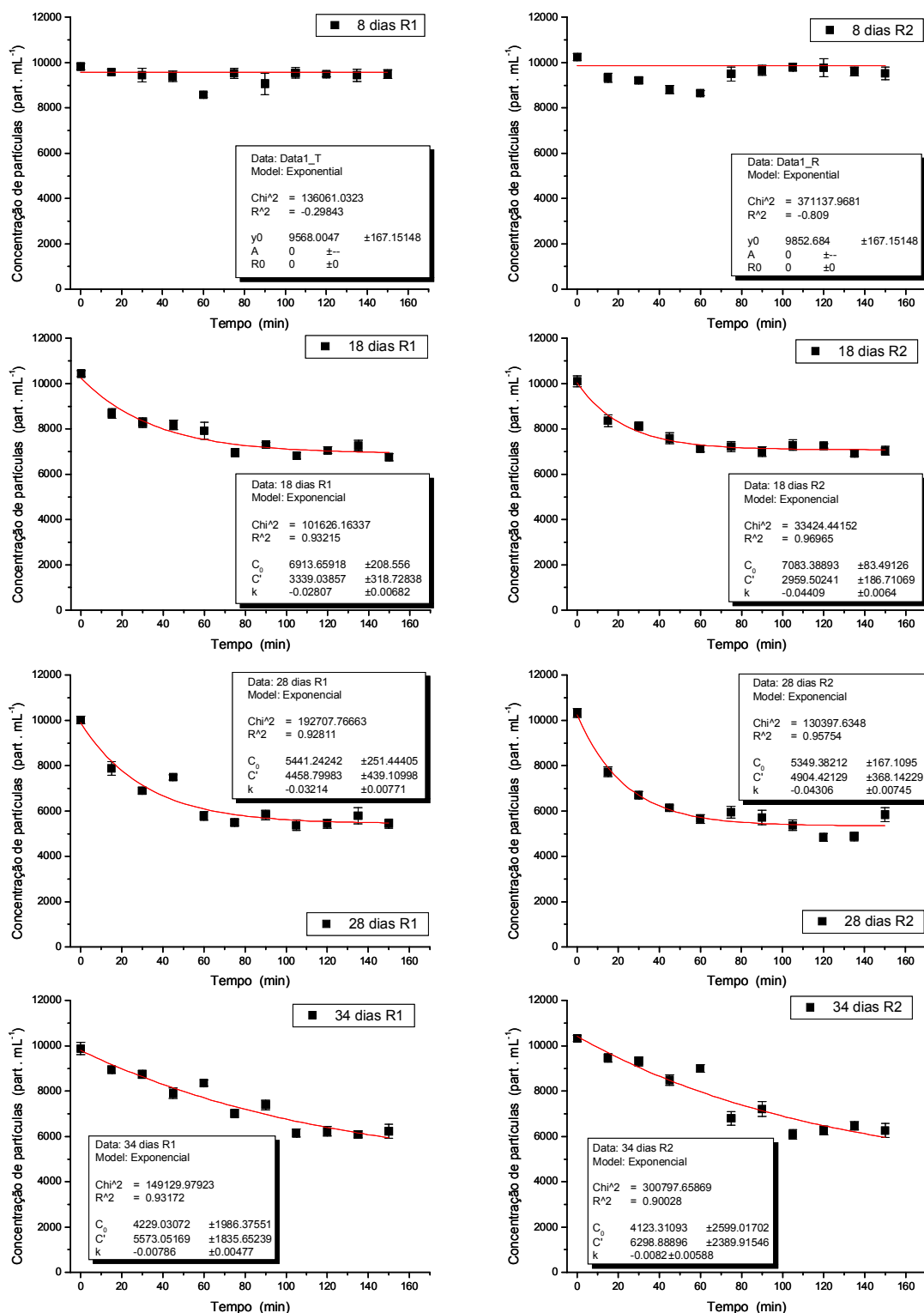


Figura 13: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), em função do tempo ($G=3 \text{ s}^{-1}$ e $t=150 \text{ min}$), na ausência de EPS. R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

3.3.2. Formação de agregados na presença de EPS

Thalassiosira cf. duostra

A figura 14 e a tabela 10 mostram os resultados da formação de agregados nas fases 8 dias, 27 dias e 34 dias de *T. cf. duostra*. Pôde-se observar que o maior coeficiente de declínio da concentração de partículas ocorreu na fase 27 dias ($k= 10,449$), quase 3 vezes maior do que na fase 8 dias ($k= 3,89$) e cerca de 37 vezes maior que o coeficiente na fase 34 dias ($k= 0,279$).

Ao término dos 210 minutos de experimento, a concentração de partículas envolvidas na agregação na fase 27 dias foi $2835 \pm 237,34 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ (27,22 % das partículas em suspensão) (teste “t” de Student, $p < 0.0001$). Na fase 8 dias, o número de partículas em suspensão envolvidas na agregação foi de $1073,75 \pm 206,18 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que significou declínio de 9,9 % das partículas (teste “t” de Student, $p= 0,008$). Já na fase 34 dias, o número de partículas agregadas foi de $670 \pm 128,41 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que mostra uma agregação significativa de 6,8% das partículas em suspensão (teste “t” de Student, $p= 0,0024$).

Tabela 10: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 10 \text{ s}^{-1}$ e $t= 210 \text{ min}$), na presença de EPS, em três idades (fases 8 dias, 27 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
	Fase 8 dias	Fase 27 dias	Fase 34 dias
0	10841,25 ± 272,45	10412,5 ± 311,91	9850,0 ± 137,35
15	10582,50 ± 415,72	8437,50 ± 295,78	9010,00 ± 258,58
30	10472,50 ± 369,71	9567,50 ± 535,62	9360,00 ± 244,67
45	9977,50 ± 325,51	8577,50 ± 350,46	9075,00 ± 473,46
60	10132,50 ± 253,29	9262,50 ± 344,51	9300,00 ± 414,97
75	10605,00 ± 384,05	8432,50 ± 321,18	9332,50 ± 358,46
90	10282,5 ± 683,24	7707,50 ± 460,96	9143,33 ± 92,91
105	10465,00 ± 729,40	7455,00 ± 381,61	9190,75 ± 350,64
120	9352,50 ± 525,69	8112,50 ± 766,61	9450,00 ± 261,40
135	10120,00 ± 467,83	8057,50 ± 548,11	9465,00 ± 179,35
150	9887,50 ± 617,27	7807,50 ± 422,64	9435,00 ± 294,90
165	10167,50 ± 405,57	7682,50 ± 342,38	9352,50 ± 339,84
180	9587,50 ± 211,71	7605,00 ± 687,43	9292,50 ± 189,27
195	10157,50 ± 429,13	7447,50 ± 274,30	9430,00 ± 213,38
210	9767,50 ± 478,63	7577,50 ± 479,74	9180,00 ± 227,59
% agreg	9,90	27,22	6,80

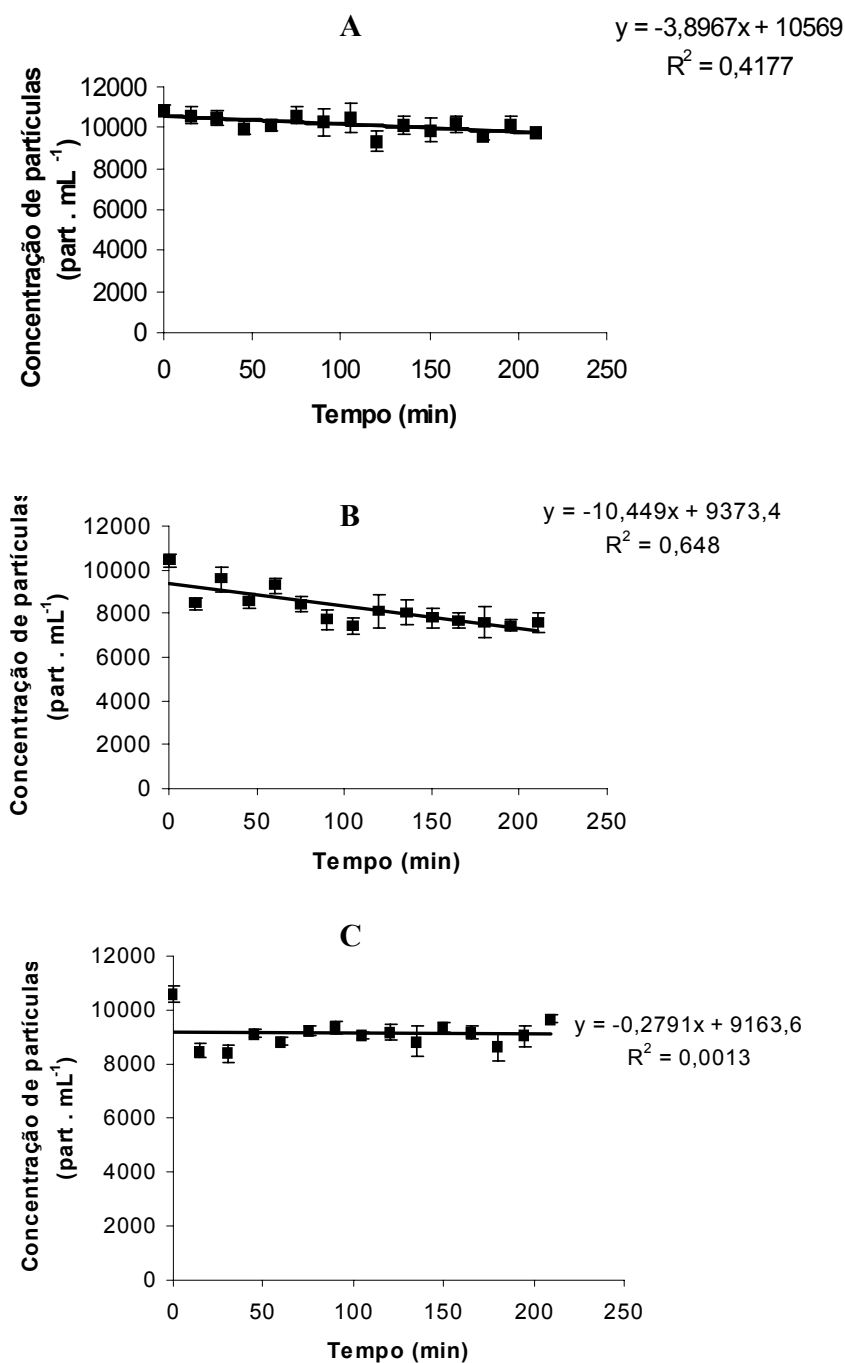


Figura 14: *Thalassiosira cf. duostra*. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹), em função do tempo de floculação (min), na presença de EPS ($G = 10 \text{ s}^{-1}$ e $t = 210 \text{ min}$). (A) fase 8 dias; (B) fase 27 dias; (C) fase 34 dias. As barras de erro correspondem ao erro médio.

Aulacoseira granulata

A figura 15 e a tabelas 11, 12 e 13 mostram os resultados obtidos na floculação de *A. granulata* em presença do EPS. Pode-se observar que na fase 8 dias houve princípio de agregação no início do experimento. Após esse processo inicial, entretanto, o número de partículas em suspensão aumentou gradativamente, indicando que os agregados inicialmente formados se romperam e o teste “t” de Student confirmou que ao final de 2,5 horas de experimento não houve agregação significativa de células ($p > 0,1$).

A floculação de células na fase 18 dias apresentou padrões distintos de agregação de células em cada réplica. A figura 15 mostra que a réplica 1 (R1) apresentou coeficiente $k = 0,058 \pm 0,034$. A réplica 2 (R2) apresentou coeficiente $k = 0,017 \pm 0,0032$. Apesar desse comportamento diferenciado, ambas réplicas envolveram o mesmo número de partículas ao final de 2,5 horas de experimento ($4495,16 \pm 328,16 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$; teste “t” de Student, $p > 0,05$). Devido a esse fato, apenas o número total de partículas agregadas foi considerado em nossas análises.

Após 150 minutos de experimento, o processo de agregação na fase 28 dias envolveu número significativamente maior de partículas se comparado às demais idades (ANOVA $p = 0,010$ e teste Tukey: 8 dias \lll 18 dias = 34 dias $<$ 28 dias).

De acordo com o modelo exponencial (figura 16), o coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão na fase 18 dias ($k = 0,017 \pm 6,4 \text{ E-}05$) foi significativamente menor (teste “t” de Student, $p = 0,0287$) que o coeficiente obtido na fase 28 dias ($k = 0,025 \pm 0,002$). Este, por sua vez, foi significativamente maior que o coeficiente descrito na fase 34 dias, $k = 0,0154 \pm 0,0039$ (teste “t” de Student, $p = 0,0178$).

A fase 28 dias, portanto, apresentou um coeficiente de decaimento do número de partículas em suspensão superior ao obtido nas demais idades, assim como o foi maior o número de partículas envolvidas no processo de agregação ainda em relação às outras idades.

Tabela 11: *Aulacoseira granulata* réplica 1 (R1). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G= 3 \text{ s}^{-1}$ e $t= 150 \text{ min}$), na presença de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	Fase 8 dias	Fase 18 dias	Fase 28 dias	Fase 34 dias
0	10110 ± 93,33	10230 ± 66,66	10420 ± 106,67	10036,67 ± 144,44
15	9046,66 ± 264,44	8693,33 ± 204,44	7520 ± 60	8496,67 ± 117,77
30	9490 ± 353,33	8300 ± 260	6443,33 ± 155,56	7513,33 ± 175,55
45	8816,66 ± 131,10	7530 ± 80	5253,33 ± 108,89	7256,66 ± 122,22
60	8666,66 ± 164,40	7100 ± 126,66	4450 ± 220	6476,66 ± 137,77
75	8553,33 ± 137,77	7373,33 ± 264,40	3613,33 ± 137,78	5756,66 ± 157,77
90	8493,33 ± 262,22	6733,33 ± 177,77	3363,33 ± 168,88	5420 ± 180
105	8906,66 ± 331,11	6346,66 ± 151,11	3083 ± 306,66	4830 ± 133,33
120	8680 ± 220	5903,33 ± 108,89	3326,66 ± 137,77	5333,33 ± 202,22
135	9303,33 ± 202,22	6053,33 ± 355,55	2996,66 ± 71,11	5193,33 ± 122,22
150	9723,33 ± 115,55	6063,33 ± 164,44	3100 ± 146,66	4753,33 ± 244,44
% agreg	-	40,72	70,25	52,64

Tabela 12: *Aulacoseira granulata* réplica 2 (R2). Variação da concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) ao longo do tempo de floculação (min.) e porcentagem de agregação (% agreg) no final do experimento ($G=3 \text{ s}^{-1}$ e $t=150 \text{ min}$), na presença de EPS, em diferentes idades (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). O erro corresponde ao erro médio.

Tempo de Floculação (min.)	Concentração de Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)			
	Fase 8 dias	Fase 18 dias	Fase 28 dias	Fase 34 dias
0	10086,67 ± 164,44	10510 ± 186,66	10153,33 ± 175,55	10510 ± 113,33
15	9006,66 ± 257,77	9313,33 ± 368,88	7293,33 ± 124,44	9546,66 ± 77,77
30	8670 ± 433,33	8436,66 ± 124,44	6266,66 ± 75,55	8350 ± 233,33
45	8460 ± 226,66	7720 ± 106,66	5490 ± 180	7606,66 ± 144,44
60	8286,66 ± 391,11	7106,66 ± 262,22	4190 ± 133,33	7806,66 ± 251,11
75	8450 ± 260	6306,66 ± 182,22	4326,66 ± 91,11	6506,66 ± 257,77
90	8386,66 ± 191,11	5493,33 ± 204,44	3010 ± 193,33	5673,33 ± 175,55
105	8106,66 ± 148,88	5473,33 ± 248,88	3030 ± 140	5380 ± 140
120	8750 ± 233,33	5440 ± 133,33	2526,66 ± 111,11	5216,66 ± 104,44
135	8883,33 ± 248,88	5580 ± 80	2763,33 ± 188,88	5346,66 ± 137,77
150	9130 ± 340	5686,66 ± 202,22	3330 ± 80	5210 ± 220
% agreg	-	45,90	67,20	50,42

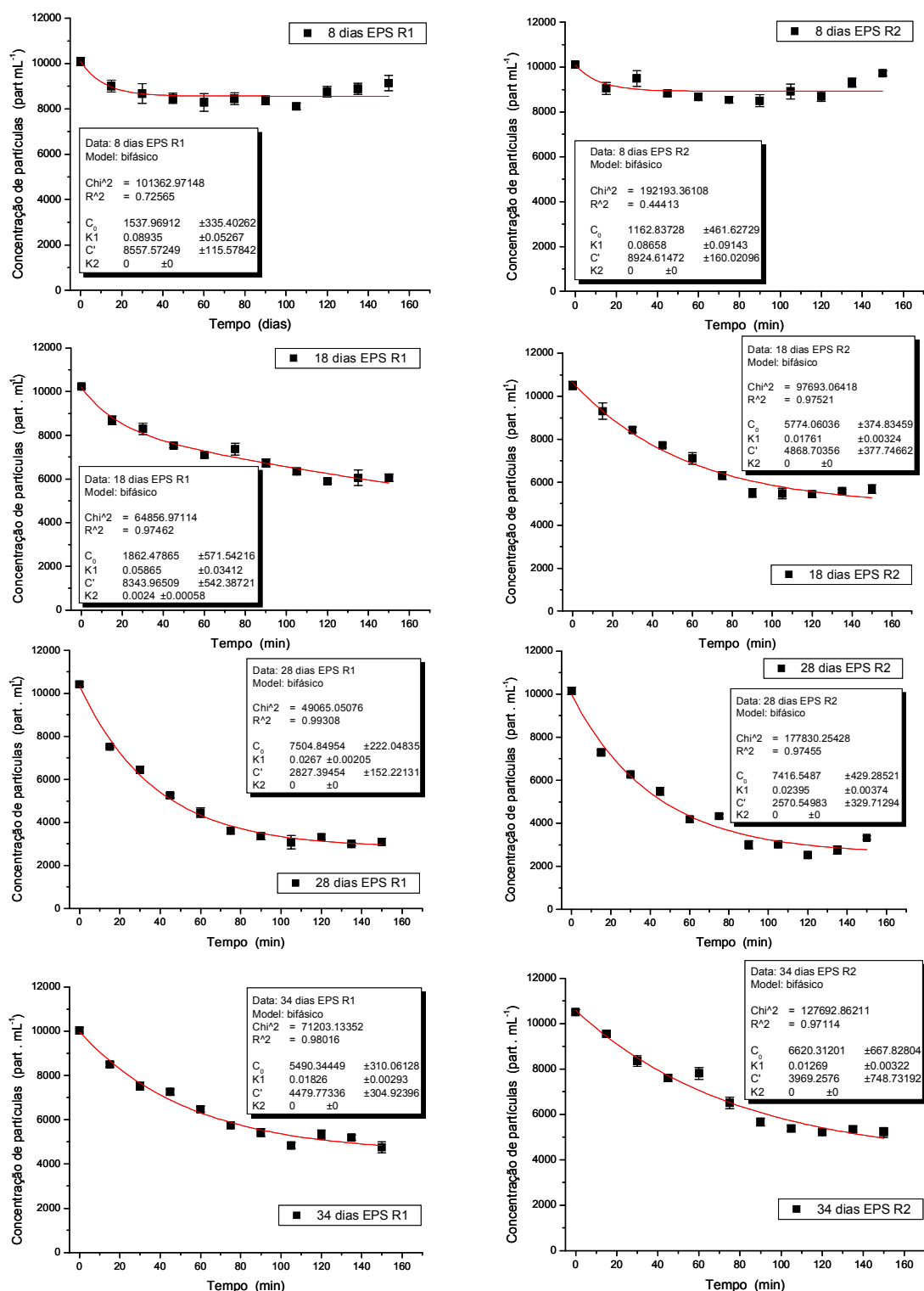


Figura 15: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Concentração de partículas em suspensão (part · mL⁻¹) em função do tempo ($G=3\text{ s}^{-1}$ e $t=150\text{ min}$), na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

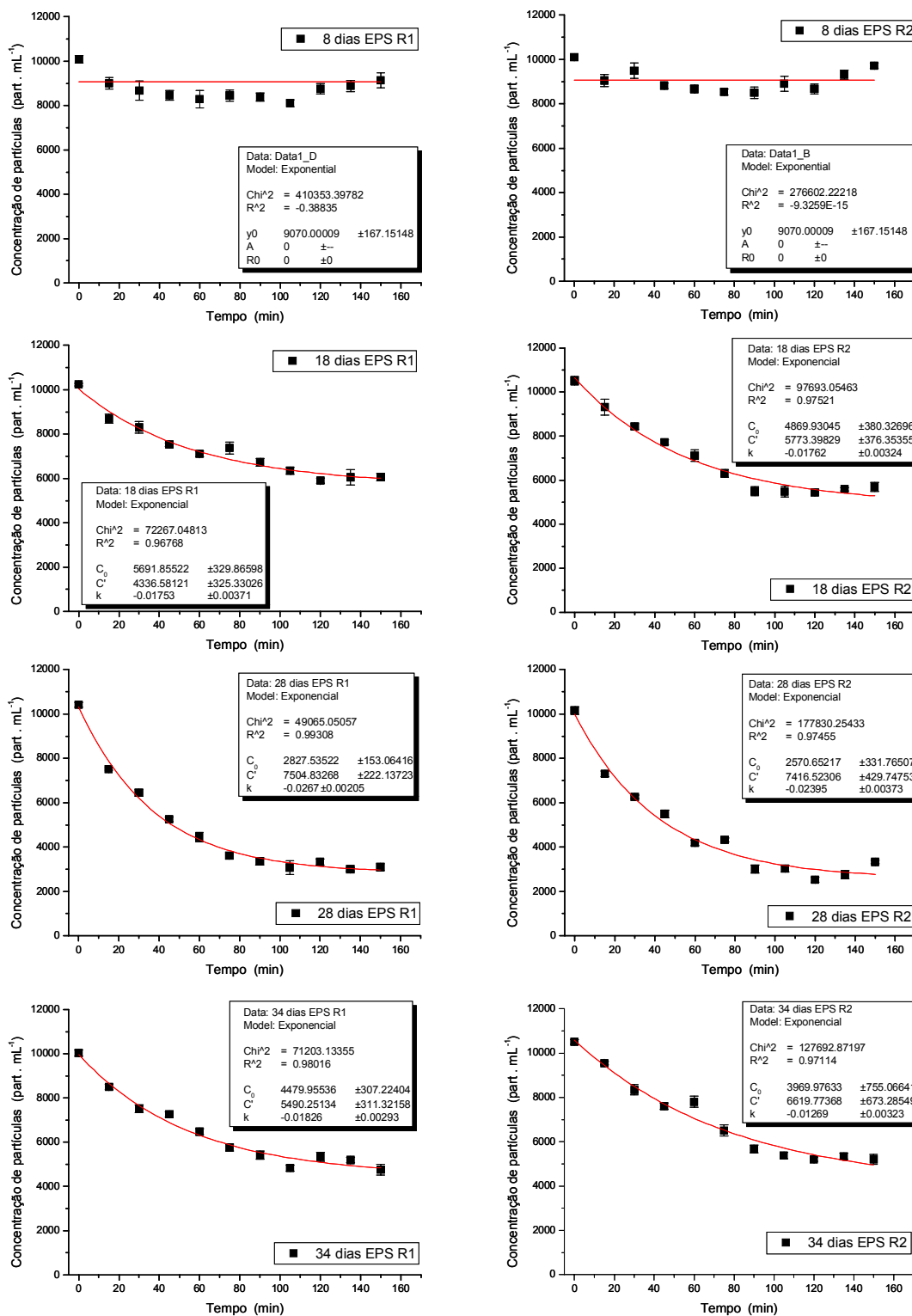


Figura 16: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Concentração de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) em função do tempo ($G=3 \text{ s}^{-1}$ e $t=150 \text{ min}$), na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias). R1 e R2 são réplicas. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Tabela 13: *Aulacoseira granulata*, modelos bifásico e exponencial. Coeficientes de decaimento (k) e número de partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$) envolvidas na agregação (3 s^{-1} , $t= 150$ min) na presença de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Idade	Partículas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Coeficiente de decaimento (k)	
		Bifásico	Exponencial
Fase 8 dias	-	-	-
Fase 18 dias	$4495,16 \pm 328,16$	†	$0,017 \pm 6,4 \text{ E-}05$
Fase 28 dias	$7071,66 \pm 248,33$	$0,038 \pm 0,002$	$0,025 \pm 0,002$
Fase 34 dias	$5291,66 \pm 8,33$	$0,015 \pm 0,003$	$0,0154 \pm 0,0039$

† Replicas apresentaram k extremamente diferentes (R1 $k= 0,058$; R2 $k= 0,017$)

3.3.3. Influência do EPS na formação de agregados

Thalassiosira cf. duostra

A tabela 14 mostra que a agregação nos experimentos realizados com EPS produzido por *T. cf. duostra* apresentou maiores coeficientes de decaimento do número de partículas em relação às flocculações na ausência desses compostos. Na fase 8 dias, na presença de EPS, o coeficiente de decaimento ($k= 3,89$) foi cerca de 2,3 vezes maior que o coeficiente descrito nos experimentos sem EPS ($k= 1,69$). Na fase 27 dias, na presença de EPS, o coeficiente de decaimento ($k= 10,449$) foi quase três vezes maior que o coeficiente obtido no experimento sem EPS ($k= 3,74$). Na fase 34 dias, o coeficiente de decaimento na presença de EPS foi $k= 0,2791$ e, no entanto, sem EPS foi zero.

Na fase 27 dias, na presença de EPS, a agregação após 210 minutos de experimento (27,22%) foi mais de duas vezes maior que na ausência de EPS (12,69%). Na fase 8 dias e na fase 34 dias, a agregação foi significativa ao final do experimento apenas na presença de EPS.

A análise qualitativa dos agregados corados com Alcian Blue mostrou maior participação de polissacarídeos ácidos nas partículas formadas na fase 27 dias (figura 17).

Tabela 14: *Thalassiosira cf. duostra*. Coeficientes de decaimento (k) das floculações (10 s^{-1} , $t = 210\text{ min}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 27 dias e 34 dias).

Idade	Coeficiente de decaimento (K)		Taxa de agregação (%)	
	Com EPS	Sem EPS	com EPS	sem EPS
Fase 8 dias	3,8967	1,6933 [‡]	9,9	-
Fase 27 dias	10,449	3,7437	27,22	12,69
Fase 34 dias	0,2791	-	6,8	-

[‡] concentração média final de partículas em suspensão não significativamente menor que a inicial (teste “t” de student).

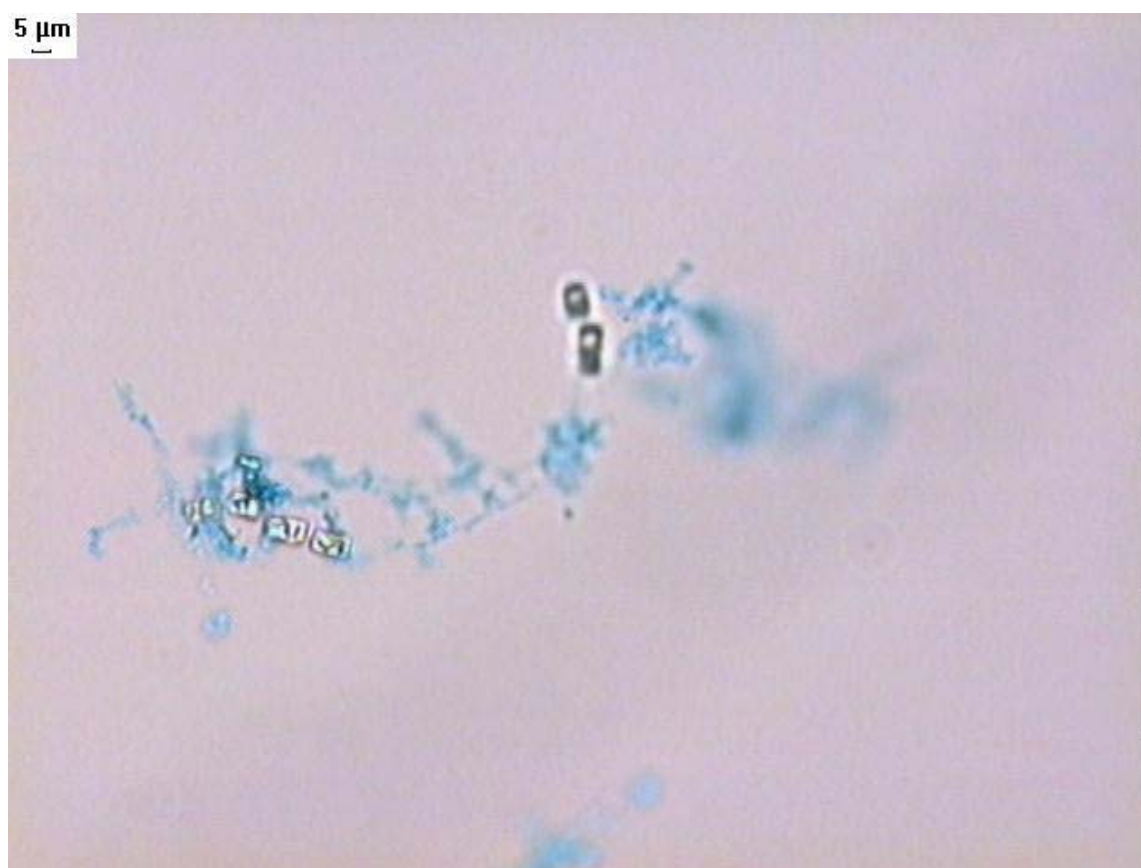


Figura 17: Agregado de *Thalassiosira cf. duostra* na fase 27 dias formado na presença de EPS, corado com Alcian Blue 0,06%.

Aulacoseira granulata

A presença de EPS não afetou a agregação de células na fase 8 dias. Na fase 34 dias, segundo o modelo bifásico, o coeficiente de decaimento da concentração de partículas foi 1,93 vez maior na presença do EPS (teste “t” de Student, $p=0,0467$) quando comparada à floculação na ausência desses compostos (tabela 15). O coeficiente de decaimento obtido na ausência de EPS na fase 28 dias é cerca de 5,3 vezes maior que o coeficiente apresentado na fase 34 dias. Quando os experimentos foram realizados na presença de EPS, entretanto, a diferença entre os coeficientes obtidos em cada fase do crescimento diminuiu, sendo k na fase 28 dias cerca de 2,5 vezes maior que o mesmo coeficiente descrito na fase 34 dias.

Após 150 minutos de experimento, o número de partículas envolvidas na agregação na presença de EPS foi significativamente maior que na sua ausência apenas nas duas idades mais avançadas. Na fase 28 dias, na presença de EPS, a agregação envolveu $7071,66 \pm 248,33 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ contra $4534,33 \pm 45,66 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ na ausência desses compostos (teste “t” de Student, $p=0,0098$). Na fase 34 dias, a formação de agregados envolveu $5291,66 \pm 8,33 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ na presença de EPS, enquanto em sua ausência esse número foi de $3875,33 \pm 224,66 \text{ part} \cdot \text{mL}^{-1}$ (teste “t” de Student, $p=0,0243$).

De acordo com o modelo exponencial (tabela 16), os coeficientes de decaimento do número de partículas em suspensão foram significativamente maiores na presença de EPS do que na ausência desses compostos nos experimentos realizados na fase 18 dias (teste “t” de Student, $p=0,0263$) na fase 28 dias (teste “t” de Student, $p=0,0329$) e na fase 34 dias (teste “t” de Student, $p=0,0401$).

O coeficiente k obtido na ausência de EPS na fase 28 dias é cerca de 4,6 vezes maior que o coeficiente apresentado na fase 34 dias. Na presença de EPS, entretanto, esse coeficiente é apenas cerca de 1,6 vez maior.

As figuras 18 e 19 mostram, respectivamente agregados formados por células de *A. granulata* na fase 28 dias na ausência de EPS e na presença de EPS, evidenciando a participação desses compostos na composição dos agregados.

Tabela 15: *Aulacoseira granulata*, modelo bifásico. Coeficientes de decaimento (k) das floculações ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 150 \text{ min}$) e número de partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Idade	Partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		Coeficientes de decaimento (K)	
	Com EPS	Sem EPS	Com EPS	Sem EPS
Fase 8 dias	-	-	-	-
Fase 18 dias	4495,16 ± 328,16	3373,33 ± 310,0	†	0,057 ± 0,009
Fase 28 dias	7071,66 ± 248,33	4534,33 ± 45,66	0,038 ± 0,002	0,043 ± 0,015
Fase 34 dias	5291,66 ± 8,3300	3875,33 ± 224,66	0,015 ± 0,003	0,0080 ± 0,0002

† As réplicas apresentaram coeficientes distintos e por isso não puderam ser comparadas.

Tabela 16: *Aulacoseira granulata*, modelo exponencial. Coeficientes de decaimento (k) das floculações ($G= 3 \text{ s}^{-1}$, $t= 150 \text{ min}$) e número de partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$), na presença e na ausência de EPS (fases 8 dias, 18 dias, 28 dias e 34 dias).

Idade	Partículas agregadas ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$)		Coeficientes de decaimento (K)	
	Com EPS	Sem EPS	Com EPS	Sem EPS
Fase 8 dias	-	-	-	-
Fase 18 dias	4495,16 ± 328,16	3373,33 ± 310,0	0,017 ± 6,4 E-05	0,036 ± 0,011
Fase 28 dias	7071,66 ± 248,33	4534,33 ± 45,66	0,025 ± 0,002	0,037 ± 0,0077
Fase 34 dias	5291,66 ± 8,3300	3875,33 ± 224,66	0,0154 ± 0,0039	0,0080 ± 0,0002

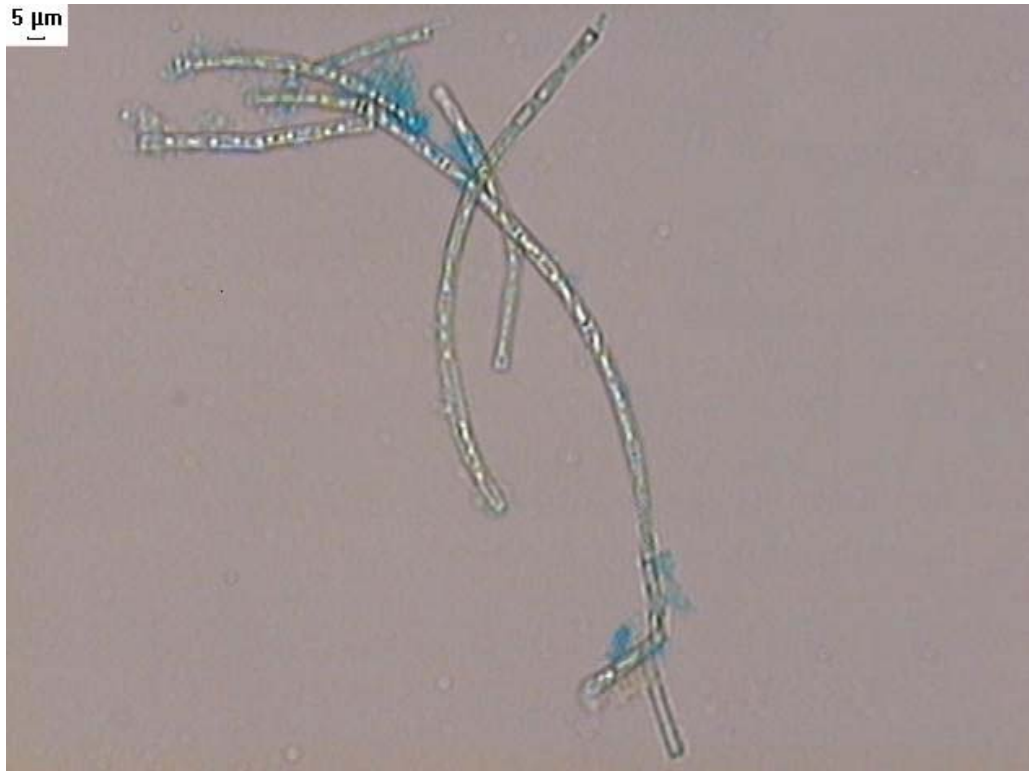


Figura 18: Agregado de *Aulacoseira granulata* na fase 28 dias formado na ausência de EPS, corado com Alcian Blue 0,06%

A



B

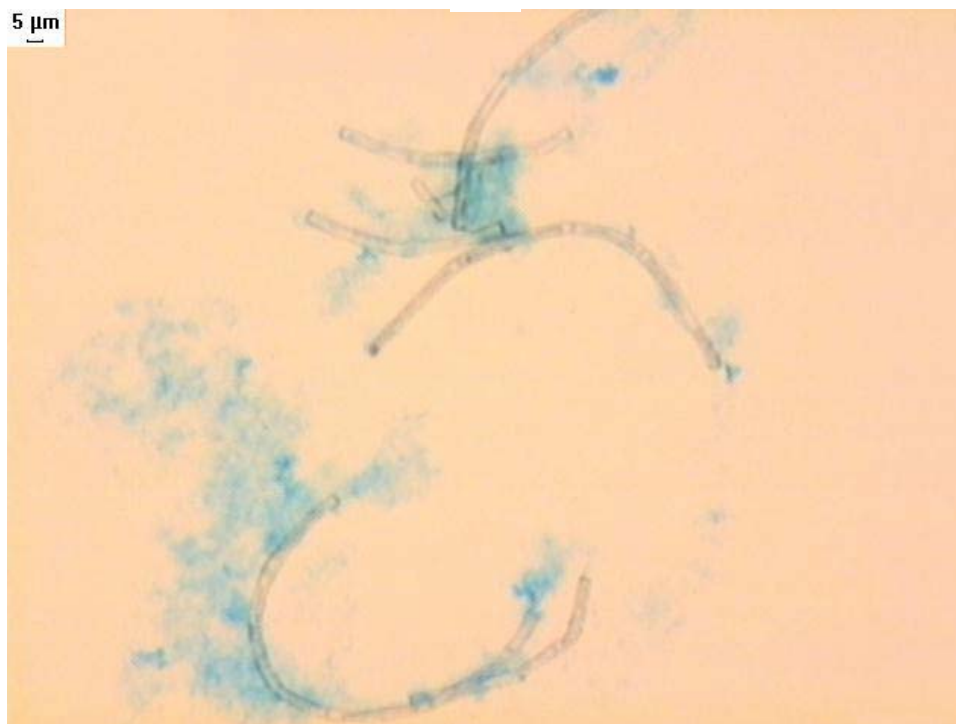


Figura 19: Agregados de *Aulacoseira granulata* (A) na fase 28 dias e (B) na fase 34 dias formados na presença de EPS, corados com Alcian Blue 0,06%. Os polissacarídeos ácidos aparecem corados em azul.

4. Papel de *Aulacoseira granulata* na formação de agregados na água de Barra Bonita

4.1. Efeito do EPS de *A. granulata* na agregação

A concentração de polissacarídeos (>10 kda e $< 0,65$ μm) medida na água integral de Barra Bonita na data da coleta realizada para execução dos experimentos com EPS de *A. granulata* foi $2,335 \pm 0,063$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O EPS da diatomácea foi adicionado à água da represa, após a retirada dos polissacarídeos nela presentes originalmente. A concentração final de EPS na nova suspensão (aqui chamada de água de Barra Bonita com adição de EPS) foi $2,162 \pm 0,18$ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, igual à concentração medida na água da represa (teste “t” de Student, $p= 0,3304$).

A tabela 17 mostra que na floculação da água integral do Reservatório de Barra Bonita a concentração de células da população natural de *A. granulata* em suspensão antes do início da floculação era de $388,65 \pm 64,68$ $\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após 3 horas de experimento, com a formação de agregados, essa concentração foi reduzida significativamente (teste “t” de Student, $p < 0,0001$) a $212,50 \pm 62,50$ $\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que significa que 45,34 % das células dessa diatomácea foram envolvidas na agregação.

Quando o EPS de *A. granulata* foi adicionado à água do Reservatório, cerca de 66% das células dessa diatomácea foram envolvidas na formação de agregados (tabela 17), o que significa uma redução de $277,08 \pm 18,88$ $\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ (teste “t” de Student, $p < 0,0001$).

A partir dos resultados apresentados na tabela 17, temos que a agregação de células de *A. granulata* foi mais de 1,5 vez maior na presença de EPS dessa diatomácea do que na água da represa integral (teste “t” de Student, $p= 0,0089$).

A figura 20 mostra o teor de carbono celular em diferentes concentrações de células de uma cultura de *A. granulata* ($\text{Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$). Considerando que na represa de Barra Bonita essa espécie está presente em diferentes idades celulares, as análises de teor celular de carbono foram realizadas em diferentes idades de cultivo (início, metade e final da fase exponencial e fase estacionária de crescimento) e integradas na figura 20, após análise de variância (descrita em Material e métodos). Assim pôde-se calcular, a partir de uma relação direta célula- carbono ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), o conteúdo de carbono de *A. granulata* seqüestrado pela formação de agregados na represa (tabela 17).

A formação de agregados pela floculação da água integral da represa de Barra Bonita, envolveu $176,25 \pm 3,07 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que corresponderia à captura de $0,0123 \pm 0,001 \text{ mg de carbono} \cdot \text{L}^{-1}$ na forma de células de *A. granulata*.

Nos experimentos com adição de EPS, foram agregadas $277,08 \pm 18,88 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, o que corresponderia a $0,0194 \pm 0,002 \text{ mg de carbono} \cdot \text{L}^{-1}$. Esse teor de carbono foi cerca de 1,5 vez maior que o envolvido na formação de agregados na água integral de Barra Bonita.

A tabela 18 e a figura 21 apresentam as diferenças nas distribuições (%) por classes de tamanho (área, μm^2) e na densidade ($\text{agr} \cdot \text{L}^{-1}$) dos agregados formados nos experimentos de agregação na água integral de Barra Bonita, água de Barra Bonita com adição de EPS e água integral com adição de células de *A. granulata*.

É interessante notar que nos experimentos com adição de EPS houve formação de menor densidade de agregados por litro ($\text{aggr} \cdot \text{L}^{-1}$), quando comparada à densidade de agregados formados na água integral de Barra Bonita (teste “t” de Student, $p=0,0307$), entretanto, as partículas formadas são maiores.

Na floculação da água integral de Barra Bonita 84,41% dos agregados formados apresentaram áreas menores que $10000 \mu\text{m}^2$, enquanto esse valor foi de 61,05% na presença do EPS de *A. granulata* (teste “t” de Student, $p=0,0002$). Já os agregados maiores que $30000 \mu\text{m}^2$ compuseram apenas 2% do total de partículas formadas na água integral de Barra Bonita, valor significativamente inferior aos 10,80% formados com adição de EPS (teste “t” de Student, $p=0,0009$). Nas classes intermediárias de tamanho, os agregados possuíram também abundâncias relativas significativamente maiores quando da adição de EPS, comprovadas pelo teste “t” de Student ($p=0,0133$ entre 10000 e $20000 \mu\text{m}^2$ e $p=0,0099$ entre 20000 e $30000 \mu\text{m}^2$).

4.2. Efeito da densidade de células de *A. granulata* na agregação

Ao simular um *bloom* populacional dessa diatomácea na represa de Barra Bonita, observamos (tabela 17) que $20500 \pm 2689,80 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ (51,6% das células em suspensão) de *A. granulata* foram agregadas.

A formação de agregados envolveu $20500 \pm 2689,80 \text{ Cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, ou seja, $1,435 \pm 0,190 \text{ mg de carbono} \cdot \text{L}^{-1}$ na forma de células dessa diatomácea. Esse valor é mais de 100

vezes maior que o carbono envolvido na formação de agregados no experimento com a água integral de Barra Bonita.

Com adição de células de *A. granulata* houve formação do mesmo número de agregados por litro (teste “t” de Student, $p=0,3948$) em comparação à floculação da água integral de Barra Bonita (tabela 18). Porém, os agregados formados foram maiores quando as células da diatomácea foram adicionadas (tabela 18 e figura 21). Nesses experimentos, 64,22% dos agregados formados encerraram áreas menores que $10000 \mu\text{m}^2$, número significativamente inferior ao apresentado nos experimentos com a água integral de Barra Bonita. Por outro lado, 10,34% dos agregados formados na água de Barra Bonita com adição de células da diatomácea alcançaram áreas maiores que $30000 \mu\text{m}^2$, número consideravelmente maior que o obtido na água integral (teste Mann-Whitney, $p=0,0317$). Nas classes intermediárias de tamanho, os agregados possuíram também abundâncias relativas significativamente maiores quando da adição de células de *A. granulata*, comprovadas pelo teste Mann-Whitney ($p=0,0317$ entre 10000 e 20000 e $p=0,0159$ entre 20000 e 30000).

Tabela 17: *Aulacoseira granulata*. Concentração de células antes (Inicial) e depois (Final) da floculação ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=180 \text{ min}$), porcentagem de agregação de células e seqüestro de carbono na forma de células. da água integral de Barra Bonita; água com adição de EPS e água integral com adição de células. O erro corresponde ao desvio padrão ($n=8$).

Amostra	Concentração de células de <i>A. granulata</i> (Cel . mL ⁻¹)		Agregação (%)	Carbono Seqüestrado (mg · L ⁻¹)
	Inicial	Final		
Água Integral	388,65 ± 64,68	212,50 ± 62,50	45,34	0,0123 ± 0,001
Água + EPS	413,75 ± 59,50	136,66 ± 40,62	66,97	0,0194 ± 0,002
Água + Células	39738,12 ± 3517,25	19238,12 ± 1615,28	51,60	1,435 ± 0,190

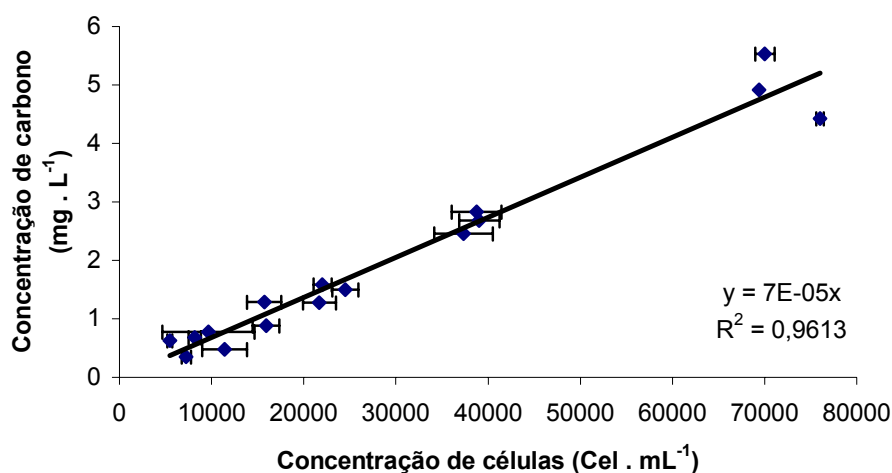


Figura 20: *Aulacoseira granulata*. Relação entre a concentração de carbono celular $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e concentração de células em diferentes fases de crescimento. As barras de erro correspondem ao erro médio ($n=3$).

Tabela 18: Frequência de ocorrência em classes de tamanho (área, μm^2) e densidade ($\text{agreg} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos agregados formados nos experimentos de floculação ($G=3 \text{ s}^{-1}$, $t=180 \text{ min}$) na água integral de Barra Bonita (BB Integral); água de Barra Bonita com adição de EPS (BB + Poliss); água integral de Barra Bonita com adição de células (BB + Células). O erro corresponde ao desvio padrão ($n=6$). Os asteriscos indicam que houve diferença significativa em relação aos agregados formados na água integral de Barra Bonita.

Classe de tamanho (área, μm^2)	Frequência de ocorrência (%)		
	BB Integral	BB + Poliss	BB + Células
<10000	$84,41 \pm 4,70$	$61,05 \pm 7,34^*$	$64,22 \pm 3,72^*$
10000-20000	$11,25 \pm 2,79$	$19,47 \pm 5,29^*$	$20,34 \pm 4,99^*$
20000-30000	$2,49 \pm 1,14$	$8,66 \pm 4,30^*$	$7,22 \pm 2,11^*$
>30000	$2,02 \pm 1,95$	$10,80 \pm 3,65^*$	$10,34 \pm 4,38^*$
(agreg · L ⁻¹)	$20700,63 \pm 2498,78$	$15605,09 \pm 2029,86^*$	$22730,89 \pm 2498,78$

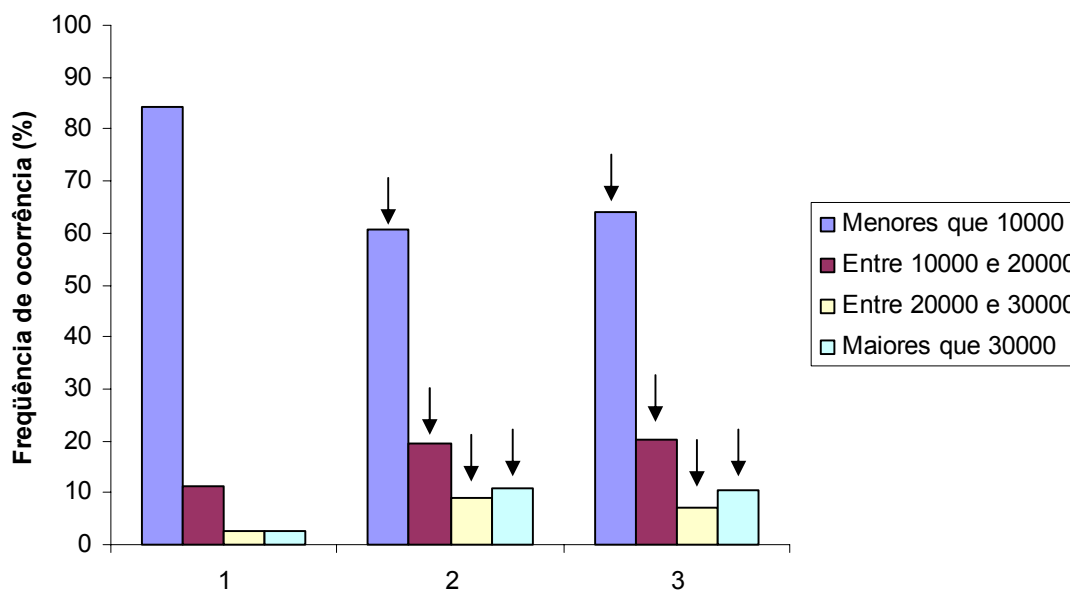


Figura 21: Distribuição (%) em classes de tamanho (área, μm^2) dos agregados formados nos experimentos de floculação ($G=3\text{ s}^{-1}$, $t=180\text{ min}$) na água integral de Barra Bonita (1); água de Barra Bonita com adição de EPS (2); água integral de Barra Bonita com adição de células (3). As setas indicam diferença significativa entre o número de agregados da classe apontada em relação à classe correspondente na floculação da água integral de Barra Bonita.

As figuras 22, 23 e 24 mostram, respectivamente, agregados formados na floculação da água integral de Barra Bonita, água de Barra Bonita com adição do EPS de *A. granulata* e água de Barra Bonita com adição dos filamentos da diatomácea.

Além dos filamentos de *A. granulata*, células de outras espécies fitoplanctônicas foram observadas como constituintes dos agregados formados nos experimentos realizados. Entre elas, as espécies mais frequentemente observadas foram: *Anabaena* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Planctothrix* sp. (Cyanophyceae); *Aulacoseira spiralis*, *Cyclotella* sp., *Thalassiosira* cf. *duostrata* (Bacillariophyceae); *Cryptomonas tetrapirenoidosa* (Cryptophyceae) e *Staurastrum* sp. (Desmidiaceae). Em adição, partículas como argilas, fragmentos de zooplâncton e TEP também compuseram os agregados formados.



Figura 22: Agregado formado no experimento de agregação na água integral de Barra Bonita, corado com Alcian Blue 0,06 %. Os polissacarídeos ácidos estão corados em azul.

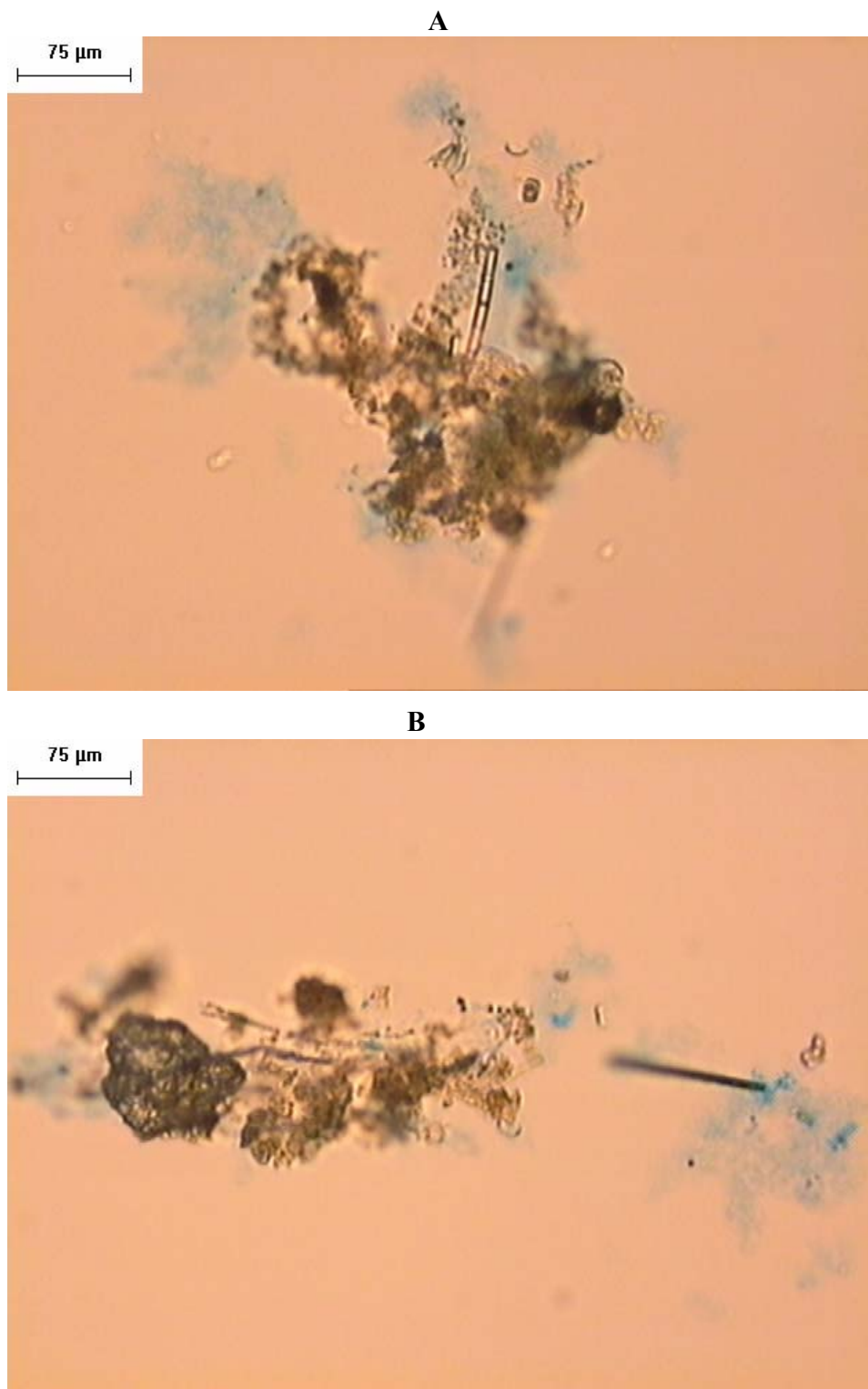


Figura 23: Agregados formados no experimento de agregação na água de Barra Bonita com adição de EPS de *Aulacoseira granulata*, corado com Alcian Blue 0,06%. (A) Nota-se um filamento dessa espécie no agregado e (A e B) grande quantidade de polissacarídeos ácidos, corados em azul.

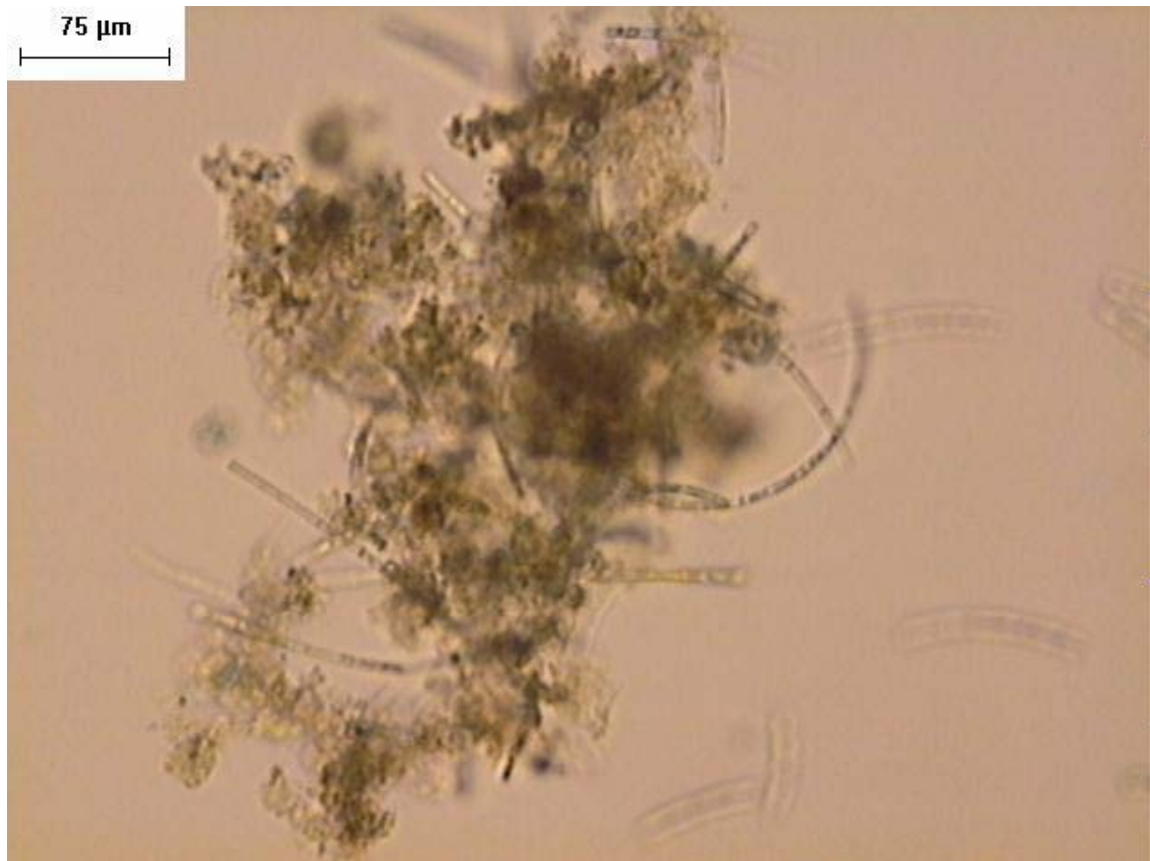


Figura 24: Agregado formado no experimento de agregação na água integral de Barra Bonita com adição de filamentos de *Aulacoseira granulata*. Nota-se que os filamentos dessa espécie compuseram abundantemente o agregado.

Discussão e conclusões

1. Floculador Couette

O aparelho mostrou-se extremamente útil para os propósitos deste trabalho pois, com ele pôde-se variar e calcular as taxas médias do gradiente de cisalhamento, ao contrário de garrafas em rotação. Entretanto, devido a sua constituição de acrílico e retentores de borracha, mostra-se impróprio para análises de carbono por medições diretas em TOC-Vcph (Shimadzu) das amostras retiradas do aparelho.

Além disso, outra desvantagem do aparelho é o volume amostral necessário para preenchê-lo, que é cerca de 1 litro. Essa quantia dificultou a obtenção de soluções de células em concentrações de 10^4 part · mL⁻¹ nas fases iniciais do cultivo, nas quais são encontrados cerca 10^3 filamentos por mililitro, no caso de *A. granulata*.

Entretanto, o floculador Couette possibilitou a obtenção de resultados importantes sobre o processo de agregação em culturas de espécies fitoplanctônicas de água doce, campo de estudo ainda pouco explorado. Obtiveram-se dados sobre o efeito das taxas de cisalhamento, o efeito da idade de cultivo e do EPS produzido por duas espécies isoladas do reservatório de Barra Bonita sobre o processo de agregação. Dados estes que estão abrindo novos caminhos para futuros estudos. Além disso, um novo floculador, dessa vez de vidro e com volume menor, está sendo projetado para possibilitar análises de carbono sem contaminações provenientes do acrílico. No novo projeto, os problemas detectados neste trabalho serão sanados, garantindo maior praticidade e eficiência.

2. Modelos matemáticos

O emprego dos modelos matemáticos nos estudos com as culturas de microalgas determinou os coeficientes de decaimento do número de partículas em suspensão, parâmetro que, associado ao número final de partículas envolvidas na agregação, promoveu um estudo mais aprofundado do processo de formação de agregados. As modelagens apresentaram boa adequação aos resultados, comprovada pelos altos valores de R². Além disso, os modelos descrevem o comportamento da formação de agregados pelas partículas em suspensão durante todo o tempo de experimento.

Embora no estudo com *T. cf. duostra* o decaimento do número de partículas tenha sido linear, descrevendo uma reta, presume-se que ele deveria tornar-se mais lento até se estabilizar com tempos de experimento mais longos, já que a probabilidade de as células se chocarem diminuiria a menores concentrações de partículas em suspensão ($\text{part} \cdot \text{mL}^{-1}$). Se isso acontecesse, a agregação deveria descrever o padrão apresentado em *A. granulata*. Entretanto, embora a agregação tenha sido discreta, ela ocorreu continuamente até o final dos experimentos. Talvez esse padrão tenha sido proporcionado pela presença das fibras de quitina, que foram encontradas como constituintes dos agregados, e que poderiam atuar como uma rede entre as células, aumentando a possibilidade de elas se agregarem (figura 25).

Nos experimentos com *A. granulata*, a comparação entre os coeficientes descritos pelos modelos bifásico e exponencial, mostrou que os valores de k foram significativamente diferentes apenas quando o modelo bifásico descreveu o processo de agregação como composto por duas etapas. Apesar dessa variação, ambos os modelos poderiam ser aplicados para descrever os processos de agregação aqui apresentados, já que ambos apresentaram altos valores de R^2 (superiores a 0,90 na quase totalidade dos casos) e não levaram a interpretações contraditórias dos resultados.

Entretanto, o modelo exponencial demonstrou promover menor variação e menores erros entre réplicas, como no caso do experimento com *A. granulata* na metade da fase exponencial de crescimento, na presença de EPS. Nesse caso, embora o número final de partículas tenha sido o mesmo nas duas réplicas, o modelo bifásico apresenta o processo de agregação de apenas uma das réplicas como composto por duas etapas. Na outra réplica, esse modelo descreve a agregação como composta por uma única etapa. Essa abordagem impossibilitou, desse modo, o estabelecimento de um coeficiente médio entre essas réplicas, segundo o modelo bifásico.



Figura 25: *Thalassiosira* cf. *duostra*. Célula associada a fibras de quitina (n-acetil-glicosamina) evidenciadas por corante específico (Chlorazol Black-E 0,2% em etanol 70%). Aumento 1000 x.

3. Efeito das taxas de cisalhamento na agregação

T. cf. duostra apresentou maior formação de agregados quando submetida à taxa de cisalhamento $G= 10 \text{ s}^{-1}$, ao contrário dos experimentos com *A. granulata*, em que houve maior agregação a 3 s^{-1} .

Em linhas gerais, os resultados mostraram, em conformidade a Kiørboe & Hansen (1993) em trabalho com a diatomácea marinha *Skeletonema costatum*, que altas taxas de cisalhamento reduzem a formação de agregados. Esse fato pode ser causado pela quebra dos agregados formados a altas taxas ou então pelo fato de as células chocarem-se a velocidades muito altas, a ponto de não permanecem aderidas após o choque. Por outro lado, Passow et al (1994) encontraram em experimentos com culturas de outra diatomácea marinha, *Chaetoceros gracilis*, que a formação de agregados ocorre em menor escala a menores taxas de cisalhamento ($G= 5 \text{ s}^{-1}$), enquanto a agregação é maior a taxas mais elevadas (30 s^{-1}).

Esse fato torna-se difícil de ser explicado devido à escassa literatura referente ao assunto, mas demonstra que as taxas de cisalhamento produzem efeitos distintos em espécies diferentes, sendo que a morfologia celular pode influir no processo. O gênero *Chaetoceros*, por exemplo, apresenta um par de espinhos de sílica nas extremidades de cada epivalva, que facilitam a formação de agregados após o choque entre as células. Em adição, *T. cf. duostra* produz fibras de quitina, que podem fornecer suporte mecânico para a agregação, como citado anteriormente, facilitando também a formação de agregados. *S. costatum* e *A. granulata*, por sua vez, apresentam morfologia semelhante entre si, sendo os indivíduos de ambas espécies filamentosos e cilíndricos, o que pode explicar o mesmo padrão de agregação das duas espécies em relação às taxas de cisalhamento.

Grossart & Simon (1993, 1998) encontraram correlação positiva entre o aumento da velocidade do vento e a formação de agregados no mesotrófico e pré-alpino lago Constance, sendo a velocidade máxima atingida entre 15 e 20 m · s⁻¹. Essas velocidades, segundo Jackson (1990), podem gerar taxas de cisalhamento próximas de 3 s⁻¹ a 2 metros de profundidade. Embora não tenhamos dados disponíveis sobre o gradiente de cisalhamento e a velocidade do vento no Reservatório de Barra Bonita, as taxas de cisalhamento em que houve formação de agregados em nossos experimentos estão próximas às encontradas nos ambientes naturais. Os resultados obtidos nesse sentido poderão ser utilizados em futuros estudos de hidrodinâmica e sua influência no comportamento das partículas em suspensão no Reservatório de Barra Bonita.

4. Efeito da idade e do EPS na formação de agregados

A idade foi um fator de suma importância na formação de agregados tanto em culturas de *T. cf. duostra* como de *A. granulata*. Para ambas espécies a formação de agregados foi maior no final da fase exponencial em comparação às demais idades de cultivo.

Kjørboe et al (1990), em experimentos com tanques giratórios, obtiveram que a formação de agregados por culturas da diatomácea marinha *Thalassiosira pseudonana* foi cerca de uma ordem de magnitude maior na fase estacionária, quando comparada a outras idades. Entretanto, Kjørboe & Hansen (1993) obtiveram que para *Skeletonema*

costatum, espécie marinha, o potencial de formação de agregados por suas células diminui com a idade de cultivo. Os autores atribuem esse comportamento à excreção de uma substância que suprimiria a agregação.

Passow et al (1994) descreveram que *Chaetoceros gracilis* apresentou maior potencial de agregação na fase estacionária em relação à fase exponencial de crescimento e relacionaram esse aumento da formação de agregados à maior concentração de TEP e colóides presentes nas culturas quando as células cessaram seu crescimento. As TEP são partículas que têm como precursores exopolissacarídeos coloidais produzidos por algas e bactérias (Alldredge et al, 1993) e têm sido reconhecidas como importantes para a formação de agregados em ambientes naturais e culturas (Passow, 2000, Simon et al, 2002) e, normalmente, têm sua concentração aumentada com o tempo de cultivo.

Em nossos experimentos de floculação com culturas, a formação de agregados foi mais pronunciada na presença de EPS tanto para *T. cf. duostra* como para *A. granulata*. A agregação de *T. cf. duostra* na ausência de EPS apenas ocorreu significativamente no final da fase exponencial de crescimento. Para *A. granulata*, a máxima formação de agregados ocorreu no final da fase exponencial, porém na metade dessa fase de crescimento e na fase estacionária também houve formação significativa de agregados. Essa adesividade das células entre si pode estar relacionada à presença de “filmes” de polissacarídeos que envolvem as células e, no caso de *T. cf. duostra*, ainda estar relacionada à presença de fibras de quitina. Essas fibras, além servirem como uma rede que facilita o choque e a adesão entre as células, ainda pode servir de base para a adesão de colóides e TEP sobre sua superfície, fato que aumentaria ainda mais o potencial de agregação dessa espécie.

Por outro lado, observação qualitativa das células de *A. granulata* ao longo do tempo de cultivo, negativamente coradas com Nankin (figura 26. A-D), mostrou que no final da fase exponencial de crescimento os “filmes” de polissacarídeo são mais abundantes em relação à fase estacionária. E esses resultados corroboram a maior agregação naquela fase do crescimento e talvez essa seja a causa dos resultados obtidos por Kiorboe e Hansen (1993) para *S. costatum*.

Esses autores também obtiveram que a agregação em *S. costatum* foi superior na fase exponencial de crescimento em relação à estacionária. Eles relacionaram esse fato ao proposto por Decho (1990) de que uma camada mais densa de polissacarídeos se formaria em volta das células de diatomáceas na fase exponencial de crescimento. Já na fase estacionária, essa camada passaria a se desprender da parede celular, tornando-se menos viscosa e reduzindo a adesividade das células. Essas modificações ocorrem devido a mudanças das propriedades físico-químicas dos polissacarídeos produzidos nas diferentes fases de crescimento. Entretanto, em nossos estudos, análises químicas quantitativas e qualitativas (em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) desses filmes de EPS seriam necessárias para comprovar as nossas observações.

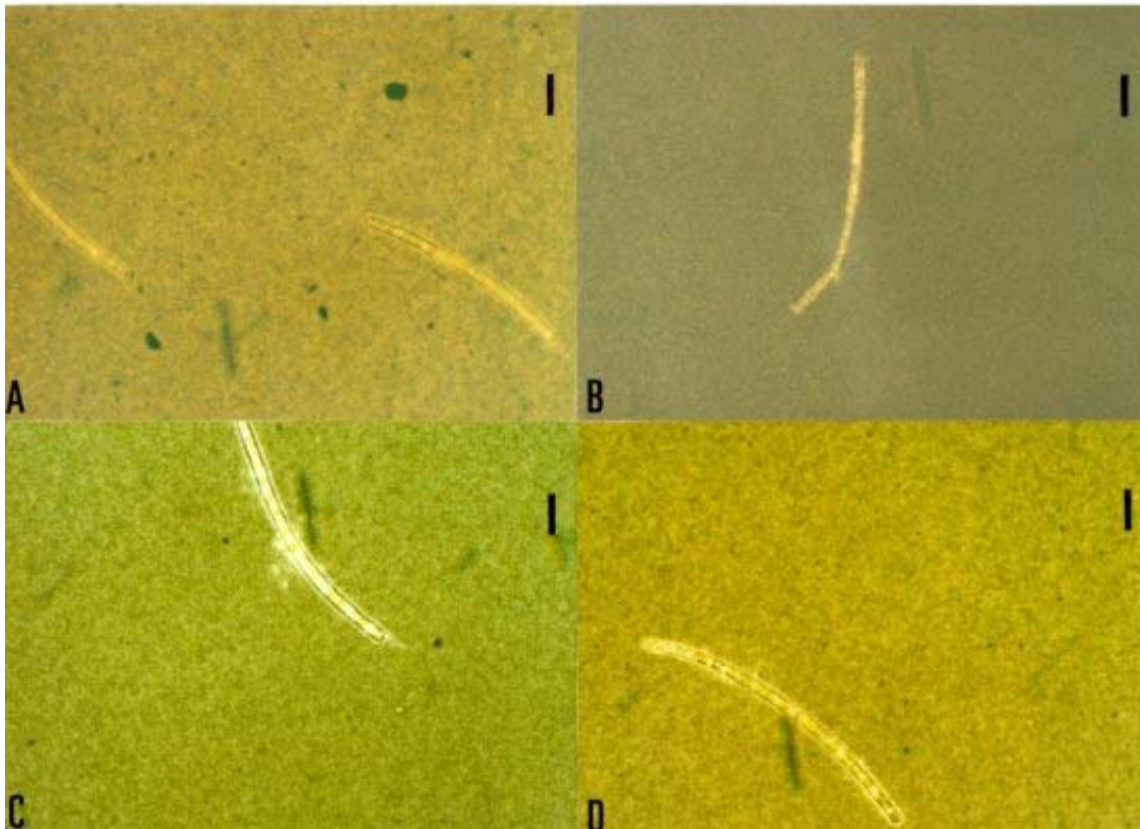


Figura 26: *Aulacoseira granulata*, negativamente corada com Nankin. Filmes de EPS em volta de células: (A) fase 8 dias; (B) fase 18 dias; (C) fase 28 dias e (D) fase 34 dias. Escala 20 μm .

Como citado anteriormente, a presença de EPS promoveu o aumento da formação de agregados em ambas as espécies estudadas. No caso de *T. cf. duostra*, a presença de EPS aumentou o número de partículas envolvidas na agregação, além de ter tornado o processo de agregação mais rápido (já que houve aumento do valor de k).

Nos experimentos com *A. granulata*, além da presença de EPS, o aumento da concentração desses compostos com o tempo de cultivo também promoveu maior formação de agregados tendo esta ocorrido mais rapidamente. Este fato pôde ser

observado quando o coeficiente k obtido na ausência de EPS no final da fase exponencial, e que era cerca de 4,6 vezes maior que o coeficiente apresentado no início da fase estacionária, foi apenas cerca de 1,6 vez maior nos experimentos realizados na presença de EPS.

Kjørboe & Hansen (1993), por outro lado, obtiveram que a adição dos compostos excretados pela diatomácea *Coscinodiscus* sp (filtrados em poro 1,2 μ m) em experimentos de agregação com *S. costatum* não tiveram efeito significativo na formação de agregados. Esse fato mostra novamente que espécies diferentes desempenham papéis distintos no processo de agregação, seja devido à adesividade de suas células ou às propriedades físicas e químicas de seu polissacarídeo ou mesmo devido à sua morfologia.

5. Formação de agregados na água de Barra Bonita

A substituição dos polissacarídeos naturais da água do reservatório pelo EPS produzido por *A. granulata* notavelmente promoveu a formação de menor número de agregados, porém os agregados formados apresentaram áreas superiores àqueles formados nos experimentos com a água do reservatório integral. O aumento do tamanho dos agregados, poderia aumentar suas taxas de afundamento, dependendo do tipo de partículas que foram adicionadas a eles. Carcaças de copépodos, partículas inorgânicas e principalmente diatomáceas são reconhecidos por aumentar as taxas de afundamento de agregados formados em ambientes naturais (Grossart & Simon, 1993). E nossos resultados mostraram que, na presença do EPS de *A. granulata* houve maior incorporação de células dessa espécie aos agregados formados. Por outro lado, agregados com maiores proporções de TEP e cianofíceas podem ter suas taxas de afundamento reduzidas (Beaulieu, 2003). Mas fato incontestável é que o aumento da área dos agregados promove o aumento de sua superfície relativa, devido à geometria fractal dessas partículas (Logan & Wilkinson, 1990). E esse incremento superficial, por sua vez, aumenta o potencial de adsorção de novas partículas, nutrientes e bactérias, tornando os agregados sítios ainda mais ricos nutricionalmente (Shanks & Trent, 1979) e metabolicamente mais ativos (Simon et al, 2002).

A adição de células de *A. granulata*, simulando um *bloom* populacional dessa espécie, proporcionou o aumento da área dos agregados formados, sem porém, diminuir o número de partículas formadas. Alldredge & Silver (1988) e Grossart & Simon (1993), entre outros trabalhos, demonstram que as taxas de afundamento, que variam entre <5 a $200 \text{ m} \cdot \text{d}^{-1}$, são positivamente relacionadas ao tamanho dos agregados. A grande quantidade de células dessa diatomácea que foram acrescidas aos agregados, mostra que essas partículas tornar-se-iam indubitavelmente mais pesadas e, portanto, com taxas de afundamento elevadas. Embora a agregação seja um processo complexo, dependente de muitas variáveis bióticas e abióticas (Grossart et al, 1997), nossos resultados mostram que elevadas densidades populacionais de *A. granulata* no reservatório de Barra Bonita podem aumentar sensivelmente a formação de agregados gelatinosos e que, nesse caso, o fluxo de matéria para o fundo seria também aumentado. De acordo com nossos cálculos, apenas considerando as células de *A. granulata*, valores entorno de $1 \text{ mg de carbono} \cdot \text{L}^{-1}$ estariam potencialmente sujeitos a serem transportados para o fundo na forma de agregados. Desde que os agregados são sítios ricos em matéria orgânica viva e em decomposição e densamente colonizados por bactérias e outros organismos heterotróficos (Simon, 2002), podemos imaginar que esse fenômeno levaria a modificações na ciclagem do carbono na represa.

6. Características físico-químicas dos polissacarídeos e agregação

Nesse trabalho foram apresentadas apenas as concentrações totais dos EPS produzidos por *A. granulata* e *T. cf. duostra* e quantificados por cromatografia líquida (HPLC). Giroldo et al (em preparação) caracterizaram os polissacarídeos produzidos por *A. granulata* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, obtendo que dentre os 27.1% das unidades terminais desse EPS, 56.7% são representados pelos açúcares metilados fucose e ramnose, reconhecidos por suas propriedades hidrofóbicas devido a presença de um grupo metil no carbono 6. Se consideradas ainda as unidades terminais de ácido glicurônico, cuja reatividade é também reconhecida, a porcentagem de monossacarídeos terminais com significado no processo de agregação atingiria 74,5%. A análise do EPS de *T. cf. duostra* mostrou que esses compostos somados compõem apenas 20% dos monossacarídeos terminais.

Polímeros hidrofóbicos são conhecidos por serem moléculas importantes na adesão e colonização de muitas espécies de bactérias e cianobactérias (Fattom & Shilo, 1984). Wustman et al (1997) descreveram os polissacarídeos como os principais elementos constituintes de compostos produzidos para a adesão de diatomáceas. Esses autores sugerem ainda que polímeros ricos em fucose em posições terminais desempenham papéis importantes na adesão desses organismos. Passow (2002) descreveu a hidrofobicidade como um aspecto importante para a formação de TEP e agregados e em 1994, com colaboradores, já demonstrara a formação de TEP em floculador tipo Couette a partir de precursores coloidais.

Por outro lado, a presença de ácidos urônicos no EPS confere carga negativa a esses compostos e aumenta sua reatividade (Decho, 1990). Resíduos de ácidos urônicos nos polissacarídeos podem formar pontes catiônicas com metais encontrados na água de reservatórios e no meio de cultura, (principalmente Ca^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+}), e fazendo com que o EPS adquira estrutura coloidal fibrilar, o que aumentaria a agregação por captura de partículas (Leppard, 1995, Passow, 2002). Além disso, Fletcher & Floodgate (1973) descreveram os polissacarídeos carboxilados (ou ácidos) como elementos tipicamente envolvidos na adesão permanente de bactérias a superfícies.

Essas características poderiam ajudar a explicar a maior formação de agregados na presença de EPS de *T. cf. duostra* e *A. granulata*, bem como as diferenças entre a agregação de ambas as espécies e também poderia explicar a ocorrência freqüente deste último taxa nos agregados encontrados na água de Barra Bonita.

Referências

- ALCOVERRO, T., MAZELLA, E.C.L. 2000- Production of mucilage by the Adriatic epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) under nutrient limitation. **J.Phycol.** 36: 10-87-1095.
- ALLDREDGE, A.L. 1979- The chemical composition of macroscopic aggregates in two neritic seas. **Limnol. Oceanogr.** 24: 855-866.
- ALLDREDGE, A. L. E YOUNGBLUTH, M.J. 1985- The significance of macroscopic aggregates (marine snow) as sites for heterotrophic bacterial production in the mesopelagic zone of subtropical Atlantic. **Deep-Sea Res.** 32: 1445-1456.
- ALLDREDGE, A. L. E SILVER, M. L. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. **Prog. Oceanogr.** 20: 41-82.
- 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: 41-58.
- BEAULIEU, S. E. 2003. Resuspension of phytodetritus from the sea floor: a laboratory flume study. **Limnol. Oceanogr.** 48 (3): 1235-1244.
- BITTAR, T. B. 2005. Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de microalgas isoladas do reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê, SP). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais- Universidade Federal de São Carlos. *Dissertação de Mestrado.* 83 pp.
- CALIJURI, M.C., DOS SANTOS, A.C.A E JATI, S. 2002- Temporal changes in the phytoplankton community structure in a tropical and eutrophic reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). **J. Plank. Res.** 24 (7): 617-634.

CARON, D.A., DAVIS, P.G., MADIN, L.P. E SIEBURTH, J. MCN. 1982- Heterotrophic bacteria and bacterivorous protozoa in oceanic macroaggregates. **Science** 218: 795-797.

DECHO, A.W. 1990- Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food web and marine processes. **Oceanography and Marine Biology Annual Review** 28: 73-153.

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

EPPLEY, R.W., HOLMES, R.W. E STRICKLAND, J.D.H. 1967- Sinking rates of marine phytoplankton measured with a fluorometer. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 1: 191-208.

FATTOM, S. R. E SHILO, M. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 135-143.

FLETCHER, M. E FLOODGATE, G. D. 1973. An electron microscope demonstration of an acid polysaccharide involved in adhesion of marine bacterium to solid surfaces. **J. Gen. Microbiol.** 74: 325-334.

FOWLER, S.W. E KNAUER, G.A. 1986- Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. **Prog. Oceanogr.** 16: 147-194.

GREMM, T. J. E KAPLAN, T. J. 1997. Dissolved carbohydrates in streamwater determined by HPLC-PAD and pulse amperometric detection. **Limnol. Oceanogr.** 42(2): 385-393.

GROSSART, H.P. E SIMON, M. 1993- Limnetic macroscopic aggregates (lake snow): occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance. **Limnol. Oceanogr.** 38: 532-546.

GROSSART, H.P., SIMON, M. and LOGAN, B. E. 1997- Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton and zooplankton. **Limnol. Oceanogr.** 42(8): 1651- 1659.

GROSSART, H.P. E SIMON, M. 1998- Significance of limnetic organic aggregates (lake snow) for the sinking flux of particulate organic matter in a large lake. **Aquat. Microb. Ecol.** 15: 115-125.

GUILLARD, R.R.L. E LORENZEN, C.J. 1972- Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **J. Phycol.** 8: 10-14.

HARGRAVES, P.E. E FRENCH, F.W. 1983- Diatom resting spores: significance and strategies. In: Fryxell, G.A. [Ed.]. *Survival strategies of the algae*. Cambridge Press, Cambridge, pp.49-68.

HEISSENBERGER, A., LEPPARD, G.G. E HERDL, G.J. 1996- Ultrastructure of marine snow. II. *Microbiological considerations*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 135: 299-308.

JACKSON, G. A. 1990. A model of the formation of marine algal flocks by physical coagulation processes. **Deep-Sea Res I.** 37: 1197-1211.

JATI, S. 1998- Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica no Reservatório de Barra Bonita (SP): uma análise em diferentes escalas de tempo. Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. *Dissertação de Mestrado*. 140 pp.

KIØRBE, T., ANDERSEN, K.P. E DAM, H.G. 1990- Coagulation efficiency and aggregate formation in marine phytoplankton. **Mar. Biol.** 107: 235-245.

KIØRBOE, T. E HANSEN, J.L.S. 1993- Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymer. **J. Plankton Res.** 15: 993-1018.

LEPPARD, G. G. 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment**. 165: 103-131.

LOGAN, B.E. E WILKINSON, D.B. 1990- Fractal geometry of marine snow and other biological aggregates. **Limnol. Oceanogr.** 35: 130-136.

MOPPER, K., ZHOU, J., SRI RAMANA, K., 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 Res. II** 42: 47-73.

PASSOW, U. 2002. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. **Prog. Oceanogr.** 55: 287-333.

PASSOW, U., ALLDREDGE, A. L. E LOGAN, B. E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. **Deep-Sea Res I** 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: 327-346.

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

RILEY, G.A. 1963- Organic aggregates in seawater and the dynamics of their formation and utilization. **Limnol. Oceanogr.** 8: 372-381.

SILVER, M.W., SHANKS, A.L. E TRENT, J.D. 1978- Marine snow: microplankton habitat and source of small-scale patchiness in pelagic populations. **Science N.Y.** 201: 371-373.

SHANKS, A.L. E TRENT, J.D. 1979- Marine snow: microscale nutrient patches. **Limnol. Oceanogr.** 24: 850-854.

SHANKS, A.L. E TRENT, J.D. 1980- Marine snow: sinking rates and potential role in vertical flux. **Deep-Sea Res.** 27A 137-143.

SIMON, M., GROSSART, H. P., SCHWEITZER, B. AND PLOUG, H. 2002- Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. **Aquat. Microb. Ecol.** 28: 175-211.

SMETACEK, V.S. 1985- Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. **Mar. Biol.** 84: 239-251.

VAN DUUREN, F.A. 1968- Defined velocity gradient model flucculator. **Journal of Sanit. Enge. Div. Proc. Am. Soc. Civ. Eng.** 94 no. SA4, 671-682.

WASSMANN, P. 1983- Sedimentation of organic and inorganic particulate material in Lindaspollene, a stratified land-locked fjord in western Norway. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 13: 237-248.

WEISS, P., SCHWEITZER, B., AMANN, R. E SIMON, M. 1996- Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1998-2005.

Wustman, B. A., Gretz, M. R. e Hoagland, K. D. 1997. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). **Plant Physiol.** 113: 1059-1069.

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. **Limnol. Oceanogr.** 43: 11860-11871.