

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

PRODUÇÃO DE TEP (TRANSPARENT EXOPOLYMER PARTICLES) EM CULTURAS
DE TRÊS ESPÉCIES DE MICROALGAS ISOLADAS DO RESERVATÓRIO DE
BARRA BONITA (RIO TIETÊ/SP)

THAIS BERALDO BITTAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

SÃO CARLOS, 2005

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

B624pt

Bittar, Thais Beraldo.

Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de três espécies de microalgas isoladas do reservatório de Barra Bonita (Rio Tietê/SP) / Thais Beraldo Bittar. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

87 p.

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

1. Fitoplâncto. 2. TEP. 3. Cultivo de algas. 4. Carbono. 5. Fitoplâncto de água doce. I. Título.

CDD: 589.4 (20^a)

ORIENTADOR

ARMANDO AUGUSTO HENRIQUES VIEIRA

Agradecimentos

À Universidade Federal de São Carlos, ao Departamento de Botânica e ao PPG-ERN pela formação e pela estrutura acadêmica que permitiram a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira pelo investimento, orientação e dedicação a este trabalho, pelos ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade;

À doutoranda Silvia H. S. Fatibello e ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, do Departamento de Química (UFSCar) pelas explicações sobre o uso da metodologia de quantificação das TEP;

Aos Prof. Dr. Elizabete Frollini e Antônio Aprígio S. Curvelo do Instituto de Química de São Carlos (USP) pela ajuda na interpretação química da metodologia de quantificação das TEP;

À Dr^a. Cristina S. F. Nordi pelos artigos;

À Dr^a. Sandra P. Gouvea pela ajuda com o Abstract;

Ao mestrando Pedro Ivo Coelho Ortolano por ter gentilmente cedido uma das fotos de *Aulacoseira granulata*;

A todos do Laboratório de Ficologia da UFSCar: Vanessa, Pedro, Zezé, Mic, Sebastião, Danilo, Sandra, Roseli, Luís, Luisinho, Mariana, Maria Otávia, Ana Teresa e Cristina, pela amizade e pela ajuda imprescindível prestada de muitas formas;

À minha querida amiga Magda pela ajuda, carinho, companhia e preocupação;

Ao pessoal do Laboratório de Entomologia do DEBE: Magda, Rachel, Silvana, Gláucia, Eduardo, Teresa, Prof. Manoel e Prof^a. Angélica pelas festinhas à tarde e pela amizade;

Aos meus amigos Alexandre, Leonardo, Anselmo, Paulo, Zairiane, Giselle e Elisa pela amizade sincera que superou a distância e a saudade;

Ao Picé, pelas traduções, opiniões, apoio, compreensão e amor, e pela sua companhia essencial;

À minha avó, que está sempre torcendo por mim, e à minha família, especialmente meus pais Lígia e José Affonso, minha irmã Rachel e ao Dunga, pela torcida, pelo apoio, amor e amizade incondicionais.

Resumo

As TEP (Transparent Exopolymer Particles) são encontradas em abundância em água doce e oceanos e têm funções importantes na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, como transporte de substâncias ao longo da cadeia trófica, adsorção de compostos dissolvidos e formação de agregados gelatinosos. Os carboidratos extracelulares liberados pelo fitoplâncton parecem ser a principal fonte de TEP. O objetivo deste trabalho foi quantificar a produção biótica e abiótica de TEP em culturas das três principais espécies, em termos de biomassa fitoplanctônica, do reservatório de Barra Bonita (rio Tietê/SP). Também foram obtidas as concentrações de carbono orgânico das frações “TEP”, “células”, “colóides” e “dissolvido real” das culturas. A produção biótica de TEP por *Anabaena spiroides* ou *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) foi maior do que a produção por *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae). As TEP produzidas por processos bióticos corresponderam a 37, 21 e 3,0 mgC L⁻¹ nas culturas de *A. spiroides*, *M. aeruginosa* e *A. granulata* respectivamente, representando quantidades significativas do carbono orgânico total (72, 31, 24 %) durante o crescimento. Os dois processos bióticos de formação de TEP observados e documentados para *A. spiroides* estão relacionados à presença de espesso envoltório mucilaginoso. As três espécies excretam polissacarídeos coloidais com potencial de formação abiótica de TEP por coagulação na superfície de bolhas de espuma. A produção biótica de TEP por estas três espécies em ambiente de água doce eutrofizado foi mais significativa que a produção abiótica e esta última deve ter importância quantitativa apenas em locais altamente poluídos, onde haja formação de espuma. Em ambientes naturais onde sejam abundantes, as três espécies contribuirão com grandes quantidades de matéria orgânica particulada, não somente celular mas também na forma de TEP.

Abstract

Transparent exopolymer particles (TEP) have recently been documented to be abundant in ocean waters and in algal cultures. TEP play important roles in the ecology of aquatic ecosystems since they might be a direct source of carbon for higher trophic levels via protists and microzooplankton. They also adsorb dissolved compounds and compose the matrix of marine snow. The extracellular carbohydrates released by phytoplankton are supposed to be the main source of TEP. The aims of the present study were to quantify the TEP produced by biotic and abiotic processes in cultures of the three most important algae species, with regard to phytoplanktonic biomass, of the Barra Bonita Reservoir (Tietê River/SP). The organic carbon content of distinct fractions (“cells”, “TEP”, “colloids” and “dissolved”) of the cultures was also analysed. The biotic production of TEP by the species *Anabaena spiroides* and *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) was higher than that of *Aulacoseira granulate* (Bacillariophyceae). TEP biotically produced corresponded to 37 mgC L⁻¹ in the *A. spiroides* culture, 21 mgC L⁻¹ in the *M. aeruginosa* culture and 3,0 mgC L⁻¹ in the *A. granulate* culture, which represent significant quantities of the total organic carbon (72, 31 and 24% respectively) during the growth of cultures. The two biotic processes of TEP production which were observed and documented by photographs in the *A. spiroides* culture are related to the presence of the wide envelope. The three species release colloidal polysaccharides capable of abiotic transformation into TEP through the abiotic process of bubble scavenging. The biotic production of TEP by these algae species in hypereutrophic freshwater environments was more significant than the abiotic production and the latter must have quantitative importance only in highly polluted waters where the formation of foam may occur. Wherever abundant, these species contribute large quantities of particulate organic matter in the non-living compartment, as TEP.

Lista de Figuras

Figura 1. Apresentação esquemática dos processos bióticos e abióticos de produção de TEP relacionados ao fitoplâncton que ocorre nos ambientes aquáticos.....2

Figura 2. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, obtidos em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*. Barras de erro representam o desvio padrão, n=4.....17

Figura 3. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo, n=2..17

Figura 4. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo, n=2.....18

Figura 5. Média dos valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L⁻¹ de cultura, em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*.....19

Figura 6. Valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L⁻¹ de cultura, de cada réplica de cultura (○ R1 e ▲ R2) de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.....19

Figura 7. Valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L⁻¹ cultura, de cada réplica de cultura (○ R1 e ▲ R2) de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.....20

Figura 8. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L⁻¹), medidas na fração “TEP” em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*. Barras de erros representam o desvio padrão, n=6.....21

Figura 9. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L⁻¹), medidas na fração “TEP” de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo. Barras de erro representam o desvio padrão, n=3.....22

Figura 10. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L⁻¹), medidas na fração particulada de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo. Barras de erro representam o desvio padrão, n=3.....22

Figura 11. Colônia de *Microcystis aeruginosa* com envoltório polissacarídico evidenciado. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 µm..24

Figura 12. Células de *Microcystis aeruginosa* e TEP formadas na cultura (setas). Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 µm.....25

Figura 13. Vista pleural de filamento de *Aulacoseira granulata* sem envoltório polissacarídico, observado no início da fase exponencial do crescimento da cultura. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm ..26

Figura 14. Vista pleural de filamento de *Aulacoseira granulata* com envoltório polissacarídico evidenciado, observado no final da fase exponencial do crescimento da cultura. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm . Coloração negativa obtida com tinta Nanquim.....27

Figura 15. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L^{-1} , da fração “TEP” da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.....29

Figura 16. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L^{-1} , da fração “TEP” de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.....29

Figura 17. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L^{-1} , da fração “TEP” de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.....30

Figura 18. Filamento longos de *Anabaena spiroides*, característicos da fase exponencial do crescimento da cultura. (a) Porções do envoltório mucilaginoso sendo liberadas (aumento 200 x, barra de escala = 50 μm) e (b) pequenas TEP recém formadas começando a se

acumular no meio de cultura (aumento 400 x, barra de escala = 10 μm). Coloração negativa obtida com tinta Nanquim.....32

Figura 19. Morte das células de *Anabaena spiroides*. (a) Vestígios celulares dentro dos envoltórios mucilaginosos e (b) heterocisto ainda intacto após a morte das outras células do tricoma, cujos vestígios ainda são visíveis. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm33

Figura 20. TEP correspondentes aos envoltórios mucilaginosos vazios de *Anabaena spiroides* formadas após a morte das células e acúmulo de pequenas TEP formadas por fragmentação destes envoltórios durante a fase exponencial. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. (a) Aumento 200 x, barra de escala = 50 μm e (b) aumento 400 x, barra de escala = 10 μm34

Figura 21. Filamentos curtos observados na fase estacionária do cultivo de *Anabaena spiroides*. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. (a) Aumento 200 x, barra de escala = 50 μm e (b) aumento 400 x, barra de escala = 10 μm35

Figura 22. Médias dos valores, em mgC L^{-1} , de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c) e “colóides” (d) da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.....38

Figura 23. Valores, em mgC L^{-1} , de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c), “colóides” (d) e “dissolvido real” (e) de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.....39

Figura 24. Valores, em mgC L^{-1} , de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c), “colóides” (d) e “dissolvido real” (e) de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.....40

Figura 25. Valores de absorvância (em 602 nm) (a) das amostras de TEP produzidas durante o crescimento de *A. spiroides* (\blacksquare) e (b) de soluções de xantana em concentrações iguais (\circ) e maiores (\bullet) do que aquelas utilizadas na curva de calibração descrita pelo método do *alcian blue*, em mg L^{-1} 47

Figura 26. Grande quantidade de espuma formada no rio Tietê invadindo a ponte “Arcílio C. da Cruz” na cidade de Pirapora do Bom Jesus (SP). Fonte: www.webcentral.com.br....61

Figura 27. Espuma formada no rio Tietê devido à poluição. (a) Acúmulo no trecho em que o rio atravessa a cidade de Pirapora do Bom Jesus (SP) e (b) visível em uma grande extensão do rio. Fonte: www.webcentral.com.br.....61

Lista de Tabelas

Tabela I. Nome atribuído, composição e forma de obtenção das frações das culturas do tipo *batch* das espécies fitoplanctônicas *A. spiroides*, *M. aeruginosa* e *A. granulata*.....12

Tabela II. Medidas de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), feitas na fração particulada (células + TEP) e na fração “TEP” e (D) diferença entre as medidas das duas frações, obtidas durante o período dos cultivos. (A) Média dos valores obtidos para a espécie *A. spiroides* e (B) médias dos valores de cada réplica de cultura da espécie *M. aeruginosa*.....23

Tabela III. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.....41

Tabela IV. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total de cada réplica de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.....41

Tabela V. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total de cada réplica de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.....42

Tabela VI. Produção de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), a partir de polissacarídeos extracelulares (EPS) liberados pelas três espécies de microalgas estudadas, borbulhados em Torre de Espuma. (A) borbulhamento de EPS; (B) borbulhamento de EPS adicionado de Extran[®] ($0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$); (C) controle – complexação entre Extran[®] e *alcian blue*.....43

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Material e Métodos.....	8
3.1 Organismos.....	8
3.2 Condições gerais de cultivo.....	8
3.2.1 Cultivo de <i>Anabaena spiroides</i>	9
3.2.2 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	9
3.2.3 Cultivo de <i>Aulacoseira granulata</i>	9
3.3 Concentração de clorofila <i>a</i>	9
3.4 Produção biótica e abiótica de TEP.....	10
3.4.1 Fracionamento das culturas.....	10
3.4.2 Quantificação da produção biótica de TEP pelo método do <i>alcian blue</i> ..	12
3.4.3 Quantificação de TEP produzidas por processos abióticos.....	13
3.5 Documentação fotográfica dos processos bióticos de produção de TEP por <i>A.</i> <i>spiroides</i>	15
3.6 Determinação do conteúdo de carbono orgânico das frações das culturas.....	15
4. Resultados.....	16
4.1 Crescimento das culturas.....	16
4.1.1 Concentração de clorofila <i>a</i>	16
4.1.2 Medidas de carbono orgânico da fração “células”.....	18
4.2 Produção biótica de TEP pelas culturas.....	20
4.2.1 Medidas de TEP pelo método do <i>alcian blue</i>	20

4.2.2 TEP quantificadas por conteúdo de carbono orgânico.....	28
4.3 Processos de formação biótica de TEP por <i>A. spiroides</i>	30
4.3.1 Fragmentação e liberação de partes do envoltório mucilaginoso.....	30
4.3.2 Morte celular.....	31
4.4 Conteúdo de carbono orgânico das culturas e de suas frações.....	36
4.4.1 Fração “TEP”.....	36
4.4.2 Fração “células”.....	37
4.4.3 Fração “colóides”.....	37
4.4.4 Fração “dissolvido real”.....	37
4.5 Produção abiótica de TEP em “Torre de Espuma”.....	42
5. Discussão.....	43
5.1 Considerações sobre o método do <i>alcian blue</i>	43
5.2 Crescimento das culturas.....	48
5.3 Produção biótica de TEP.....	49
5.4 Balanço do conteúdo de carbono orgânico entre as frações da cultura.....	55
5.5 Produção abiótica de TEP.....	57
6. Conclusões.....	62
7. Referências Bibliográficas.....	63

1. Introdução

TEP (Transparent Exopolymer Particles) são partículas compostas por polissacarídeo transparente e gelatinoso, maiores que 0,45 μm (Alldredge *et al* 1993, Passow 2000) e muito abundantes em ambientes aquáticos em geral, principalmente em oceanos onde representam uma fração significativa do carbono orgânico particulado (Alldredge *et al* 1993, Mari & Kjørboe 1996). As TEP são originadas nos corpos d'água como consequência de diferentes processos, classificados como bióticos ou abióticos (Figura 1). Os processos bióticos estão relacionados à existência de envoltórios mucilaginosos (cápsulas e bainhas) das células ou colônias fitoplanctônicas, que são compostos por polissacarídeos transparentes e gelatinosos. Morte celular, liberação de parte dos envoltórios mucilaginosos de colônias ou qualquer outro processo que tenha como consequência a separação completa entre os envoltórios e as células são os mecanismos bióticos de produção de TEP (Hong *et al* 1997). Isto por que estes envoltórios, assim que separam-se das células, passam a ser partículas de polissacarídeo livres, ou seja, passam imediatamente a ser consideradas TEP. Por processos abióticos, as TEP são formadas a partir de precursores polissacarídicos coloidais livres na coluna d'água e excretados principalmente pelo fitoplâncton (Alldredge *et al* 1993, Passow *et al* 1994, Passow 2000) que, devido à fatores físicos, unem-se formando partículas. A formação de TEP a partir destes polissacarídeos coloidais livres ocorre apenas quando condições abióticas especiais se fazem presentes no ambiente, tais como movimentos das camadas de água causados pelo vento, correntes, turbulência e quebra das ondas no mar. Esta agitação tem como consequências o aparecimento de grandes quantidades de espuma (Johnson & Cooke 1980) e a formação de um gradiente de cisalhamento na coluna d'água (Passow 2000), gerado quando camadas adjacentes de água adquirem velocidades diferentes. A

presença de bolhas e do gradiente de cisalhamento favorecem, respectivamente, a coagulação e o choque (Mopper *et al* 1995, Zhou *et al* 1998) dos polissacarídeos coloidais precursores, condições que, independentemente uma da outra, são propícias à união dos colóides para formarem uma partícula, ou seja, uma TEP. No processo de coagulação, polissacarídeos coloidais que envolvem externamente cada bolha de espuma coagulam após a coalescência desta bolha e permanecem unidos formando uma partícula (uma TEP). Já o gradiente de cisalhamento proporciona o choque dos polissacarídeos coloidais precursores que estão no limite entre as duas camadas de água com velocidades diferentes, choque que também faz com que estes polissacarídeos se unam formando TEP.

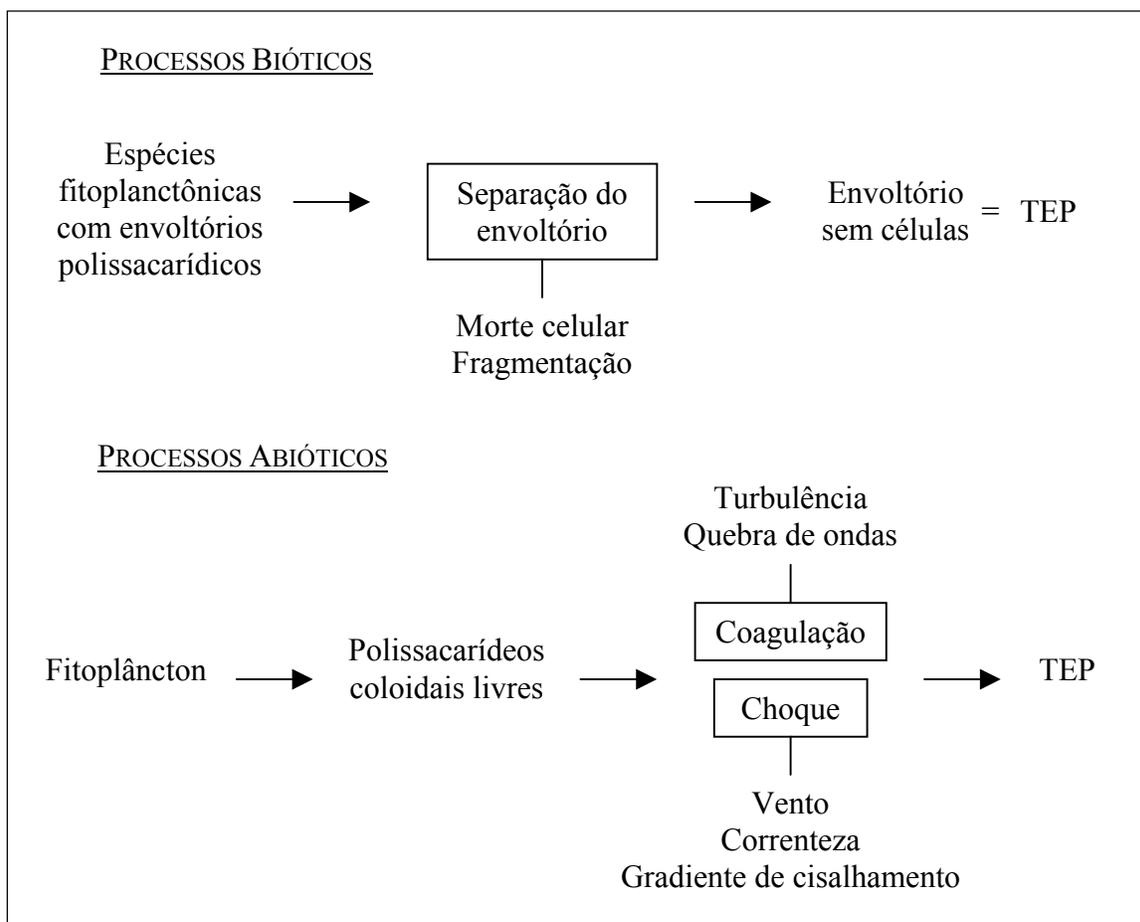


Figura 1. Apresentação esquemática dos processos bióticos e abióticos de produção de TEP relacionados ao fitoplâncton que ocorre nos ambientes aquáticos.

Na cadeia alimentar, TEP podem ser utilizadas diretamente como alimento por protozoários, zooplâncton e outros organismos filtradores (Shimeta 1993, Tranvik *et al* 1993), como copépodos (Decho & Moriarty 1990, Ling & Alldredge 2003). Devido à sua composição, sua grande área superficial para reações de troca e sua grande capacidade de formar ligações com compostos dissolvidos (Logan & Hunt 1987), as TEP podem formar complexos metálicos e adsorver compostos orgânicos e inorgânicos. Estas ligações com as TEP podem representar uma rota alternativa de transferência destes compostos do *pool* dissolvido para níveis tróficos mais altos (Mari 1999). As TEP representam também importante papel na ciclagem da matéria em ambientes aquáticos já que podem ser utilizadas como fonte de energia por bactérias, processo que torna os nutrientes novamente disponíveis ao fitoplâncton. Devido a estas características, as TEP passam a realizar uma importante função de transporte, tanto do *pool* dissolvido para o *pool* particulado como ao longo da cadeia trófica, nos ecossistemas aquáticos. Por serem partículas grandes, as TEP são utilizadas ainda como local de refúgio e como substrato para diversas populações de bactérias (Alldredge *et al* 1993, Mari & Kiorboe 1996). Esta estreita relação entre as TEP e as atividades bacterianas talvez possa explicar a grande dificuldade de se obter culturas axênicas de espécies que possuem espessos envoltórios de polissacarídeo, como cápsulas e bainhas. Isto por que estes envoltórios podem ser o habitat de diversas populações de bactérias e, neste caso, a relação entre bactérias e o polissacarídeo dos envoltórios poderia ser essencial não só às bactérias, mas também às células algais.

Além do impacto na distribuição e nas atividades bacterianas, as TEP têm grande importância na formação de agregados gelatinosos, principalmente na *marine snow* (agregados maiores que 0,5 mm em diâmetro) (Logan *et al* 1995), por serem um componente que atua como matriz, facilitando a fixação dos demais componentes dos

agregados tanto de águas naturais como daqueles produzidos em condições laboratoriais (Allredge *et al* 1993). O fato de os agregados gelatinosos possuírem altas taxas de afundamento, que podem chegar a centenas de metros por dia no oceano (Fowler & Knauer 1986), faz com que eventualmente atinjam o fundo dos corpos d'água. Desta forma, os agregados, e conseqüentemente as TEP que os compõem, seriam caracterizados como seqüestradores das substâncias agregadas (células e detritos) e, em última análise, de carbono da zona fótica da coluna d'água para a zona afótica (Fowler & Knauer 1986, Engel 2002). Caracterizadas como possíveis “seqüestradoras” de carbono quando compõem os agregados gelatinosos, as TEP realizam uma função oposta à sua função, já citada, no transporte de compostos ao longo da cadeia trófica.

As TEP não devem ser confundidas com os agregados gelatinosos. Com tamanho variável, os agregados gelatinosos são agrupamentos formados na água pela união de células algais, vivas e mortas, bactérias e detritos, orgânicos e inorgânicos. Em alguns casos, são os envoltórios polissacarídicos das células vivas de microalgas que mantêm estes componentes (células e detritos) agrupados. Na maioria dos agregados, no entanto, a união dos componentes ocorre devido à presença de um outro componente, uma TEP, que funciona como matriz destes agregados, agindo como uma “cola” que facilita a agregação dos demais componentes. Portanto, as TEP podem funcionar como matriz de agregados mas não necessariamente realizarão este papel, já que têm outros destinos e funções nos ecossistemas aquáticos. As TEP se diferenciam dos agregados por serem partículas de polissacarídeo livre de células ou detritos agregados a elas. Obviamente em ambientes naturais, as TEP não existem na forma completamente pura, ou seja, livre de bactérias; no entanto, enquanto não houver agregação de células algais vivas ou mortas e de detritos e enquanto a partícula for predominantemente composta por polissacarídeo, a despeito da

presença de bactérias, ela será considerada uma TEP. As TEP também não devem ser confundidas com os polissacarídeos coloidais livres na água, compostos produzidos e excretados pelo fitoplâncton que estão na forma coloidal e não na forma particulada e, portanto, não se inserem na definição de TEP. Os polissacarídeos exudados somente se transformarão em TEP após submetidos a condições abióticas específicas descritas acima, passando então para o *pool* particulado.

O reconhecimento das TEP é relativamente recente (Alldredge *et al* 1993) e estudos acerca de suas funções, propriedades e importância são escassos no que se refere a ambientes de água doce. No entanto, estes estudos são importantes para o entendimento da ecologia e biogeoquímica do carbono, fato já demonstrado em ambientes marinhos onde estas partículas são abundantes, chegando a 5.10^4 mL^{-1} (Mari & Burd 1998). No oceano, altas concentrações de TEP estão normalmente associadas ao período de senescência de grandes florescimentos de diatomáceas (Mari 1999, Corzo *et al* 2000), grupo que é muito significativo em ambientes marinhos. Em ambientes eutrofizados de água doce, porém, freqüentemente há dominância de outros grupos de microalgas.

O reservatório eutrofizado de Barra Bonita, de onde foram isoladas as espécies de microalgas estudadas neste trabalho, é característico por grandes florescimentos periódicos da espécie de diatomácea planctônica *Aulacoseira granulata* Ehrenberg (Simonsen) (Bacillariophyceae). Estes florescimentos são identificados como parte de um longo ciclo sazonal de dominância, característico por um revezamento entre esta espécie e outras duas da classe Cyanophyceae, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) e *Anabaena spiroides* (Klebahn). Estas três espécies são responsáveis por 96 % da produção da biomassa fitoplanctônica no reservatório de Barra Bonita durante o ano inteiro, embora representem juntas apenas 2,4 % do número total de táxons de microalgas identificados (Jati 1998). As

células da diatomácea *Aulacoseira granulata* são cilíndricas, mais longas do que largas e unidas umas às outras pela superfície valvar, formando filamentos longos, simples e unisseriais (Bourrelly 1968). A frústula de sílica externa à membrana celular é recoberta por um fino filme de polissacarídeo. *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena spiroides* são espécies procariontes, ambas coloniais e que apresentam importância sanitária devido ao seu potencial de formação de *blooms* tóxicos. As células pequenas e esféricas de *M. aeruginosa* são envoltas por mucilagem polissacarídica formando colônias sem forma definida que podem chegar a mais de 500 μm em ambiente natural. As células de *A. spiroides* formam tricomas, colônias em que as células se unem formando um filamento unisseriado em forma de espiral coberto externamente por um espesso envoltório de polissacarídeo.

Considerando que a produção de TEP por espécies de água doce é pouco documentada, experimentos com culturas do tipo *batch* de espécies fitoplanctônicas abundantes em reservatórios eutrofizados, que tenham como objetivo a quantificação e o estudo de TEP, podem revelar informações importantes sobre a ecofisiologia do fitoplâncton e sobre o fluxo de carbono fixado por estas espécies, sendo fundamentais para futuras investigações do papel das TEP em ecossistemas aquáticos dulcícolas.

2. Objetivos

Em culturas unialgais das espécies fitoplanctônicas *Anabaena spiroides*, *Microcystis aeruginosa* e *Aulacoseira granulata*, os objetivos principais deste trabalho foram quantificar a produção biótica e abiótica de TEP, quantificar o conteúdo de carbono orgânico de cada fração das culturas e verificar, mais especificamente, o fluxo de carbono orgânico proveniente da produtividade primária líquida (carbono orgânico líquido total) revertido para a formação de TEP, durante o crescimento destas culturas. Paralelamente, observar e documentar por fotografias os processos bióticos responsáveis pela produção de TEP a partir do envoltório mucilaginoso de *A. spiroides*.

A expressão carbono orgânico líquido total se refere à concentração de carbono orgânico da cultura integral, ou seja, antes do fracionamento enquanto a palavra “líquido” se refere ao carbono orgânico proveniente da produtividade primária líquida, ou seja, já descontado o carbono utilizado na respiração e perdido na forma de CO₂.

3. Materiais e Métodos

3.1 Organismos

As espécies *Anabaena spiroides* (Klebahn) (clone BB007), *Microcystis aeruginosa* (Kützing) (clone BB005) e *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen (clone BB001) foram isoladas do reservatório de Barra Bonita (22° 32' S, 48° 29' W), um lago artificial eutrofizado localizado na porção média do rio Tietê (Estado de São Paulo, Brasil). Estas espécies são mantidas em cultivos unialgais e/ou axênicos na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM: CC 835).

3.2 Condições gerais de cultivo

Para a montagem das culturas experimentais do tipo *batch* de cada uma das três espécies estudadas foi realizada uma lavagem por centrifugação dos inóculos para retirar as TEP e os polissacarídeos coloidais já liberados. Os inóculos lavados foram então adicionados aos meios de cultura adequados para o cultivo de cada espécie, sendo ASM 1 (Gorham *et al* 1964) para os cultivos de *A. spiroides* e *M. aeruginosa* e WC (Guillard & Lorenzen 1972) modificado pela adição do dobro da concentração original de Na₂SiO₃ 9H₂O para o cultivo de *A. granulata*, ambos em pH 7 e autoclavados. As culturas das três espécies estudadas foram mantidas sob condições controladas de laboratório, em temperatura de 23 ± 1°C e fotoperíodo de 12:12 horas controlado por *timer*. As espécies *A. spiroides* e *M. aeruginosa* foram mantidas sob 150 ± 5 μmol photons m⁻² s⁻¹ (PAR) e *A. granulata* sob 100 ± 5 μmol photons m⁻² s⁻¹, luz proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

3.2.1 Cultivo de *Anabaena spiroides*

A espécie *A. spiroides* foi cultivada em 13 frascos iguais de 500 mL com 300 mL de cultura cada, aeradas por agitação manual feita de duas a três vezes ao dia. Durante o tempo do cultivo, aproximadamente 35 dias, foram feitas 6 amostragens utilizando-se 2 dos frascos integralmente em cada uma delas, como réplicas. O 13º frasco foi utilizado para retirar pequenas amostras a fim de registrar por fotografias os processos bióticos de formação de TEP durante todo o período do experimento.

3.2.2 Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

Para o cultivo de *M. aeruginosa* foram montadas duas culturas de 1,5 L cada, consideradas réplicas. Durante todo o tempo de cultivo, 46 dias, as duas culturas foram amostradas nos mesmos dias, totalizando 7 amostragens de cada réplica de cultura. Pequenas amostras para documentação fotográfica foram retiradas ao longo do tempo de cultivo.

3.2.3 Cultivo de *Aulacoseira granulata*

A espécie *A. granulata* foi cultivada da mesma forma que *M. aeruginosa*, durante 42 dias. Pequenas amostras foram retiradas para documentação fotográfica ao longo do tempo de cultivo.

3.3 Concentração de clorofila *a*

Medidas de concentração de clorofila *a* foram utilizadas para identificar as fases do crescimento das culturas e foram obtidas durante todo o tempo dos cultivos, pelo método descrito por Talling & Driver (1963). Segundo esta metodologia, filtrações a vácuo de volumes conhecidos das culturas utilizando membranas de fibra de vidro com poros de 1,2 µm são empregadas para separar as células. A extração do pigmento foi feita pela adição de 10 mL de acetona 90 % aos filtros. Para a extração da clorofila *a* de *M. aeruginosa*

foram utilizados 5 mL da solução de acetona 90 % + 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) puro (v/v). Para completa extração, os filtros foram mantidos com o solvente por 24 horas no *freezer*, a -8°C . Após este período, as amostras foram centrifugadas para evitar interferência dos filtros e a absorvância dos sobrenadantes foi medida em espectrofotômetro, em comprimentos de onda de 665 e 750 nm. Os dados de absorvância foram transformados em mg de clorofila por L de cultura pelas equações descritas a seguir:

$$E = \text{Abs}_{665\text{nm}} - \text{Abs}_{750\text{nm}}$$

$$X = E \cdot 11,9$$

onde X é a concentração de clorofila, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, em 1 mL de solvente e 11,9 é o coeficiente calculado para o solvente utilizado (acetona);

tendo sido utilizados 10 mL de solvente:

$$Y = X \cdot 10$$

onde Y é a concentração de clorofila, em $\mu\text{g mL}^{-1}$ em 10 mL de solvente;

considerando que esta concentração de clorofila *a* é correspondente ao volume de cultura que foi filtrado:

$$Y \cdot \text{volume filtrado de cultura}^{-1} = \text{concentração de clorofila } a \text{ na cultura, em mg L}^{-1}.$$

3.4 Produção biótica e abiótica de TEP

3.4.1 Fracionamento das culturas

Para quantificar a produção biótica e abiótica de TEP, as culturas foram fracionadas. Alíquotas da cultura foram filtradas tangencialmente em cartuchos de fibra oca com poros de $0,45 \mu\text{m}$ acoplados ao aparelho de filtração tangencial Mid Gee (A/G Technology Corporation, Needham, MA, USA). Esta filtração teve como objetivo separar a fração particulada da cultura, que compreende TEP e células, da fração dissolvida. A porosidade dos filtros ($0,45 \mu\text{m}$) foi escolhida por reter de forma eficiente apenas células e

TEP já que filtros de porosidade menor (0,2 µm) poderiam reter polissacarídeos coloidais, não particulados. Parte do volume, 30 mL, da fração particulada resultante desta primeira filtração foi fracionada para separação de seus componentes, ou seja, para separar as células das TEP. Este segundo fracionamento foi feito por meio de centrifugação, devido à qual as células foram decantadas e os TEP permaneceram no sobrenadante. O sobrenadante foi então separado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. Desta forma, a fração particulada deu origem a mais duas frações, que serão aqui chamadas de fração “TEP” e fração “células”. Diferentes forças de centrifugação (RCF – *Relative Centrifugal Force*) foram testadas para cada espécie tendo sido mais eficientes na separação as combinações 2570 x g durante 10 min para *A. spiroides* e *M. aeruginosa* e 1313 x g durante 05 min para *A. granulata*.

O parâmetro RCF foi obtido pela equação descrita abaixo (Cooper 1977):

$$\text{RCF} = \{[(\pi \text{ rpm})^2 / (30^2)] r\} 980^{-1} = (1,119 \cdot 10^{-5}) \text{ rpm}^2 r$$

onde, $\pi = 3,14$;

rpm (rotações por minuto) é a velocidade de centrifugação;

r é a medida do raio do rotor da centrífuga, em cm.

Polissacarídeos coloidais e outros compostos (moléculas menores que 0,45 µm) excretados pelas algas para o meio, ou seja, a fração “dissolvida” das culturas resultante da primeira filtração tangencial, também foi fracionada. Por meio de uma segunda filtração tangencial em cartuchos de fibra oca com poros de 3 KD, a fração “dissolvida” foi dividida em duas frações, uma maior e a outra menor que 3 KD. Estas duas frações serão chamadas aqui de fração “coloidal” ou EPS (*extracellular polysaccharides*) e fração “dissolvido real”, respectivamente. Os colóides foram definidos com critério operacional como

moléculas de tamanho menor que 0,45 μm e maior que 3 KD (Sigleo 1996) e a fração “dissolvido real” corresponde a moléculas menores do que 3 KD (Tabela I).

Tabela I. Nome atribuído, composição e forma de obtenção das frações das culturas do tipo *batch* das espécies fitoplanctônicas *A. spiroides*, *M. aeruginosa* e *A. granulata*.

Nome da Fração	O que contém	Como foi obtida
Fração Particulada	Células e TEP	Filtração tangencial (fração maior que 0,45 μm)
Fração “células”	Células	Centrifugação da fração particulada (precipitado)
Fração “TEP”	TEP	Centrifugação da fração particulada (sobrenadante)
Fração “coloidal” ou EPS	Polissacarídeos extracelulares coloidais	Filtrações tangenciais (fração menor que 0,45 μm e maior que 3 KD)
Fração “dissolvido real”	Moléculas menores	Filtração tangencial (fração menor que 3 KD)

3.4.2 Quantificação da produção biótica de TEP pelo método do *alcian blue*

As TEP formadas por processos bióticos correspondem à fragmentos de parte dos envoltórios polissacarídicos das colônias liberados para o meio e/ou a envoltórios intactos que ficaram vazios, sem células.

As TEP produzidas nas culturas por processos bióticos foram quantificadas em cada amostragem usando o método do *alcian blue* (Fatibello *et al* 2004). Segundo esta metodologia, as TEP reagem com o *alcian blue* 8 GX (C.I. 74240), Polyscience (Warrington, PA, USA) não só tornando-se visíveis pela coloração que adquirem, mas também formando com o corante um par iônico precipitável. Desta forma, as TEP retiram

o corante da solução; quanto maior for a quantidade de TEP, menos corante irá sobrar dissolvido na solução. Após centrifugação, a quantidade de corante que não foi complexada pelas TEP, ou seja, a quantidade de corante que “sobrou” na forma dissolvida, é medida em espectrofotômetro, em 602 nm. Estas medidas de absorbância são posteriormente transformadas em medidas de concentração de TEP utilizando uma curva de calibração feita com o polissacarídeo padrão goma de xantana (Amersham/GE).

Para utilização desta metodologia, faz-se necessário a retirada da fração coloidal devido ao fato de o EPS reagir com *alcian blue* da mesma forma que as TEP. Foram utilizadas, portanto, amostras da fração particulada e da fração “TEP”, ou seja, as medidas de TEP foram feitas, respectivamente, na presença e na ausência das células. Vale ressaltar que na metodologia descrita por Fatibello *et al* (2004), apenas amostras da fração particulada são utilizadas para as medidas de TEP, sendo tanto a separação entre células e TEP, quanto as medidas utilizando as amostras da fração “TEP”, uma iniciativa de modificar ligeiramente o método para comparações. Desta forma, comparações entre as medidas de TEP na fração particulada e na fração “TEP” (respectivamente, na presença e na ausência de células vivas) foram feitas para verificar se os envoltórios das células vivas de *A. spiroides*, *M. aeruginosa* e *A. granulata* também teriam sido corados pelo *alcian blue* a ponto de superestimar a quantidade de TEP na fração particulada. Medidas da produção biótica de TEP foram realizadas em todas as amostragens feitas nas diferentes fases de cultivo das três espécies.

3.4.3 Quantificação de TEP produzidas por processos abióticos

A produção é considerada abiótica se a formação de TEP ocorre quando precursores polissacarídicos coloidais presentes na superfície de bolhas de espuma coagulam após a coalescência destas bolhas. Este processo ocorre quando os

polissacarídeos coloidais são submetidos a condições de turbulência e formação de espuma e bolhas, ou seja, sob condições abióticas específicas.

Para detectar o potencial de produção abiótica de TEP a partir de precursores polissacarídicos extracelulares coloidais (EPS), cerca de 120 mL de amostra da fração “coloidal” obtida na última amostragem de cada cultivo foram borbulhados em um aparato conhecido como “Torre de Espuma” (Zhou *et al* 1998). A “Torre de Espuma” é uma coluna de vidro com a base formada por uma placa de vidro sinterizado com poros de aproximadamente 50 μm por onde é forçado ar purificado utilizando-se uma bomba. Ela simula as condições abióticas de formação de espuma e micro bolhas necessárias à produção abiótica de TEP. Estas condições são características do ambiente marinho para o qual este aparato foi desenvolvido. A fração “coloidal” concentrada de cada espécie estudada foi colocada nesta coluna e borbulhada por 3 horas de maneira a tentar reproduzir o processo físico que leva à formação de TEP, segundo metodologia descrita por Zhou *et al* (1998).

Sabendo-se que em ambientes de água doce a quantidade de espuma é normalmente muito menor que a encontrada em ambientes marinhos, o procedimento acima descrito foi repetido com uma modificação. Foram adicionados 30 μL do detergente neutro Extran[®] MA (Merck) a 120 mL de amostra da fração “coloidal”, obtida na última amostragem de cada cultivo, a fim de aumentar a quantidade de espuma produzida na “Torre”. Esta modificação visou simular de forma mais efetiva as condições conhecidas como mais propícias à produção abiótica de TEP, ou seja, induzindo maior formação de espuma. Em última análise, a adição do detergente teve como objetivo revelar se a ausência de grandes quantidades de espuma poderia “mascarar” a existência do potencial do EPS excretado por estas espécies para formação abiótica de TEP.

Após o período de três horas de borbulhamento na “Torre de Espuma”, as amostras da fração “coloidal” borbulhadas com e sem Extran[®] foram filtradas tangencialmente em cartuchos de fibra oca de poros de 0,45 µm para separar as TEP, possivelmente formadas por coagulação na “Torre”, do EPS restante, que não coagulou. Em seguida, a produção de TEP foi quantificada pelo método do *alcian blue*. É importante ressaltar que o Extran[®] não reagiu com o *alcian blue*, como foi verificado em testes prévios.

3.5 Documentação fotográfica dos processos bióticos de produção de TEP por *A. spiroides*

As amostras de *A. spiroides* para observação ao microscópio e documentação fotográfica foram retiradas durante o tempo de cultivo desta espécie. Foi utilizada câmera fotográfica MC 200 acoplada a um microscópio ótico Zeiss Axioplan 2. Às lâminas com o material foi adicionada tinta tipo Nanquim, para evidenciar o envoltório mucilaginoso e os processos de formação biótica de TEP relacionados a ele. A documentação fotográfica feita com amostras das culturas de *M. aeruginosa* e *A. granulata* teve finalidade ilustrativa.

3.6 Determinação do conteúdo de carbono orgânico das frações das culturas

O conteúdo de carbono orgânico foi medido em cada uma das frações das culturas nas várias fases de crescimento das três espécies estudadas. As frações das culturas foram obtidas pelos mesmos procedimentos descritos no item 3.4.1. Valores de carbono orgânico do meio de cultura utilizado para ressuspensão das células após a centrifugação da fração particulada foram obtidos e, posteriormente, descontados dos valores de concentração de carbono orgânico da fração células. Também foram obtidas as medidas de carbono orgânico líquido total das culturas, utilizando amostras não fracionadas das culturas. Todas as medidas foram feitas diretamente por meio do analisador de carbono de alta resolução TOC-CV cph Shimadzu.

4. Resultados

4.1 Crescimento das culturas

4.1.1 Concentração de clorofila *a*

A concentração de clorofila *a* obtida durante o tempo de cultivo de cada espécie foi um dos parâmetros utilizados para representar o crescimento em biomassa das culturas.

As curvas de crescimento obtidas pela concentração de clorofila *a* para a espécie *A. spiroides* foram características pela ausência aparente de fase *lag* e evidente fase exponencial. O início da fase estacionária foi marcado por uma pequena queda na concentração de clorofila *a* seguida de uma estabilização no crescimento que se manteve até o final do cultivo (figura 2). Devido ao experimento ter sido montado com 13 frascos de culturas, cada dois sendo utilizados integralmente como amostras (réplicas) durante o período de tempo dos cultivos, todos os dados referente à esta espécie foram representados pelas médias das réplicas.

A curva de crescimento em biomassa de ambas as réplicas de cultura de *M. aeruginosa* mostrou-se exponencial ao longo de todo o período do cultivo, estando ausentes as fases *lag* e estacionária (figura 3). Foi observada alta correlação entre os valores de concentração de clorofila *a* das duas réplicas ($r = 0.9105$).

Os valores de clorofila *a* mostraram que houve crescimento exponencial das culturas de *A. granulata* até o 21º dia do experimento seguido de fase de senescência pronunciada. As fases de crescimento foram coincidentes nas duas réplicas de cultura desta espécie (figura 4).

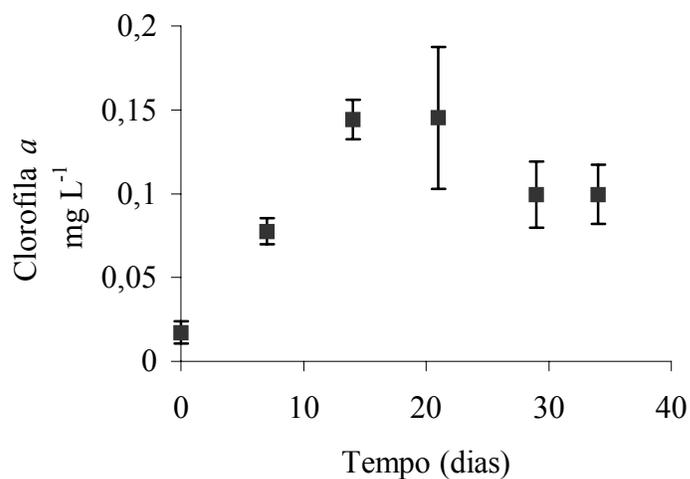


Figura 2. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, obtidos em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*. Barras de erro representam o desvio padrão, n=4.

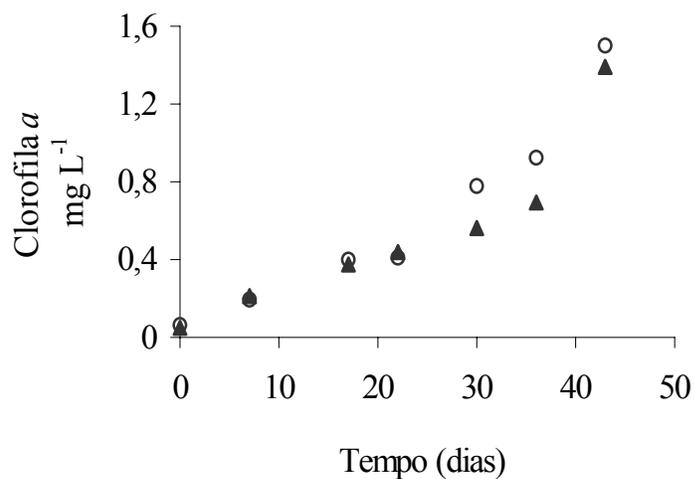


Figura 3. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo, n=2.

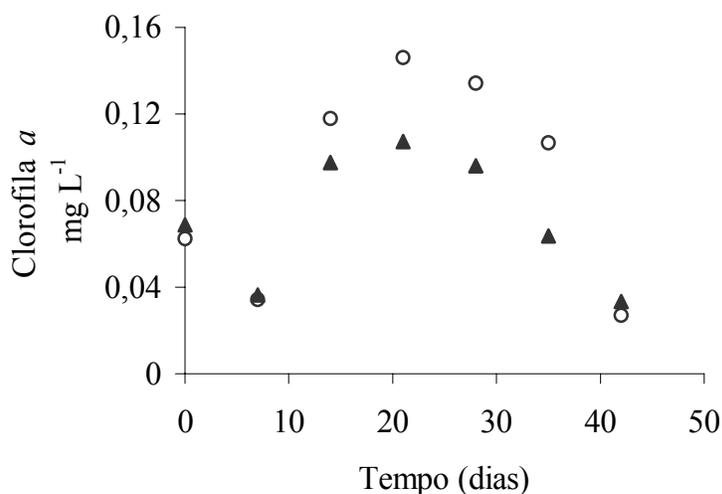


Figura 4. Média dos valores de concentração de clorofila *a*, em mg L⁻¹ de cultura, de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo, n=2.

4.1.2 Medidas de carbono orgânico da fração “células”

A concentração de carbono orgânico da fração “células”, obtida durante todo o tempo de cultivo das espécies, foi outro parâmetro utilizado para avaliar o crescimento das culturas. Este parâmetro representou a biomassa celular (em mg de carbono orgânico por litro de cultura), ou seja, quanto do carbono orgânico fotoassimilado foi utilizado para a produção das células.

Pelos valores de carbono orgânico das células de *A. spiroides* é possível observar uma fase de crescimento exponencial da biomassa celular das culturas, seguida da fase estacionária que se manteve até o final do cultivo (figura 5). As medidas de carbono orgânico das células de *M. aeruginosa* mostraram um crescimento exponencial da cultura do início ao final do cultivo (figura 6). Pode ser observada na figura 7, a existência de fase *lag* nos primeiros dias de cultivo, seguida de crescimento exponencial da biomassa celular

das culturas de *A. granulata*. As medidas de carbono orgânico das células indicaram ainda que o crescimento da cultura tornou-se estável por alguns dias, diminuindo em seguida.

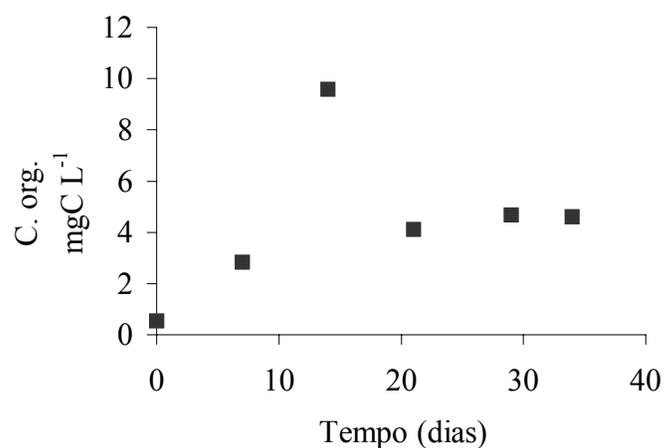


Figura 5. Média dos valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L⁻¹ de cultura, em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*.

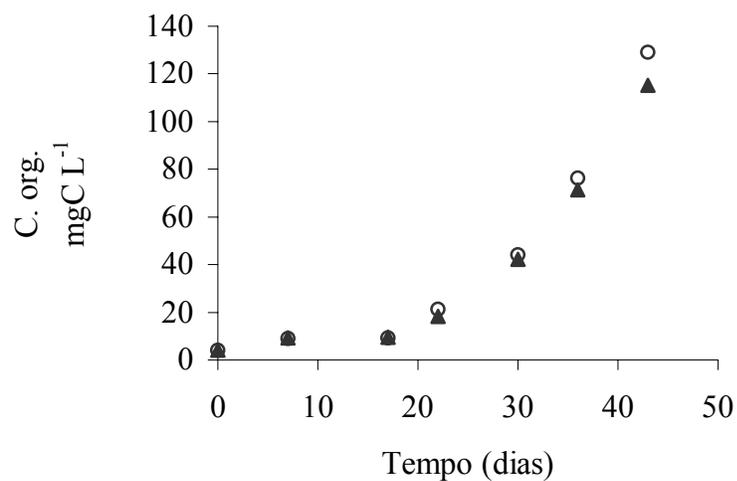


Figura 6. Valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L⁻¹ de cultura, de cada réplica de cultura (○ R1 e ▲ R2) de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.

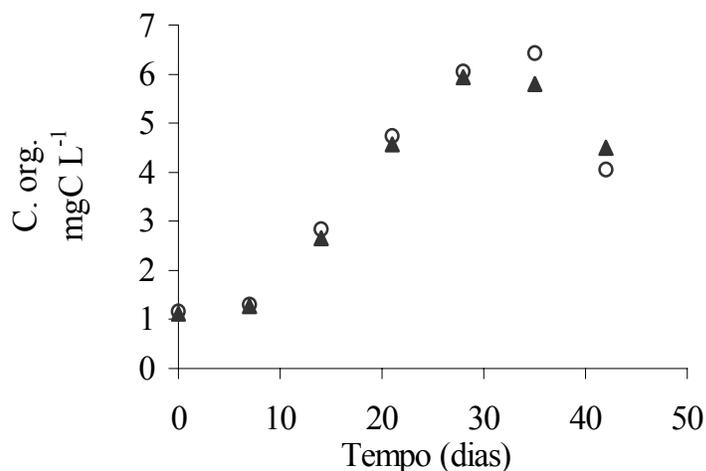


Figura 7. Valores de carbono orgânico (C. org.) da fração “células” ou biomassa celular, em mgC L^{-1} cultura, de cada réplica de cultura (\circ R1 e \blacktriangle R2) de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.

Quando comparados, os dois parâmetros utilizados para verificar o crescimento das culturas mostraram resultados de modo geral bastante semelhantes.

4.2 Produção biótica de TEP pelas culturas

4.2.1. Medidas de TEP pelo método do *alcian blue*

As espécies *A. spiroides* (figura 8) e *M. aeruginosa* (figura 9) produziram grandes quantidades de TEP. O aumento na produção deu-se em função do crescimento destas culturas, atingindo valores máximos no final da fase exponencial e, no caso de *A. spiroides*, tornando-se estável quando a cultura entrou na fase estacionária. As medidas de TEP produzidas por estas duas espécies e apresentadas nas figuras 8 e 9 foram feitas com as amostras da fração “TEP”. Comparações com as medidas de TEP feitas na fração particulada (células + TEP) estão apresentadas na tabela II e mostram que a interferência

das células vivas nas medidas de TEP foi maior nas fases iniciais dos cultivos de *A. spiroides* e *M. aeruginosa*.

Nas culturas de *A. granulata*, a produção biótica de TEP foi muito menor quando comparada à produção de cada cianofíceas e só foi observada após cada réplica ter atingido seu rendimento máximo de crescimento (28º dia na réplica 1 e 35º dia na réplica 2), tendo estado abaixo do limite de detecção do método durante toda a fase exponencial (figura 10). As medidas de TEP produzidas por *A. granulata* apresentadas na figura 10 foram feitas utilizando amostras da fração particulada (células + TEP). As medidas feitas com amostras da fração “TEP” não indicaram presença destas partículas. Isto significa que o polissacarídeo que reagiu com o *alcian blue* deve ser correspondente ao envoltório do filamento, mais espesso no final da fase exponencial.

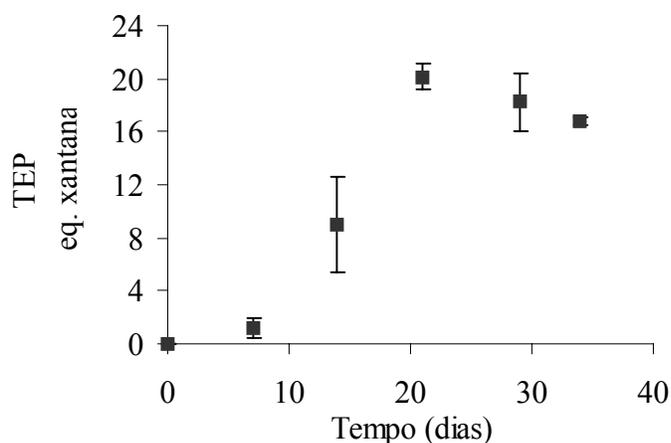


Figura 8. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), medidas na fração “TEP” em função do tempo de cultivo de *A. spiroides*. Barras de erros representam o desvio padrão, $n=6$.

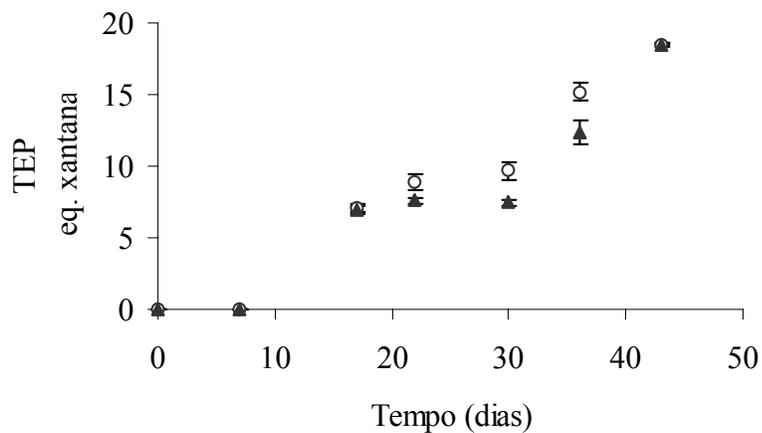


Figura 9. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), medidas na fração “TEP” de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo. Barras de erro representam o desvio padrão, $n=3$.

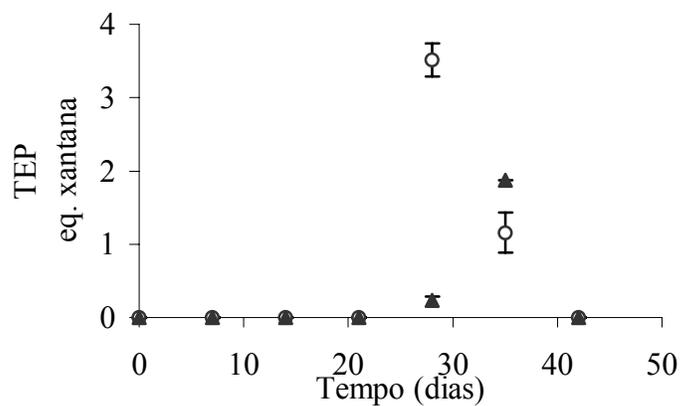


Figura 10. Médias das concentrações de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), medidas na fração particulada de cada réplica (\circ R1 e \blacktriangle R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo. Barras de erro representam o desvio padrão, $n=3$.

Tabela II. Medidas de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), feitas na fração particulada (células + TEP) e na fração “TEP” e (D) diferença entre as medidas das duas frações, obtidas durante o período dos cultivos. (A) Média dos valores obtidos para a espécie *A. spiroides* e (B) médias dos valores de cada réplica de cultura da espécie *M. aeruginosa*.

(A)

Tempo de Cultivo (dias)	Fração Particulada	Fração “TEP”	D
0	0	0	0
7	--	1,2 \pm 0,7	--
14	13,2 \pm 5,0	9,0 \pm 3,6	4,2
21	20,4 \pm 0,5	20,2 \pm 0,9	0,3
29	18,6 \pm 0,8	18,2 \pm 2,1	0,4
34	17,2 \pm 0,2	16,8 \pm 0,4	0,4

(B)

Tempo de Cultivo (dias)	Fração Particulada	Fração "TEP"	D
0	0,0	0,0	0,0
0	0,0	0,0	0,0
7	2,2 \pm 0,1	0,0	2,2
7	2,2 \pm 0,5	0,0	2,2
17	11,3 \pm 0,1	7,1 \pm 0,3	4,3
17	11,7 \pm 0,4	7,0 \pm 0,3	4,7
22	14,6 \pm 0,2	8,9 \pm 0,6	5,7
22	14,1 \pm 0,4	7,6 \pm 0,2	6,5
30	15,0 \pm 0,4	9,7 \pm 0,6	5,4
30	15,2 \pm 0,1	7,4 \pm 0,2	7,7
36	17,8 \pm 0,1	15,1 \pm 0,6	2,7
36	18,1 \pm 0,1	12,4 \pm 0,8	5,8
43	15,8 \pm 0,8	18,5 \pm 0,2	-2,7
43	17,0 \pm 0,4	18,5 \pm 0,1	-1,6

As figuras 11 e 12 apresentam, respectivamente, colônias de *M. aeruginosa* evidenciando sua matriz polissacarídica e a presença de TEP junto destas colônias. As figuras 13 e 14 apresentam os filamentos de *A. granulata*, respectivamente, no início e no final da fase exponencial.

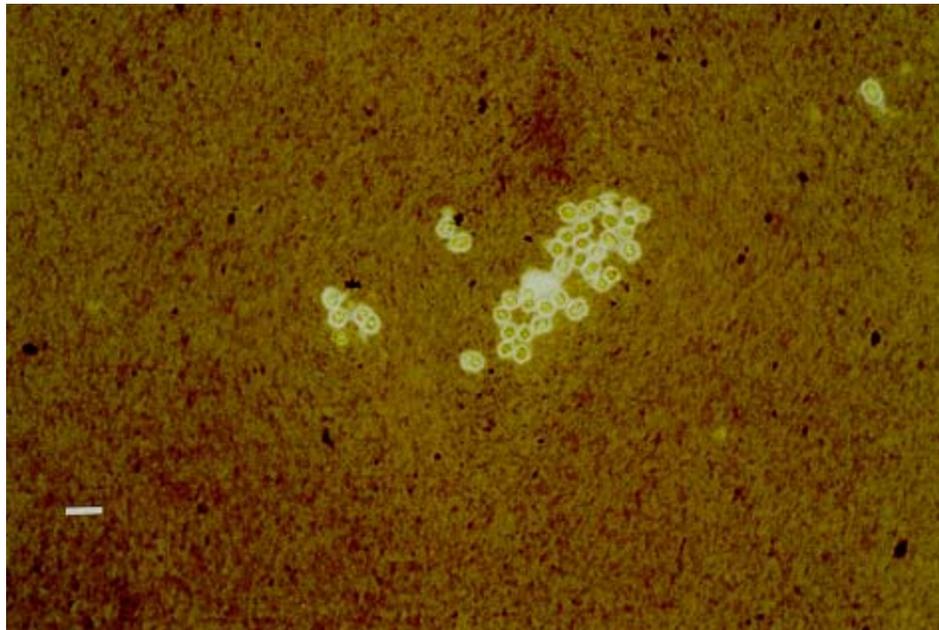


Figura 11. Colônia de *Microcystis aeruginosa* com envoltório polissacarídico evidenciado.

Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .

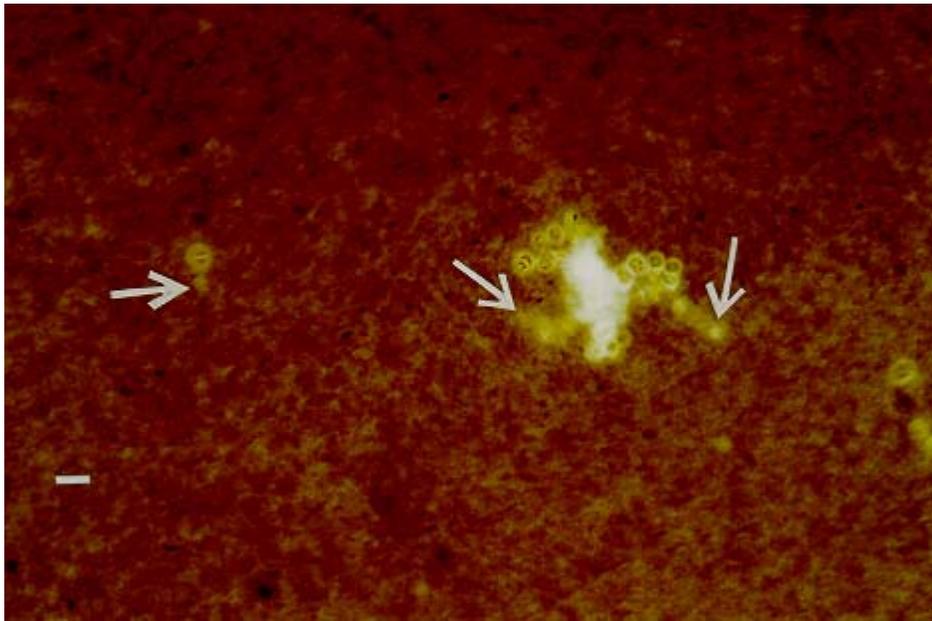


Figura 12. Células de *Microcystis aeruginosa* e TEP formadas na cultura (setas). Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .

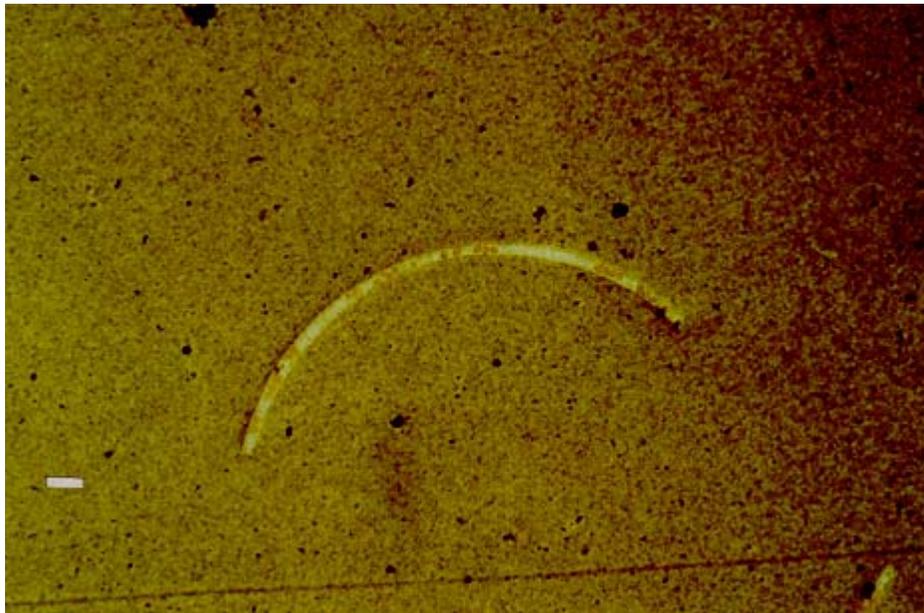


Figura 13. Vista pleural de filamento de *Aulacoseira granulata* sem envoltório polissacarídico, observado no início da fase exponencial do crescimento da cultura. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .



Figura 14. Vista pleural de filamento de *Aulacoseira granulata* com envoltório polissacarídico evidenciado, observado no final da fase exponencial do crescimento da cultura. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .

4.2.2 TEP quantificadas por conteúdo de carbono orgânico

As medidas de conteúdo de carbono orgânico da fração “TEP” foram consideradas como outra forma de quantificação destas partículas. Estas medidas indicaram que o conteúdo de carbono orgânico das TEP bióticas das culturas de *A. spiroides* foi crescente durante todo o tempo de cultivo, mesmo durante a fase estacionária, quando passou de 19 mgC L⁻¹ no início desta fase para 37 mgC L⁻¹ no final dela (aumento de 94 %) (figura 15). No entanto, quando as TEP foram quantificadas pelo método do *alcian blue*, sua concentração na fase estacionária se manteve estável e demonstrou uma pequena queda, passando de 20,2 eq xantana (mg L⁻¹) para 16,8 eq xantana (mg L⁻¹).

Para a outra cianofícea estudada, *M. aeruginosa*, as medidas de conteúdo de carbono orgânico de TEP também mostraram um aumento paralelo ao crescimento exponencial da cultura, como pode ser observado na figura 16. Para esta espécie, o aumento nas medidas de TEP por seu conteúdo de carbono orgânico foi acompanhado também pelas medidas feitas pelo método do *alcian blue*. Quantificadas por ambos os métodos, as medidas de concentração de TEP alcançaram seus valores máximos no final do cultivo, 21 mgC L⁻¹ e 18,5 eq de xantana (mg L⁻¹).

Para a espécie *A. granulata*, as concentrações de TEP, em conteúdo de carbono orgânico (figura 17), foram correspondentes ao crescimento em biomassa da cultura, aumentando durante a fase exponencial de crescimento, atingindo seu valor máximo de 3,0 mgC L⁻¹ e estabilizando-se em seguida em torno de 2,8 mgC L⁻¹. Esta correspondência com o crescimento é ainda mais clara quando as medidas de carbono orgânico celular são tomadas como parâmetro de crescimento. No entanto, como foi mencionado no tópico anterior, TEP não foram detectadas na cultura de *A. granulata* em amostras da fração “TEP” quando o método do *alcian blue* foi utilizado. A detecção só ocorreu quando a

fração particulada foi amostrada e apenas no início da fase de senescência. Nestas condições, as concentrações máximas de TEP foram de 3,5 eq de xantana (mg L^{-1}) e 1,9 eq de xantana (mg L^{-1}), respectivamente para as réplicas 1 e 2.

As pequenas discrepâncias entre os dois parâmetros de quantificação de TEP serão discutidas posteriormente.

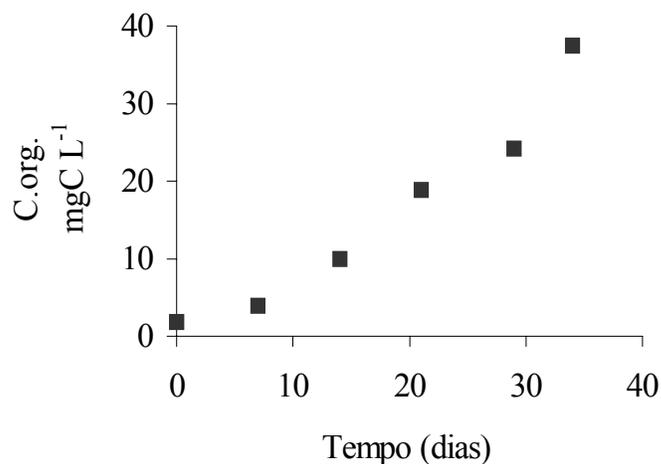


Figura 15. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L^{-1} , da fração “TEP” da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.

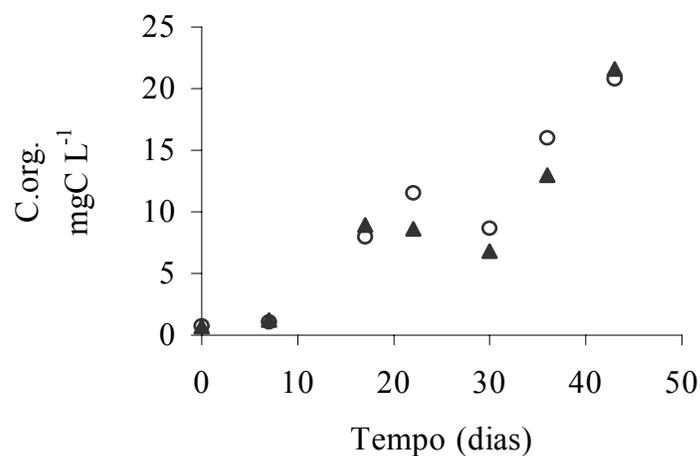


Figura 16. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L^{-1} , da fração “TEP” de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.

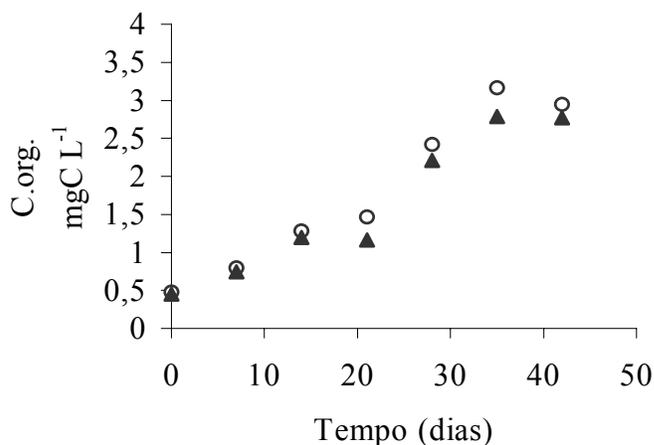


Figura 17. Média dos valores de conteúdo de carbono (C. org.), em mg L⁻¹, da fração “TEP” de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.

4.3 Processos de formação biótica de TEP por *A. spiroides*

As observações ao microscópio feitas para acompanhar e documentar os processos de formação biótica de TEP nas culturas de *A. spiroides* mostraram que há pelo menos dois processos bióticos de formação de TEP por esta espécie.

4.3.1 Fragmentação e liberação de partes do envoltório mucilaginoso

Este primeiro processo de formação de TEP consiste na fragmentação e liberação de partes do envoltório que recobre os tricomas. Tal processo tem como consequência a formação de TEP pequenas, já que a composição do envoltório é fundamentalmente a mesma descrita para as TEP, ou seja, consiste em polissacarídeos transparentes e gelatinosos. Pela figura 18, é possível observar que porções do envoltório dos filamentos vivos se soltam, ficando livres na forma de TEP pequenas, que se acumulam no meio de cultura. Este processo foi observado a partir do 7º dia de cultivo e continuou ocorrendo até o

final do experimento, tendo sido especialmente intenso durante a fase exponencial do crescimento da cultura. Pela figura 18 também é possível observar que a fase exponencial do cultivo é caracterizada por filamentos longos.

4.3.2 Morte celular

A partir do 21º dia do cultivo, foi possível observar o segundo processo de formação biótica de TEP identificado para esta espécie. A partir do final da fase exponencial do crescimento, células de filamentos inteiros estouraram, como consequência das condições finais do crescimento da cultura. Pela figura 19 é possível observar os vestígios celulares dentro do envoltório mucilaginoso logo após a morte das células. O processo de morte celular desta cianofíceia tem como consequência a formação de TEP maiores, que são os envoltórios vazios, sem as células, como mostrado na figura 20. Estas TEP maiores foram visíveis a partir do final da fase exponencial até o final do cultivo. Na figura 20 também é possível observar o acúmulo de pequenas TEP formadas pelo processo de fragmentação do envoltório mucilaginoso dos filamentos vivos durante a fase exponencial.

Embora as TEP originadas pela fragmentação e liberação de parte dos envoltórios de filamentos vivos fossem menores do que as TEP formadas após a morte celular, estas últimas não eram tão grandes quanto os filamentos vivos observados no início do cultivo. Suas dimensões estavam mais próximas daquelas encontradas para filamentos menores, característicos do final do cultivo (figura 21). TEP maiores, correspondentes aos filamentos grandes, característicos do início do cultivo, não foram observadas.

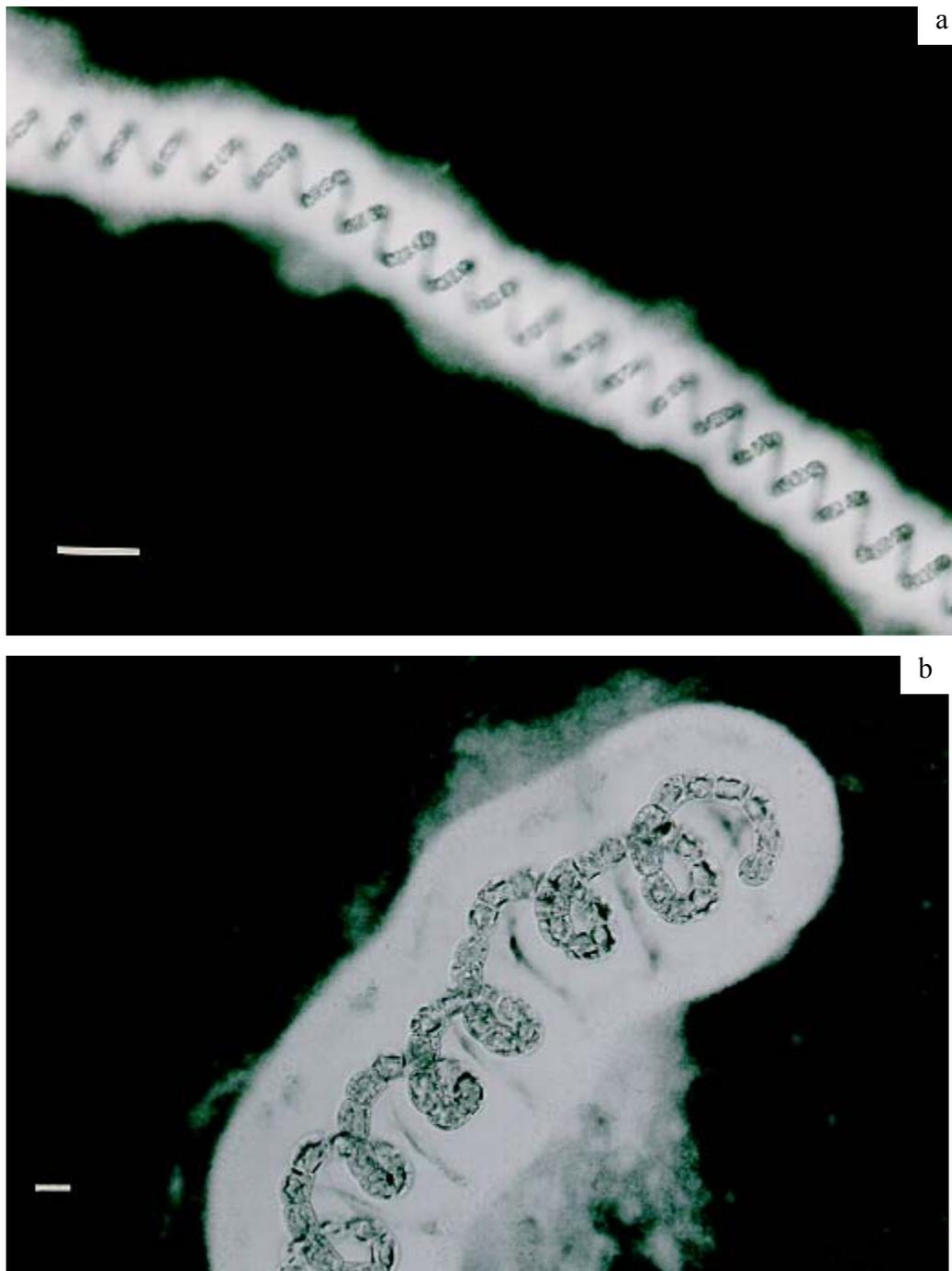


Figura 18. Filamento longos de *Anabaena spiroides*, característicos da fase exponencial do crescimento da cultura. (a) Porções do envoltório mucilaginoso sendo liberadas (aumento 200 x, barra de escala = 50 μm) e (b) pequenas TEP recém formadas começando a se acumular no meio de cultura (aumento 400 x, barra de escala = 10 μm). Coloração negativa obtida com tinta Nanquim.

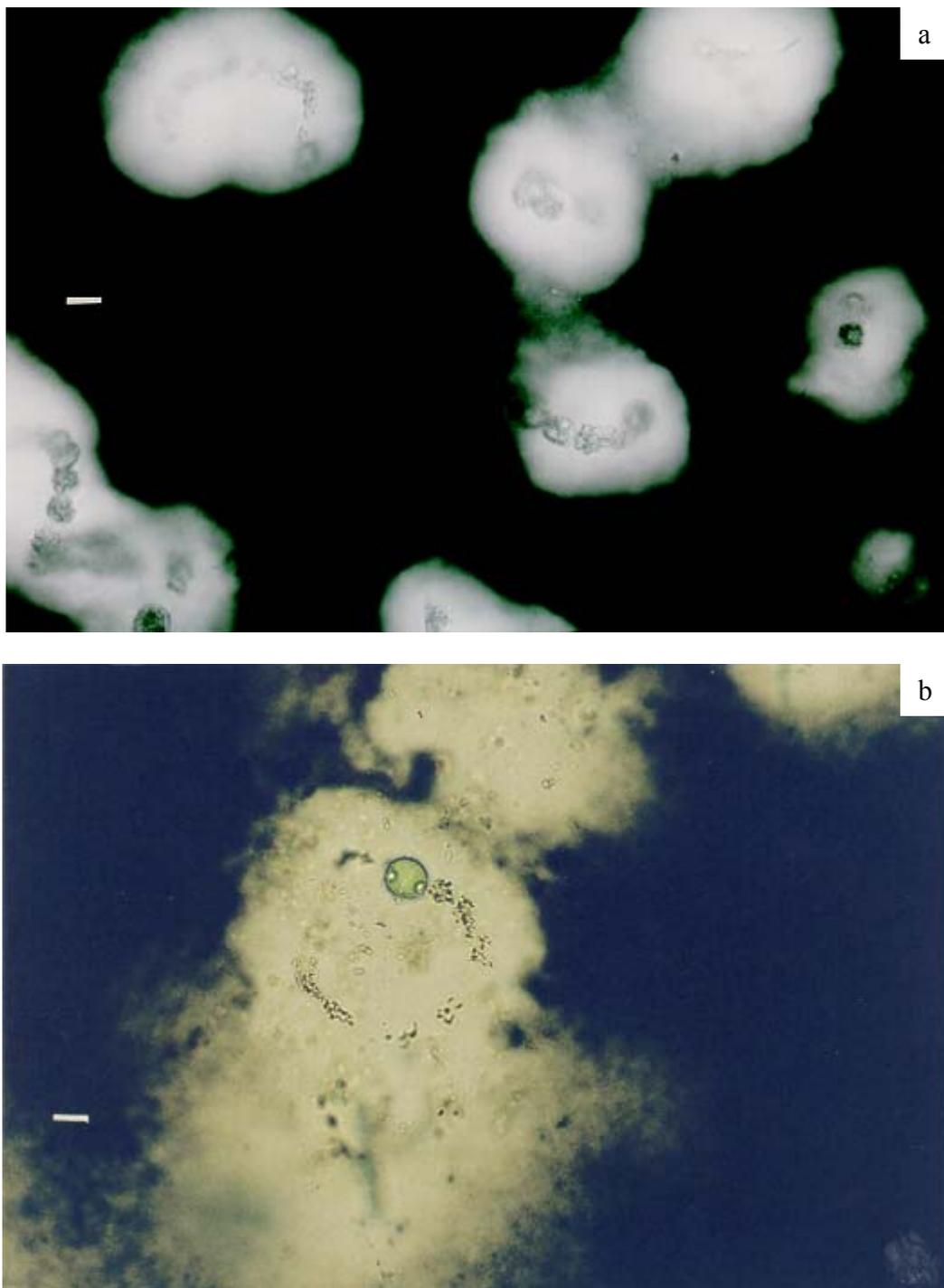


Figura 19. Morte das células de *Anabaena spiroides*. (a) Vestígios celulares dentro dos envoltórios mucilaginosos e (b) heterocisto ainda intacto após a morte das outras células do tricoma, cujos vestígios ainda são visíveis. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. Aumento 400 x, barra de escala = 10 µm.

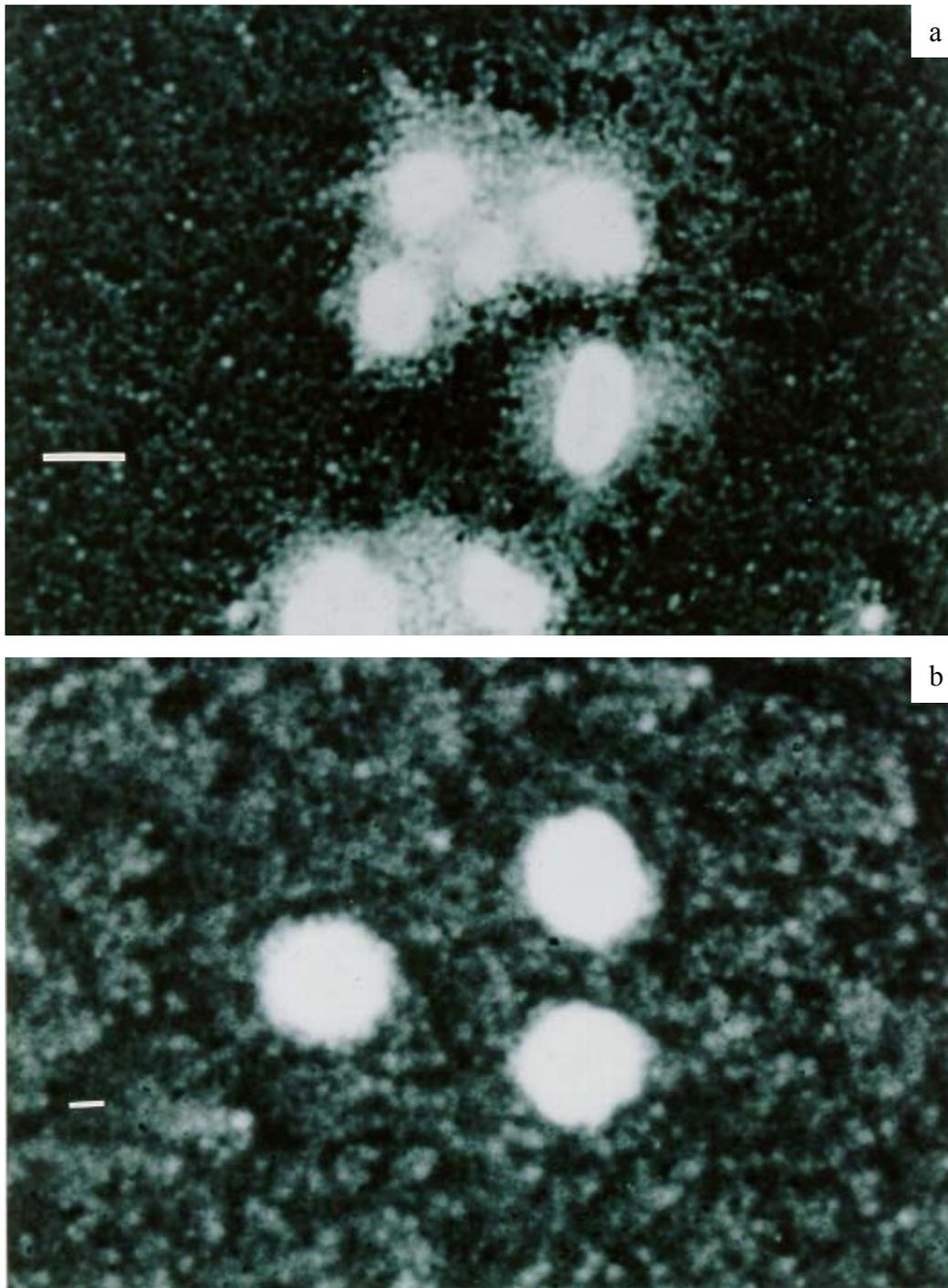


Figura 20. TEP correspondentes aos envoltórios mucilaginosos vazios de *Anabaena spiroides* formadas após a morte das células e acúmulo de pequenas TEP formadas por fragmentação destes envoltórios durante a fase exponencial. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. (a) Aumento 200 x, barra de escala = 50 μm e (b) aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .

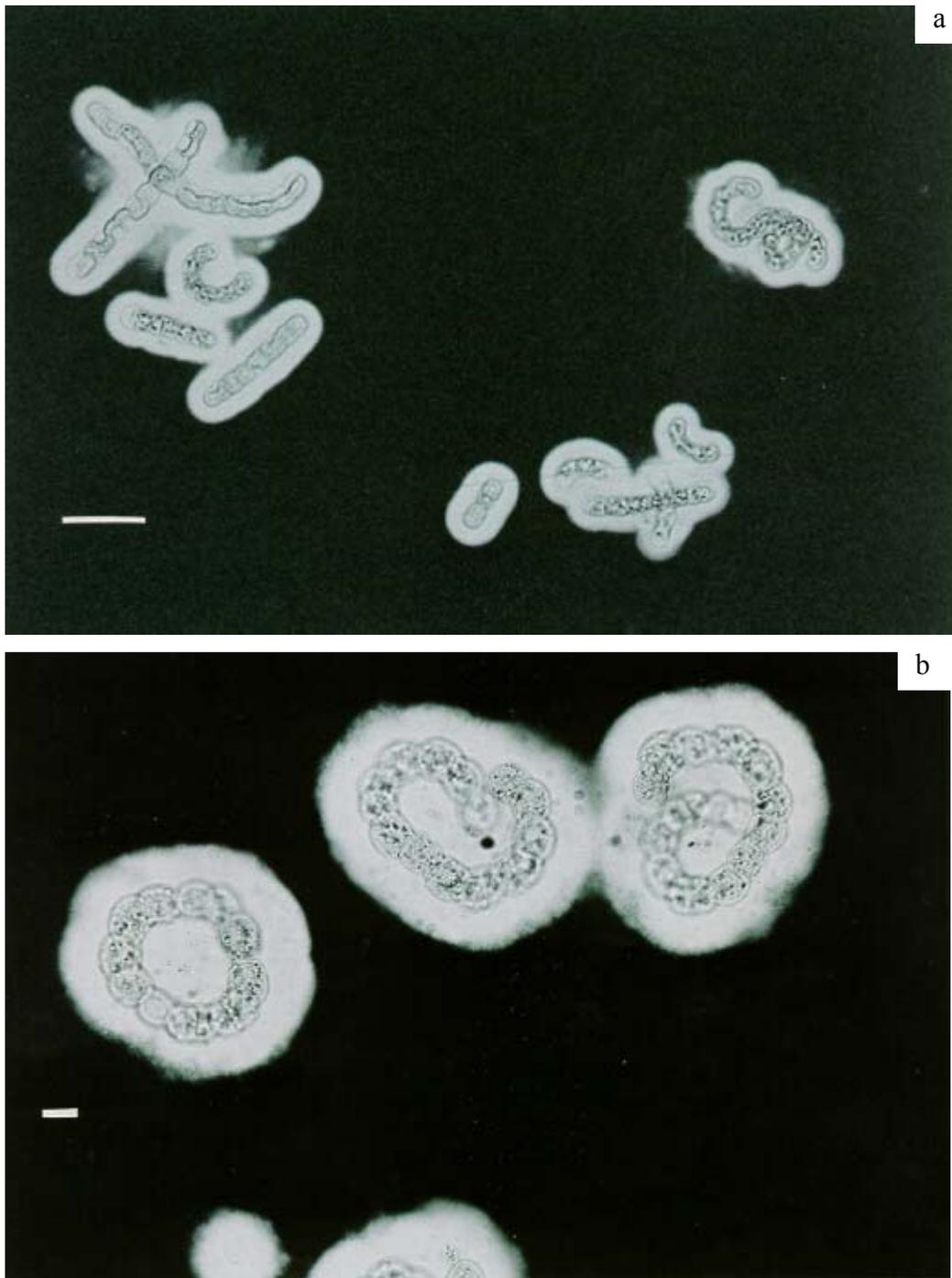


Figura 21. Filamentos curtos observados na fase estacionária do cultivo de *Anabaena spiroides*. Coloração negativa obtida com tinta Nanquim. (a) Aumento 200 x, barra de escala = 50 μm e (b) aumento 400 x, barra de escala = 10 μm .

4.4 Conteúdo de carbono orgânico das culturas e de suas frações

As concentrações de carbono orgânico líquido total da cultura de *A. spiroides* (figura 22a) aumentaram durante toda a fase exponencial e também durante a fase estacionária do crescimento, atingindo o valor máximo de 52 mgC L⁻¹. Para a espécie *M. aeruginosa*, as medidas de carbono orgânico total da cultura aumentaram progressivamente durante todo o cultivo (figura 23a) acompanhando o crescimento. Esta cultura mostrou valores bastante altos de carbono orgânico líquido total, com máximo de 175 mgC L⁻¹. A mesma correspondência com as fases do crescimento ocorreu para *A. granulata* (figura 24a), cujas medidas de carbono orgânico líquido total mostraram aumento progressivo seguido por estabilização. No entanto, o valor máximo de carbono orgânico líquido total para esta cultura, 12,8 mgC L⁻¹, foi bem inferior quanto comparado com as demais espécies.

4.4.1 Fração “TEP”

As medidas de carbono orgânico desta fração já foram apresentadas no item 4.2.2 e analisadas quanto a sua condição de parâmetro de quantificação de TEP, além de terem sido comparadas com o método do *alcian blue*.

As concentrações de carbono orgânico da fração “TEP” mostraram visível correspondência com o carbono orgânico líquido total das culturas ao longo do tempo de cultivo das três espécies. Na cultura de *A. spiroides*, esta foi a fração mais significativa, chegando a representar 72 % do carbono orgânico líquido total. Para *M. aeruginosa* e *A. granulata*, os valores máximos que esta fração representou foram 31 e 24 %, respectivamente (tabelas III, IV e V).

4.4.2 Fração “células”

As mudanças na concentração de carbono orgânico da fração “células” em função do tempo de cultivo mostraram boa correspondência com as medidas de clorofila *a* das culturas de *A. spiroides* (figura 22c), *M. aeruginosa* (figura 23c) e *A. granulata* (figura 24c). O conteúdo de carbono desta fração da cultura de *A. spiroides* chegou a 9,6 mgC L⁻¹, representando 38% do carbono orgânico líquido total no final da fase exponencial. Para os cultivos de *M. aeruginosa* e *A. granulata*, esta fração foi a mais significativa durante todo o período do experimento, chegando a atingir, respectivamente, 122 mgC L⁻¹ e 4,7 mgC L⁻¹, equivalente a 70 e 53 % do carbono orgânico líquido total da cultura, no final do crescimento exponencial dos cultivos (tabelas III, IV e V).

4.4.3 Fração “colóides”

As concentrações de carbono orgânico da fração “colóides”, onde estão presentes os polissacarídeos extracelulares livres (precursores das TEP na formação abiótica), também aumentaram com o crescimento das culturas atingindo valores máximos de 4,3 mgC L⁻¹, 8,4 mgC L⁻¹ e 2,5 mgC L⁻¹, respectivamente, no final dos cultivos de *A. spiroides* (figura 22d), *M. aeruginosa* (figura 23d) e *A. granulata* (figura 24d). No entanto, este aumento não mostrou corresponder de forma exatamente paralela às mudanças no carbono orgânico líquido total. Além disso, os valores percentuais que esta fração representou em relação ao carbono orgânico total das culturas diminuíram ao longo do tempo passando de 29 para 8,3 %, de 23,6 para 4,8% e de 47 para 19,5% nas culturas de *A. spiroides*, *M. aeruginosa* e *A. granulata*, respectivamente.

4.4.4 Fração “dissolvido real”

A concentração de carbono orgânico desta fração variou de forma mais próxima à variação da fração “colóides”, ou seja, aumentou ao longo do tempo de cultivo, atingindo

valores máximos de 14 mgC L^{-1} e $2,2 \text{ mgC L}^{-1}$, respectivamente, no final dos cultivos de *M. aeruginosa* (figura 23e) e *A. granulata* (figura 24e). O percentual em relação ao carbono orgânico líquido total que estas frações representaram também diminuiu durante o tempo de cultivo, passando de 22 para 8% na cultura de *M. aeruginosa* e de 29 para 19% no início da fase de senescência da cultura de *A. granulata*.

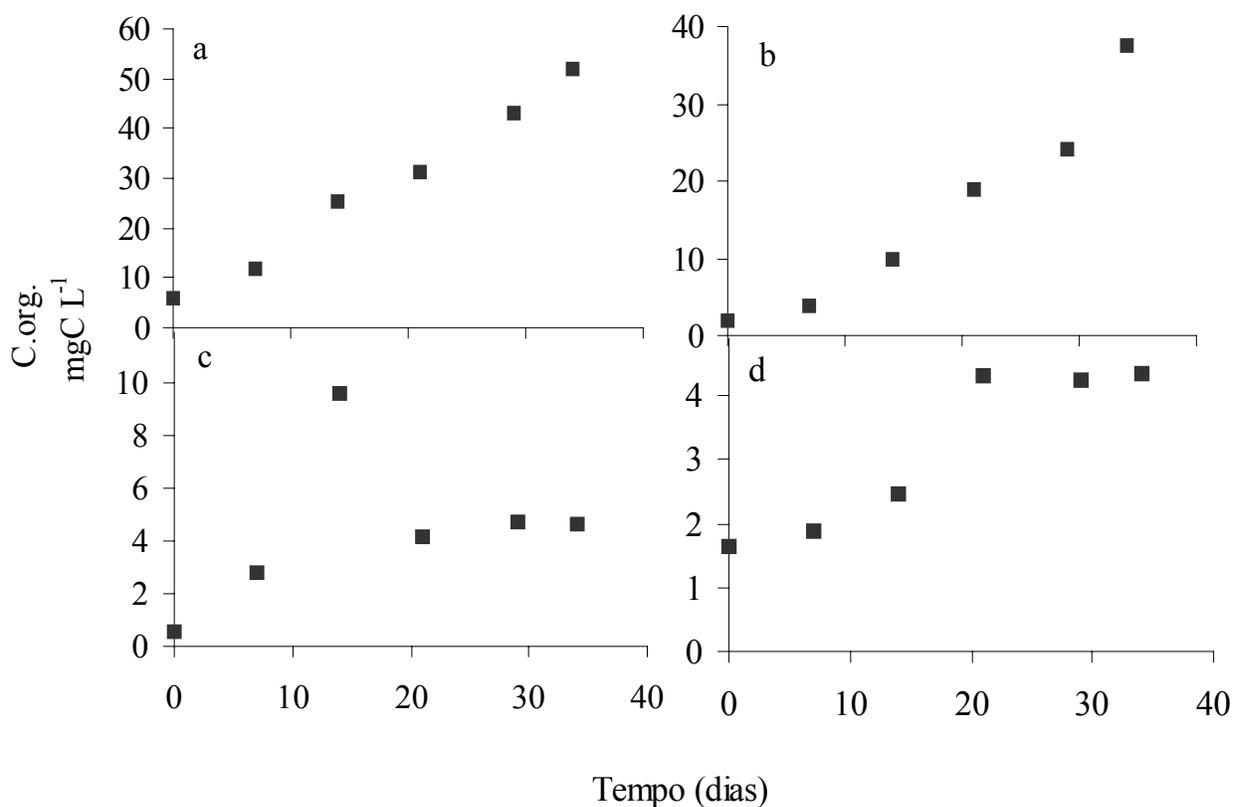


Figura 22. Médias dos valores, em mgC L^{-1} , de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c) e “colóides” (d) da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.

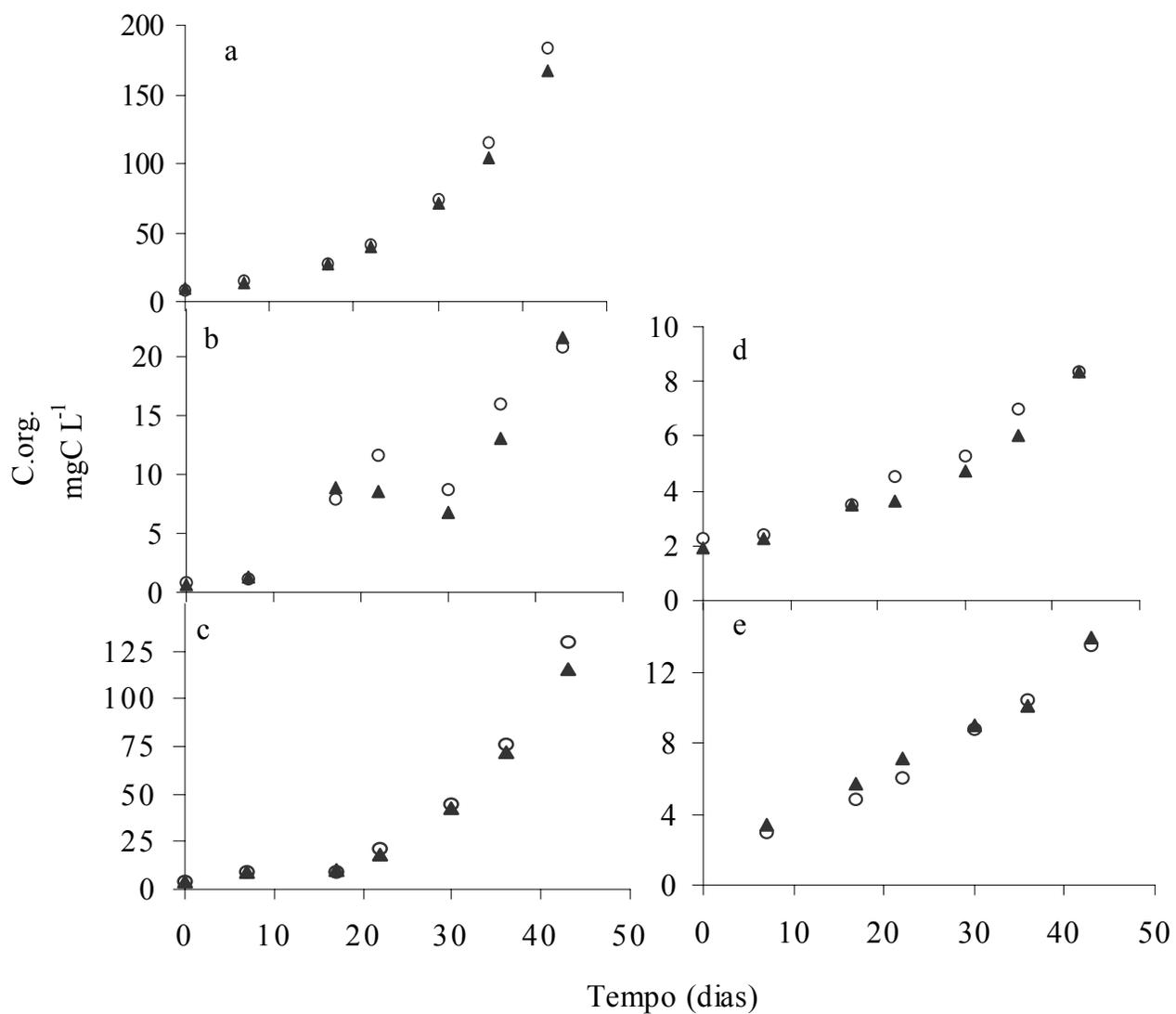


Figura 23. Valores, em mgC L⁻¹, de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c), “colóides” (d) e “dissolvido real” (e) de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.

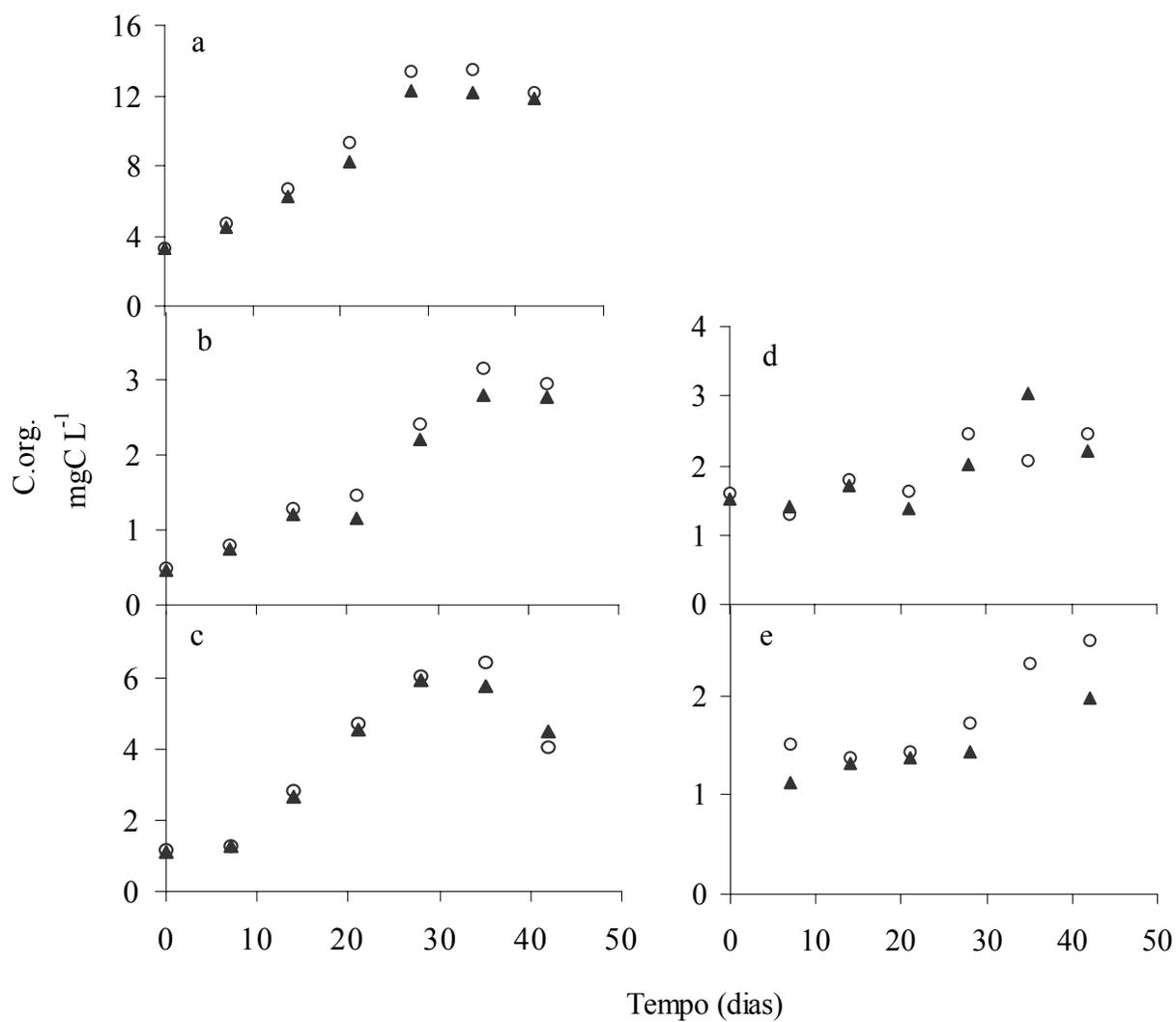


Figura 24. Valores, em mgC L⁻¹, de conteúdo de carbono orgânico líquido (C.org.) total (a) e das frações “TEP” (b), “células” (c), “colóides” (d) e “dissolvido real” (e) de cada réplica (○ R1 e ▲ R2) de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.

Tabela III. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total da cultura de *A. spiroides* em função do tempo de cultivo.

Dias	Total	Fração “TEP”	Fração “células”	Fração “colóides”
0	100	32,4	9,9	29,1
7	100	32,8	23,6	15,7
14	100	40,1	38,4	10,0
21	100	60,6	13,3	13,9
29	100	55,9	10,9	9,9
34	100	72,0	8,8	8,3

Tabela IV. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total de cada réplica de cultura de *M. aeruginosa* em função do tempo de cultivo.

Dias	Total	Fração “TEP”	Fração “células”	Fração “colóides”	Fração “dissolvido real”
0	100	8,6	48,9	26,0	-
0	100	7,7	45,8	21,1	-
7	100	6,9	58,6	15,8	19,1
7	100	9,0	68,4	16,9	24,7
17	100	29,3	34,3	12,9	17,7
17	100	32,0	34,6	12,4	20,4
22	100	27,7	51,2	10,9	14,4
22	100	21,4	45,4	9,0	17,9
30	100	11,7	59,6	7,1	11,8
30	100	9,6	59,5	6,7	12,8
36	100	14,0	66,5	6,1	9,1
36	100	12,5	69,1	5,8	9,7
43	100	11,3	70,3	4,6	7,4
43	100	13,0	69,2	5,0	8,4

Tabela V. Representação, em porcentagem (%), do conteúdo de carbono orgânico de cada fração em relação ao conteúdo de carbono orgânico líquido total de cada réplica de cultura de *A. granulata* em função do tempo de cultivo.

Dias	Total	Fração “TEP”	Fração “células”	Fração “colóides”	Fração “dissolvido real”
0	100	14,3	34,7	48,2	-
0	100	13,7	33,8	46,0	-
7	100	17,1	27,8	28,0	32,4
7	100	16,7	28,6	31,5	25,3
14	100	19,0	42,2	26,5	20,4
14	100	19,1	42,1	27,4	20,8
21	100	15,7	50,7	17,5	15,4
21	100	14,1	55,5	16,7	16,6
28	100	18,0	45,1	18,4	12,8
28	100	18,0	48,3	16,4	11,6
35	100	23,4	47,6	15,3	17,3
35	100	22,9	47,7	24,9	-
42	100	24,3	33,5	20,3	21,1
42	100	23,5	38,1	18,7	16,7

4.5 Produção abiótica de TEP em “Torre de Espuma”

O EPS coloidal das três espécies estudadas apresentou potencial de formação de TEP pelo processo abiótico de coagulação na superfície de bolhas de espuma. No entanto, a produção de TEP foi verificada apenas quando foi adicionado Extran[®] (0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) ao EPS antes do borbulhamento em Torre de Espuma. Não houve produção significativa de TEP por nenhuma das três espécies quando somente o EPS foi submetido ao borbulhamento. Estes resultados estão apresentados na tabela VI.

Tabela VI. Produção de TEP, em equivalentes de xantana (mg L^{-1}), a partir de polissacarídeos extracelulares (EPS) liberados pelas três espécies de microalgas estudadas, borbulhados em Torre de Espuma. (A) borbulhamento de EPS; (B) borbulhamento de EPS adicionado de Extran[®] ($0,25 \mu\text{L mL}^{-1}$); (C) controle – complexação entre Extran[®] e *alcian blue*.

Espécie	A	B	C
<i>A. spiroides</i>	0	3,1	0
<i>M. aeruginosa</i>	0	3,2	0
<i>A. granulata</i>	0	3,1	0

5. Discussão

5.1 Considerações sobre o método do *alcian blue*

As dificuldades de quantificação das TEP estão relacionadas à sua natureza particulada, sendo partículas operacionalmente descritas como maiores que $0,45 \mu\text{m}$ e que podem chegar a 1 mm em comprimento (Fatibello *et al* 2004). Estas dimensões tornam impossível separar por filtração as TEP das células do fitoplâncton e de outras partículas, pois seus tamanhos se sobrepõem. Os métodos atualmente disponíveis para quantificação das TEP estão baseados em uma forma de coloração seletiva destas partículas feita com um corante catiônico, o *alcian blue*. Embora a escolha deste corante (Hewes & Holm-Hansen 1983) esteja de acordo com o fato de a maior parte das TEP ser constituída por polissacarídeos ácidos (aniônicos), que contêm grupos reativos como carboxilas e sulfatos (Ramus 1977), a quantificação das TEP pode não ser completa se houver polissacarídeos neutros em sua composição. Entre os dois métodos conhecidos de quantificação de TEP, o protocolo descrito por Fatibello *et al* (2004) foi determinado como mais adequado para o

desenvolvimento deste trabalho. Esta escolha foi feita, não somente pelo fato deste método ter sido desenvolvido para quantificação de TEP em amostras de água doce, mas também por eliminar uma série de procedimentos existentes no método descrito por Passow e Alldredge (1995a) que aumentavam a probabilidade de erros sistemáticos, como pesagem de filtros e extração do corante por ácido sulfúrico 80 %. Embora livre destes erros por eliminar o extensivo tratamento preliminar das amostras, trata-se de um procedimento que também apresenta limitações, como a instabilidade inerente ao corante *alcian blue*, deficiência em não detectar polissacarídeos neutros, não separação entre células e TEP e limites de detecção não muito amplos. Considerando a tentativa de separar as TEP das células por centrifugação e as medidas de conteúdo de carbono das TEP, o presente trabalho também pode ser visto como contendo testes preliminares para o desenvolvimento de uma metodologia de quantificação de TEP baseada na concentração de carbono orgânico destas partículas. Esta metodologia seria mais precisa por isolar as TEP das células e de demais partículas, quantificar todos os tipos de polissacarídeos independentemente de sua carga e por apresentar limites de detecção bastante amplos. Apesar das dificuldades atuais de quantificação de TEP, conhecer a concentração destas partículas é de fundamental importância para determinar a relevância de suas funções. Portanto, a utilização do método determinado como mais adequado entre os disponíveis foi levada adiante neste trabalho, o que acabou por permitir a construção de alguns apontamentos que podem ser úteis para aplicações futuras do método.

O *alcian blue*, corante envolvido no método descrito por Fatibello *et al* (2004) para quantificação de TEP, forma pares iônicos com os radicais ácidos dos polissacarídeos presentes em partículas, que podem ser vivas ou não, e no EPS coloidal. Isto faz com que os envoltórios celulares polissacarídicos de células vivas também sejam corados pelo *alcian*

blue. Embora em ambientes naturais este fato seja insignificante em comparação com as concentrações de TEP (Passow & Alldredge 1994, Corzo *et al* 2000), o mesmo poderia não ocorrer em culturas de espécies que atinjam alta densidade celular e que tenham como característica marcante a existência de espessos envoltórios polissacarídicos. Neste trabalho, as centrifugações realizadas na fração particulada das culturas visaram a separação entre células e TEP a fim de verificar se os envoltórios das células vivas, que também complexam com o corante, estariam superestimando as medidas de TEP das culturas feitas na presença de células. Os resultados mostraram que apenas nas fases iniciais os envoltórios das células vivas interferem nas medidas de TEP feitas na fração particulada (células + TEP), indicando uma quantidade maior do que a concentração real de TEP. Esta influência é significativa nas fases iniciais por este ser um período do crescimento caracterizado por baixas quantidades de TEP. No entanto, as fases iniciais do crescimento são caracterizadas também por colônias maiores, menos resistentes à precipitação quando, conseqüentemente, a separação entre as células e as TEP por centrifugação é facilitada. Quando a cultura atinge as fases de maior produção de TEP, a presença dos envoltórios das células vivas e sua complexação com o *alcian blue* passa a ser pouco significativa em comparação com a concentração real de TEP.

Uma segunda consideração deve ser feita devido ao fato de, pelo método do *alcian blue*, a concentração de TEP ter se tornado estável na fase estacionária do crescimento de *A. spiroides* enquanto os valores de conteúdo de carbono destas partículas continuaram aumentando até o final do cultivo. Algumas características relacionadas aos limites do método do *alcian blue* poderiam explicar esta discrepância. A curva de calibração descrita por este método é feita com soluções de xantana em concentrações de 0 a 8 mg L⁻¹. Nesta faixa, quanto maior a concentração de xantana, maior será a formação de complexos

polissacarídeo-*alcian blue*. Quanto maior a formação destes complexos, menores serão a quantidade de corante que permanece dissolvido e os valores de absorbância da solução. No entanto, valores de absorbância de soluções de xantana em concentrações acima de 10 mg L⁻¹ passam a aumentar, ao invés de continuarem diminuindo ou de se tornarem constantes e próximos de zero devido à utilização de todo o corante disponível. Uma possível explicação para este fenômeno seria a ocorrência de um processo de agregação das moléculas de xantana, em concentrações superiores a este limite. A união entre as moléculas de xantana ocorreria de forma a “ocupar” o mesmo sítio de ligação com o qual o *alcian blue* formaria o par iônico com o polissacarídeo. Nestas condições, o número de moléculas de xantana com sítios de ligação disponíveis ao *alcian blue* seria menor e, conseqüentemente, a concentração do corante que permanece em solução aumentaria (comunicações pessoais de A. A. S. Curvelo e E. Frollini, Instituto de Química de São Carlos, USP). Conseqüentemente, é possível supor que em amostras com concentração de TEP acima do limite de 10 mg L⁻¹ (em equivalentes de xantana) a quantidade de TEP calculada com base em seus valores de absorbância seria menor do que a quantidade real de TEP, caso o processo de agregação realmente ocorra. Por meio da figura 25 é possível verificar que a concentração de TEP poderia estar aumentando durante a fase estacionária do crescimento de *A. spiroides*, como indicaram as medidas de conteúdo de carbono orgânico das TEP, porém este aumento não teria sido detectado pelo método do *alcian blue*.

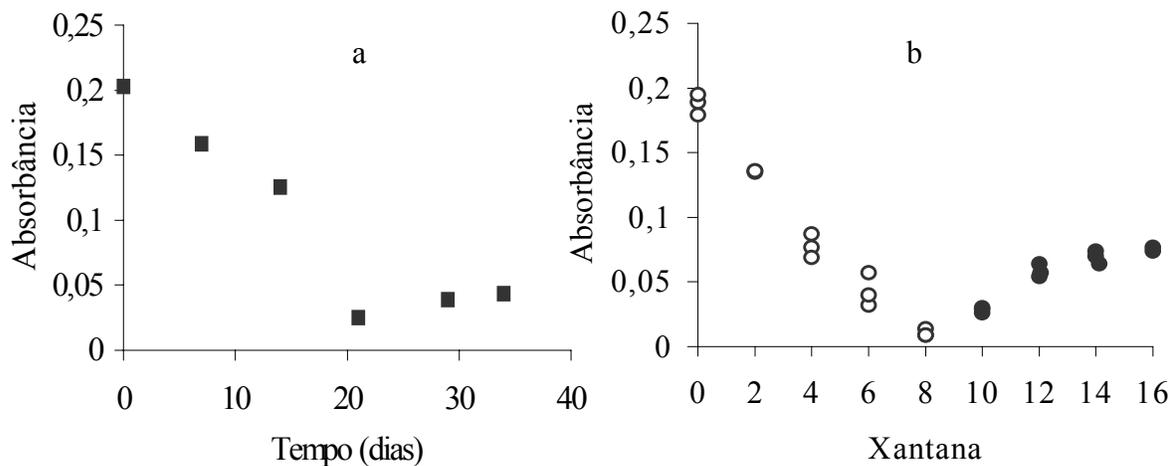


Figura 25. Valores de absorbância (em 602 nm) (a) das amostras de TEP produzidas durante o crescimento de *A. spiroides* (■) e (b) de soluções de xantana em concentrações iguais (○) e maiores (●) do que aquelas utilizadas na curva de calibração descrita pelo método do *alcian blue*, em mg L^{-1} .

Para *A. granulata*, as medidas de TEP feitas pelo método do *alcian blue* na fração “TEP”, indicaram ausência destas partículas. No entanto, medidas de conteúdo de carbono orgânico desta fração demonstraram existência de TEP, ainda que em concentrações muito baixas ($< 3,0 \text{ mgC L}^{-1}$). Considerando esta discrepância, sugerimos que, em concentrações muito baixas de TEP, os poucos complexos polissacarídeo-*alcian blue* formados seriam muito pequenos e, logo, muito resistentes à precipitação por centrifugação, o que explicaria o insucesso do método do *alcian blue* nestas condições.

5.2 Crescimento das culturas

A espécie *A. spiroides* em cultura forma filamentos helicoidais longos na fase exponencial do crescimento. Em seguida, na fase estacionária e de senescência, estes filamentos se “quebram” originando espiras isoladas e, posteriormente, as células “estouram” dentro dos envoltórios, deixando apenas vestígios. Embora a fase estacionária seja característica por diminuição na concentração de clorofila *a* por célula e por ausência de divisão celular devido à falta de nutrientes ou a outras condições características do final do cultivo (Fogg 1975), a fotossíntese ainda é funcional.

O crescimento exponencial tipicamente longo e lento de culturas do tipo *batch* da espécie *M. aeruginosa*, pode ser consequência da alta concentração de células, muito pequenas. A alta densidade celular levaria à ocorrência do efeito de auto-sombreamento, condição de limitação de luz ou “escuro virtual” em que se encontra a grande parte das células que está longe da superfície do frasco voltada para a fonte de luz (Fogg 1975).

A espécie *A. granulata* em cultura apresentou padrão de crescimento típico de diatomáceas em culturas do tipo *batch*: fase *lag* relativamente longa, seguida de acentuado crescimento exponencial e curta fase estacionária.

É importante levar em consideração que nem sempre as curvas de crescimento obtidas pela contagem das células coincidem com aquelas obtidas pelos valores de clorofila *a*. Por exemplo, a diminuição na concentração de clorofila *a* por célula na fase de senescência dos cultivos indica que a atividade celular está diminuindo ainda que o número de células continue constante. Levando em conta que o fitoplâncton é a principal fonte de formação biótica e abiótica de TEP (Passow & Alldredge 1994), a formação destas partículas está muito mais ligada à atividade fitoplanctônica do que ao número de células (Schuster & Herndl 1995). Por este motivo, medidas de concentração de clorofila *a* têm

sido um parâmetro freqüentemente utilizado quando investiga-se a produção de TEP em ambientes naturais (Jähmlich *et al* 1998, Passow 2000, Beauvais *et al* 2003).

5.3 Produção biótica de TEP

A produção biótica de TEP tem sido pouco documentada (Hong *et al* 1997, Corzo *et al* 2000) quando comparada à produção abiótica (Johnson & Cooke 1980, Johnson *et al* 1986, Chin *et al* 1998, Zhou *et al* 1998, Passow 2000) o que pode ser devido às dificuldades de cultivo das espécies propícias para as observações dos processos bióticos de formação destas partículas.

Os dois processos de formação biótica de TEP observados e documentados têm relação direta com o espesso envoltório mucilaginoso de *A. spiroides*. O processo de fragmentação e liberação de partes do envoltório dos filamentos vivos pode ser semelhante à contínua renovação dos componentes da cápsula de bactérias heterotróficas, talvez por alguns pontos da membrana celular perderem sua habilidade de fixar as fibrilas de polissacarídeos da cápsula, observada por Heissenberger *et al* (1996). As espécies de cianofíceas têm aparato fisiológico e função ecológica de organismo autótrofo, porém sua estrutura celular é muito parecida com a estrutura das bactérias heterotróficas, o que faz com que elas sejam conhecidas também como cianobactérias. Assim, a contínua renovação do espesso envoltório polissacarídico também parece ser uma característica de *A. spiroides*. Uma das conseqüências deste processo constante de renovação do envoltório é a formação e liberação de TEP pequenas, que se acumulam na água ou no meio de cultura circundantes.

A produção de TEP correspondente ao envoltório vazio após a morte celular, mostra que *A. spiroides* deve ser uma fonte importante de TEP em ambientes onde esteja presente em grandes quantidades, principalmente onde forma *blooms* periódicos, como no

reservatório de Barra Bonita. Embora as TEP formadas em consequência da morte celular sejam maiores do que aquelas resultantes de fragmentação do envoltório, não é possível afirmar que a elas se aplica a relação inversamente proporcional existente entre concentração de carbono e tamanho das TEP, descrita para TEP de natureza fractal formadas por processos abióticos em ambientes marinhos (Mari & Kjørboe 1996). No caso das partículas formadas pelos processos bióticos descritos neste trabalho, as TEP maiores são correspondentes aos envoltórios vazios inteiros de *A. spiroides* e não são formadas pela união de TEP menores.

Devido a estes dois processos de formação, as maiores concentrações de TEP foram encontradas durante a fase estacionária do crescimento de *A. spiroides* e, portanto, foram coincidentes com valores baixos de carbono orgânico celular e de clorofila *a*, relação freqüentemente observada em culturas (Waite *et al* 1995, Hong *et al* 1997). O acúmulo de pequenas TEP formadas por fragmentação do envoltório mucilaginoso durante a fase exponencial contribuiu com os valores altos de concentração de TEP encontrados na fase estacionária do cultivo desta espécie. No entanto, os baixos valores de carbono orgânico celular e de concentração de clorofila *a* nesta fase tornam evidente que a produção de TEP em culturas de *A. spiroides* está fortemente relacionada com a morte celular, que tem como consequência direta a formação de TEP, que são os envoltórios vazios. A relação entre morte celular e aumento na concentração de TEP, descrita neste trabalho, não é tão óbvia quanto poderia parecer. Os envoltórios poderiam se dissolver completamente, logo após a morte das células, não permanecendo na forma de TEP, como ocorre com os envoltórios de desmidiáceas filamentosas, como *Mougeotia* e *Spirogyra* (Vieira, A. A. H. comunicação pessoal). Nossos resultados mostram que os envoltórios vazios de *A. spiroides* permanecem como TEP por um período de tempo mínimo necessário para que, em ambientes naturais,

sejam colonizadas por bactérias, utilizadas como alimento ou envolvidas nos processos de formação dos agregados gelatinosos, destinos típicos de uma TEP. Em culturas da espécie *Ankistrodesmus densus* (Vieira & Myklestad 1986) também foi observado que os envoltórios das células permanecem insolúveis por longo período após a morte das células.

Somado ao que já foi discutido acerca dos limites de detecção do método do *alcian blue* no item 5.1, a discrepância entre as medidas de concentração de TEP feitas por seu conteúdo de carbono orgânico e pelo método do *alcian blue* na fase estacionária do crescimento de *A. spiroides* poderia ser explicada também pela presença de bactérias, que embora não tenham sido quantificadas, mostraram-se visíveis nesta fase do cultivo. As bactérias teriam sido retidas na fração particulada pela filtração em 0,45 µm e teriam permanecido na fração “TEP” após a centrifugação. Nesta fração no final do cultivo, a presença das bactérias unidas às TEP significaria uma quantia extra tanto de carbono orgânico como de polissacarídeo ácido proveniente de suas cápsulas, caso esta fosse sua composição.

Entretanto, uma explicação também plausível para o aumento constante da concentração de carbono orgânico da fração “TEP” da cultura de *A. spiroides* seria a ocorrência de fluxo de carbono orgânico da fração “células” para a fração “TEP”. Esta hipótese sugere que, após a morte das células parte do carbono orgânico celular produzido durante a fase exponencial, agora correspondente aos detritos celulares, teria se mantido na fração particulada durante a fase estacionária, porém em um compartimento não vivo, as TEP. Este fluxo de carbono entre as frações “células” e “TEP” foi observado também em culturas de *Chaetoceros gracilis* (Corzo *et al* 2000).

A produção de TEP por esta espécie foi alta quando comparada com as demais e considerável quantidade do carbono orgânico oriundo da produtividade primária líquida foi

desviada para a produção destas partículas. Este fluxo de carbono e as TEP individualizadas como compartimento não vivo da fração particulada não são normalmente considerados nas abordagens rotineiras de fluxo de carbono em ambientes aquáticos.

A espécie *M. aeruginosa* também produziu grandes quantidades de TEP por processos bióticos. Como a cultura não apresentou fase estacionária e de senescência, não foi possível sugerir a morte das células como processo biótico de produção de TEP. Houve, no entanto, uma correspondência entre o crescimento exponencial em biomassa, medida em concentração de clorofila *a*, e o aumento também exponencial da quantidade de TEP produzidas por processo biótico na cultura de *M. aeruginosa*. Isto pode significar que parte da mucilagem produzida pelas células tenha se desprendido das colônias, formado TEP. As colônias de *M. aeruginosa* em cultura são menores e menos coesas do que aquelas encontradas na natureza e são desfeitas facilmente pela aeração ou agitação do frasco. Esta agitação, além de separar as células entre si, pode também tê-las separado de sua mucilagem, que ficaria na forma de TEP (figura 12). Hong *et al* (1997) observaram que em um *bloom* dominado por *Phaeocystis antarctica*, o “descarte” e a desintegração da matriz da colônia é uma importante fonte de TEP, observação feita também por Passow & Wassmann (1994). Nas culturas de *M. aeruginosa*, as medidas de conteúdo de carbono orgânico das TEP acompanharam as quantificações destas partículas feitas pelo método do *alcian blue*.

Para a espécie *A. granulata*, a produção biótica de TEP foi menor do que nas outras espécies, embora inúmeros trabalhos descrevam as diatomáceas como produtoras de grandes quantidades destas partículas em oceanos (Kjørboe & Hansen 1993, Passow & Alldredge 1994, Passow *et al* 1994, Passow & Alldredge 1995b, Waite *et al* 1995, Grossart *et al* 1997, Mari & Burd 1998). Na cultura de *A. granulata*, pelo método do *alcian blue*, a

produção de TEP foi detectada apenas na fração particulada (células + TEP). Isto significa que as TEP que reagiram com o corante estavam de alguma forma aderidas aos filamentos, e não livres no meio de cultura. Pode-se dizer, portanto, que em nossas culturas de *A. granulata*, a produção de TEP está fortemente relacionada ao filme polissacarídico que recobre as células e que a liberação destas partículas para o meio de cultura ocorre em baixas quantidades. A presença de um fino filme polissacarídico que recobre as células de *A. granulata* externamente foi observada também em outras espécies de diatomáceas como *Skeletonema costatum*. Trata-se de um envoltório cuja produção pelas células tem início durante a fase exponencial do crescimento das culturas (Kiørboe & Hansen 1993) devendo ser, portanto, mais espesso no final desta fase. De fato, Waite *et al* (1995), por meio de um método de quantificação destes filmes aderidos às células, observaram que a quantidade de polissacarídeo é maior quando a taxa de crescimento começa a declinar, ou seja, no final da fase exponencial, que corresponde à maior concentração de clorofila *a* medida na cultura. A maior quantidade de filme polissacarídeo envolvendo os filamentos de *A. granulata* no final da fase exponencial do crescimento em comparação com o início da fase exponencial também foi evidenciada neste trabalho (figuras 13 e 14). Passow *et al* (1994) e Passow & Alldredge (1995b) verificaram que concentrações máximas de clorofila *a* precedem altas concentrações de TEP em *blooms* de diatomáceas em ambientes naturais. Esta observação está de acordo com nossos resultados já que foram encontradas TEP apenas no final da fase exponencial do crescimento, logo após o rendimento máximo de biomassa medido por clorofila *a*. A ausência de TEP na fração particulada nas fases iniciais do crescimento exponencial de *A. granulata* indicada pelo método do *alcian blue* pode ser justificada pelas altas concentrações de nitrato e outros nutrientes no meio de cultura e pelas condições ótimas para a citocinese, características destas fases que teriam como consequência a menor

produção do filme externo à célula (Waite *et al* 1995). Estas condições podem ser comparadas ao início da formação de um *bloom* dominado por diatomáceas, que é caracterizado também por ótimas concentrações de nitrato e outros nutrientes e pela ausência de TEP (Passow *et al* 2001). O filme polissacarídico que reagiu com *alcian blue* não está rigorosamente de acordo com a definição de TEP adotada neste trabalho por se tratar de um envoltório de células e filamentos vivos. No entanto, é válido considerar que mesmo após a morte das células de *A. granulata* o filme de polissacarídeo continuaria unido às frústulas de sílica já que estas não se dissolvem ou desaparecem como ocorre com a membrana celular das cianofíceas estudadas. Além disso, a presença deste filme polissacarídico é de fundamental importância para a alta aderência (*stickness*) das células de *A. granulata* (Smetacek 1985, Alldredge & Gotschalk 1989, Riebesell 1991). A alta aderência torna maior a probabilidade de duas células de *A. granulata* (uma célula e uma TEP ou outra partícula qualquer) que se chocam pela agitação do meio continuarem unidas. Isto pode levar à formação de um agregado gelatinoso caso outras partículas, vivas ou mortas, juntem-se a elas (Waite *et al* 1995, Ortolano em prep.). Talvez esta seja uma das razões pelas quais as diatomáceas estão quase sempre presentes nos agregados gelatinosos, em grandes quantidades quando comparadas com sua abundância relativa na água circundante (Fanuko *et al* 1989, Revelante & Gilmartin 1991, Riebesell *et al* 1991, Dellamano-Oliveira *et al* em prep.).

De modo geral, a produção biótica de TEP aumenta conforme aumentam as concentrações de clorofila *a* durante a fase exponencial do crescimento das culturas. Concentrações de clorofila *a* crescentes podem significar que as colônias estão aumentando e que, conseqüentemente, seus envoltórios polissacarídicos estão sendo constantemente produzidos e liberados. A correlação positiva observada entre concentrações de TEP e de

clorofila *a*, ou entre produção biótica de TEP e crescimento exponencial da cultura, pode ser explicada pelo fato de que as TEP, quando formadas pelo processo de fragmentação dos envoltórios, estão próximas temporalmente de sua fonte (Beauvais *et al* 2003) – por exemplo, os filamentos vivos de *A. spiroides* – e terão sua concentração aumentada, quanto maior for a concentração de colônias que estejam sofrendo o processo de fragmentação. Correlação positiva entre o número de TEP pequenas (< 2 µm) e concentração de clorofila *a* também já foi observada *in situ* por Beauvais *et al* (2003). Com o avanço da fase de senescência, a produção de TEP por fragmentação dos envoltórios de filamentos vivos será menos intensa, mas sua concentração manter-se-á alta devido ao resultante acúmulo destas partículas no meio circundante.

Por outro lado, na fase de senescência de cultivos de espécies que possuem espessos envoltórios polissacarídicos, a diminuição na concentração de nutrientes disponíveis e a queda considerável na concentração de clorofila *a* podem significar que pelo menos parte das células já tenha morrido. Neste caso, baixas concentrações de clorofila *a* estão relacionadas a altas concentrações de TEP produzidas pelo processo biótico de morte celular. Engel *et al* (2002) também verificaram um grande fluxo de carbono para a fração “TEP” e elevação da taxa C:N particulado após depleção de nitrato. Devido a este processo, portanto, a relação entre clorofila *a* e produção de TEP durante a fase de senescência passa a ser inversamente proporcional.

5.4 Balanço do conteúdo de carbono orgânico entre as frações da cultura

A concentração de carbono orgânico celular mostrou variações que acompanharam as concentrações de clorofila *a* das três espécies, o que nos levou a utilizar este parâmetro como uma forma alternativa de determinar o crescimento das culturas e representar suas fases, compensando, em parte, a ausência dos dados relativos ao número de células em

função do tempo dos cultivos. Nas culturas de *M. aeruginosa* e *A. granulata* a fração “células” foi a mais significativa em termos de concentração de carbono orgânico em relação ao carbono orgânico total oriundo da produção primária líquida. Sabendo-se que o meio de cultura e as condições laboratoriais são as mais propícias para o crescimento das culturas, é esperado que haja uma alta taxa de divisão celular e que a biomassa celular atinja valores altos.

Por outro lado, para a espécie *A. spiroides*, a quantidade de carbono orgânico líquido desviada para a produção de TEP foi muito maior do que aquela desviada para qualquer outra fração, inclusive a fração “células”, mesmo na fase exponencial do crescimento. Este fato é explicado pela existência do espesso envoltório mucilaginoso que recobre os filamentos e por sua contínua renovação. Em experimentos realizados no Mar Mediterrâneo por Beauvais *et al* (2003), a concentração de carbono orgânico das TEP também mostrou ser maior do que a concentração de carbono orgânico das células durante quase o ano todo.

A porcentagem de carbono orgânico oriundo da produção primária líquida realizada pelas microalgas que foi desviada para a produção de TEP foi considerada alta para as três espécies. Estes valores mostram que a produção de TEP por processos bióticos pode ser mais importante que a produção abiótica (Passow 2000) em ambientes de água doce.

No que se refere às concentrações de carbono orgânico das frações “colóides e “dissolvido real” o aumento nos valores absolutos está de acordo com o conhecido aumento na excreção de produtos ricos em carbono descrito em muitos trabalhos (Myklestad & Haug 1972, Fogg 1975, Vieira & Myklestad 1986). Na fração “colóides”, embora a porcentagem de polissacarídeos seja tipicamente alta para várias espécies de algas (Vieira & Myklestad 1986), podem existir outros compostos excretados e/ou liberados por morte

das células como proteínas, lipídios, enzimas, DNA, RNA, entre outros (Fogg 1975) que não estão quantificados separadamente neste trabalho.

5.5 Produção abiótica de TEP

O fitoplâncton excreta uma grande quantidade e diversidade de compostos (Decho 1990) que podem variar dependendo do estado fisiológico das células (Nalwajko & Lean 1972, Hellebust 1974). Sabe-se que os polissacarídeos podem representar mais de 87 % do carboidrato total excretado na fase estacionária das culturas de microalgas (Guillard & Wangersky 1958, Vieira & Myklestad 1986). As TEP produzidas por fatores abióticos têm como precursores os polissacarídeos coloidais liberados diretamente para o meio principalmente pelo fitoplâncton (Alldredge *et al* 1993). A concentração destes polissacarídeos aumenta em função do crescimento exponencial da cultura até a fase estacionária. Nesta fase, que é caracterizada pela diminuição dos nutrientes disponíveis, principalmente fosfato e nitrato, a divisão celular fica interrompida mas a fotossíntese continua ativa. Nestas condições, o fluxo de carbono fixado na fotossíntese desviado da síntese de proteínas (mais intensa nas fases de crescimento ativo) para a síntese de carboidrato (Fogg 1975) e a conseqüente diminuição na razão proteína:carboidrato no final do cultivo (Myklestad 1995) fazem com que os produtos da síntese celular passem a ser compostos ricos em carbono e pobres em nitrogênio e fósforo, como são os polissacarídeos (Vieira & Myklestad 1986) precursores das TEP. Sendo assim, no caso da produção abiótica de TEP, o aumento progressivo das concentrações de clorofila *a* (ou seja, alta atividade fotossintética) e a diminuição das concentrações de nutrientes podem indicar que a produção e liberação dos polissacarídicos coloidais precursores das TEP também estejam aumentando progressivamente. Com o avanço da fase de senescência da cultura, concentrações muito baixas de clorofila *a* por célula significarão queda na atividade celular

e na produção dos precursores das TEP, conseqüentemente. No caso da produção abiótica de TEP, portanto, há uma relação direta entre concentrações de clorofila *a* e liberação dos precursores das TEP e, conseqüentemente, produção de TEP, quando as condições abióticas forem adequadas.

O destino dos compostos excretados pelo fitoplâncton tem sido o cerne de muitos estudos (Wood & Van Valen 1990, Hoagland *et al* 1993) mas a forma com que se distribuem entre as frações particulada e dissolvida ainda é pouco entendida (Waite *et al* 1995). O fato de ter havido produção de TEP por processos abióticos a partir do EPS coloidal apenas quando o detergente neutro Extran[®] foi adicionado à “Torre de Espuma” demonstra que as três espécies produzem e liberam polissacarídeos coloidais com potencial de formação de TEP. Porém indica também que esta formação ocorrerá apenas em condições abióticas específicas. Como observado por Johnson *et al* (1986), bolhas grandes, tipicamente formadas durante a quebra das ondas no mar, são mais efetivas do que as pequenas na produção de TEP por coagulação. As TEP se formam pela coagulação do EPS que envolve as bolhas, após o colapso destas (Zhou *et al* 1998). A adição de Extran[®] ao EPS resultou em bolhas e em produção de espuma muito maiores do que aquelas formadas quando apenas o EPS foi borbulhado. Desta forma, podemos concluir que tanto em ambientes marinhos como em ambientes de água doce, a presença de espuma em quantidades relativamente grandes é um dos fatores de fundamental importância para o processo abiótico de formação de TEP por coagulação do EPS.

Estes resultados mostram que a ocorrência de transformações abióticas do *pool* de matéria orgânica dissolvida para o *pool* particulado ocorrem não somente nos oceanos (Allredge *et al* 1993) mas também podem ocorrer em ambientes de água doce. A conversão abiótica de EPS, produzido pelo fitoplâncton, em TEP pode contribuir para o

entendimento do balanço entre os *pools* de matéria orgânica dissolvida e particulada (Kepkay *et al* 1990). Esta conversão mostra também que a transformação da matéria orgânica dissolvida em particulada realizada por bactérias não seria a única forma de transformação entre estes dois *pools* e que o papel das bactérias nesta função, no oceano, talvez não seja tão importante como se acreditava (Kepkay & Wells 1992, Wells & Goldberg 1993). A excreção de EPS por microalgas e a conversão da matéria orgânica dissolvida em particulada via produção de TEP podem representar uma importante rota que está ausente nos modelos atuais de balanço de carbono no oceano (Passow *et al* 1994) e em ambientes de água doce.

O ambiente marinho, para o qual a “Torre de Espuma” foi criada, apresenta quantidades muito maiores de espuma, devido às características da água do mar e à constante quebra das ondas, do que os ambientes de água doce em condições normais. Porém, também nos ambientes de água doce, a conversão abiótica de matéria orgânica dissolvida em particulada pode ser significativamente incrementada se houver condições físicas que aumentem os processos de coagulação, como a formação de espuma (Leppard *et al* 1990, Leppard 1992) gerada pelo lançamento de resíduos detergentes em rios, lagos e reservatórios. Nestas condições abióticas, o EPS excretado pelas microalgas passaria, a uma alta proporção, da fração dissolvida para a fração particulada, na forma de TEP. Não foi encontrada na literatura nenhuma referência acerca da produção abiótica de TEP por coagulação na superfície de bolhas em ambientes de água doce. Também não é possível determinar em quais dimensões os resultados obtidos para as culturas apresentados neste trabalho podem ser extrapolados para ambientes naturais. Embora, coincidentemente, as três espécies estudadas neste trabalho não se caracterizem como produtoras de grandes

quantidades de EPS coloidal livre, podemos afirmar que o EPS excretado por elas possui potencial de formação de TEP, formação que ocorrerá em condições abióticas propícias.

O processo abiótico de transformação entre os *pools* dissolvido e particulado pode ser uma importante consequência da poluição química de ecossistemas aquáticos. Um exemplo da ocorrência de condições que favorecem a transformação abiótica de matéria orgânica dissolvida em particulada em ambientes naturais de água doce foi a grande quantidade de espuma formada no trecho em que o rio Tietê atravessa a cidade de Pirapora do Bom Jesus, localizada a 54 Km da capital São Paulo, devido ao lançamento excessivo de detergentes, em maio de 2003 (figuras 26 e 27).



Figura 26. Grande quantidade de espuma formada no rio Tietê invadindo a ponte “Arcílio C. da Cruz” na cidade de Pirapora do Bom Jesus (SP). Fonte: www.webcentral.com.br.



Figura 27. Espuma formada no rio Tietê devido à poluição. (a) Acúmulo no trecho em que o rio atravessa a cidade de Pirapora do Bom Jesus (SP) e (b) visível em uma grande extensão do rio. Fonte: www.webcentral.com.br.

6. Conclusões

As cianofíceas *Anabaena spiroides* e *Microcystis aeruginosa* em cultura produzem e liberam grandes quantidades de TEP, enquanto a produção de TEP pela diatomácea *Aulacoseira granulata* em cultura está relacionada principalmente ao filme polissacarídico que se mantém unido à frústula das células. As três espécies estudadas devem produzir grandes quantidades de TEP por processos bióticos no reservatório de Barra Bonita, de onde foram isoladas, por formarem *blooms* periódicos e por serem responsáveis pela maior parte da biomassa fitoplanctônica do reservatório. A produção biótica de TEP por estas três espécies é mais significativa do que a produção abiótica.

Os dois processos bióticos de formação de TEP pela espécie *A. spiroides* que foram identificados mostraram que as TEP são provenientes do envoltório polissacarídico que recobre os filamentos, sugerindo que outras espécies com espessas cápsulas ou bainhas polissacarídicas também produzam TEP em grandes quantidades.

Quantidades significativas do carbono orgânico proveniente da produção primária líquida são destinadas à produção de TEP pelas três espécies estudadas, rota que normalmente não é considerada nas abordagens de fluxo de carbono em ambientes aquáticos de água doce.

Os polissacarídeos coloidais excretados pelas três espécies apresentam o potencial de formação abiótica de TEP pelo processo de coagulação na superfície de bolhas de espuma. A produção abiótica de TEP a partir do polissacarídeo excretado é incrementada em ambientes de água doce onde venha a ocorrer formação de grandes quantidades de espuma.

7. Referências Bibliográficas

ALLDREDGE AL & GOTSCHALK CC 1989. Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep-Sea Research*. 36:159-171.

ALLDREDGE AL, PASSOW U & LOGAN BE 1993. The abundance and significance of a class of large, transparent organic particles in the ocean. *Deep-Sea Research I*. 40(6):1131-1140.

BEAUVAIS S, PEDROTTI ML, VILLA E & LEMMÉ R. 2003 Transparent exopolymer particle (TEP) dynamics in relation to trophic and hydrological conditions in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 162:97-109.

BOURRELLY P 1968. Les algues d'eau douce. Tome II: Algues jaunes et brunes. N. Boubée & Cie, Paris. 438p.

CHIN WC, ORELLANA MV & VERDUGO P 1998. Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature*. 391:568-572.

COOPER TG 1977. The tools of biochemistry. Wiley-interscience Publications. University of Pittsburgh, USA. 423p.

CORZO A, MORILLO, JA & RODRIGUEZ, S 2000. Production of transparent exopolymer particles (TEP) in cultures of *Chaetoceros calcitrans* under nitrogen limitation. *Aquatic Microbial Ecology*. 13:63-72.

DECHO AW 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. 28:73-153.

DECHO AW & MORIARTY DJW 1990. Bacterial exopolymer utilization by a harpacticoid copepod: a methodology and results. *Limnology and Oceanography*. 35:1039-1049.

DELLAMANO-OLIVEIRA MJ, VIEIRA AAH, ORTOLANO PIC & FATIBELLO SHSA (em preparação). Ocorrência e composição dos agregados gelatinosos em um reservatório eutrofizado do rio Tietê (título provisório).

ENGEL A 2002. Direct relationship between CO₂ uptake and transparent exopolymeric particles production in natural phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 24:49-53.

ENGEL A, GOLDTHWAIT S, PASSOW U & ALLDREDGE AL 2002. Temporal decoupling of carbon and nitrogen dynamics in a mesocosm diatom bloom. *Limnology and Oceanography*. 47:753-761.

FANUKO N, RODE J & DRÀSLAR K 1989. Microflora from the Adriatic mucus aggregations. *Vestnik Leningradskogo Universiteta*. 37:27-34.

FATIBELLO SHSA, VIEIRA AAH & FATIBELLO O 2004. A rapid spectrophotometric method for the determination of transparent exopolymer particles (TEP) in fresh-water. *Talanta*. 62(1):81-85.

FOGG GE 1975. Algae cultures and phytoplankton ecology. 175p. Wisconsin, USA.

FOWLER SW & KNAUER GA 1986. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. *Progress in Oceanography*. 16:147-194.

GORHAM PR, MCLACHLAN J, HAMMER UT & KIM WK 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flosaquae* (Lingb.). *Mitteilungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie*. 15:769-780.

GROSSART H, SIMON M & LOGAN BE 1997. Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: the significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton and zooplankton. *Limnology and Oceanography*. 42:1651-1659.

GUILLARD RRL & LORENZEN CJ 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. *Journal of Phycology*. 8:10-14.

GUILLARD RRL & WANGERSKY PJ 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography*. 3:449-454.

HEISSENBERGER A, LEPPARD GG & HERNDL GJ 1996. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:4521-4528.

HELLEBUST JA 1974. Extracellular products. In: Stewart WDP (Ed) *Algal Physiology and Biochemistry*. University of California Press. Berkeley. 110-149.

HEWES CD & HOLM-HANSEN O 1983. A method for recovering nanoplankton from filters for identification with the microscope: the filter-transfer-freeze (FTF) technique. *Limnology and Oceanography*. 28:389-394.

HOAGLAND KD, ROSOWSKI JR, GRETZ MR & ROEMER SC 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *Journal of Phycology*. 29:537-566.

HONG Y, SMITH WO & WHITE AM 1997. Studies of transparent exopolymer particles (TEP) produced in the Ross Sea (Antarctica) and by *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*. 33:368-376.

JÄHMLICH S, THOMSEN L & GRAF G 1998. Factors controlling aggregate formation in the benthic boundary layer of the Mecklenburg Bight (western Baltic Sea). *Journal of Sea Research*. 41:245-254.

JATI S 1998. Estrutura e dinâmica da comunidade fitoplanctônica no reservatório de Barra Bonita (SP): uma análise em diferentes escalas de tempo. Universidade de São Paulo. 147p. São Carlos, SP.

JOHNSON BD & COOKE RC 1980. Organic particle and aggregate formation resulting from the dissolution of bubbles in seawater. *Limnology and Oceanography*. 25(4):653-661.

JOHNSON BD, ZHOU XL & WANKERSKY PJ 1986. Surface coagulation in seawater. *Netherlands Journal of Sea Research*. 20:201-210.

KEPKAY PE & WELLS ML 1992. Dissolved organic carbon in North Atlantic surface waters. *Marine Ecology Progress Series*. 80:275-283.

KEPKAY PE, HARRISON WG & IRWIN B 1990. Surface coagulation, microbial respiration and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research*. 37:145-155.

KIØRBOE T & HANSEN JLS 1993. Phytoplankton aggregate formation: observations of patterns and mechanisms of cell sticking and the significance of exopolymeric material. *Journal of Plankton Research*. 15(9):993-1018.

LEPPARD GG 1992. Evaluation of electron microscope techniques for the description of aquatic colloids. In: Buffle J & Van Leeuwen HP (Eds). *Environmental particles 1*. Lewis Publication. 231-289.

LEPPARD GG, BURNISON BK & BUFFLE J 1990. Transmission electron microscopy of natural organic matter of surface waters. *Analytica Chimica Acta*. 232:107-121.

LING SC & ALLDREDGE AL 2003. Does the marine copepod *Calanus pacificus* consume transparent exopolymer particles (TEP)? *Journal of Plankton Research*. 25(5):507-515.

LOGAN BE & HUNT JR 1987. Advantage for microbes of growth in permeable aggregates in marine systems. *Limnology and Oceanography*. 32:1034-1048.

LOGAN BE, PASSOW U, ALLDREDGE AL, GROSSART HP & SIMON M 1995. Rapid formation and sedimentation of large aggregates is predictable from coagulation rates (half-lives) of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Research II*. 42:203-214.

MARI X 1999. Carbon content and C:N ratio of transparent exopolymeric particles (TEP) produced by bubbling exudates of diatoms. *Marine Ecology Progress Series*. 183:59-71.

MARI X & BURD A 1998. Seasonal size spectra of transparent exopolymeric particles (TEP) in a coastal sea and comparison with those predicted using coagulation theory. *Marine Ecology Progress Series*. 163:63-76.

MARI X & KIØRBOE T 1996. Abundance, size distribution and bacterial colonization of transparent exopolymeric particles (TEP) during spring in the Kattegat. *Journal of Plankton Research*. 18:969-986

MOPPER K, ZHOU J, RAMANA KS, PASSOW U, DAM HG & DRAPEAU DT 1995. Role of surface-active carbohydrates in the flocculation of diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research II*. 42:47-74.

MYKLESTAD S 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *The Science of the Total Environment*. 165:155-164.

MYKLESTAD S & HAUG A 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 9:125-136.

NALWAJKO C & LEAN DR 1972. Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. *Journal of Phycology*. 8:361-366.

ORTOLANO, PIC (em preparação). Formação de agregados gelatinosos em culturas de microalgas de um reservatório eutrofizado do Estado de São Paulo (título provisório).

PASSOW U 2000. Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. *Marine Ecology Progress Series*. 192:1-11.

PASSOW U & ALLDREDGE AL 1994. Distribution, size and bacterial colonization of transparent exopolymer particles (TEP) in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*. 113:185-198.

PASSOW U & ALLDREDGE AL 1995a. A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP). *Limnology and Oceanography*. 40(7):1326-1335.

PASSOW U & ALLDREDGE AL 1995b. Aggregation of a diatom bloom in a mesocosm: the role of transparent exopolymer particles (TEP). *Deep-Sea Research*. 42:99-110.

PASSOW U, ALLDREDGE AL & LOGAN BE 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep-Sea Research I*. 41(2):335-357.

PASSOW U, SHIPE RF, MURRAY A, PAK DK, BRZEZINSKI MA & ALLDREDGE AL 2001. The origin of transparent exopolymer particles (TEP) and their role in the sedimentation of particulate matter. *Continental Shelf Research*. 21:327-346.

PASSOW U & WASSMANN P 1994. On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot): 4. The formation of marine snow by *P. pouchetii*. *Marine Ecology Progress Series*. 104:1-2.

RAMUS J 1977. Alcian blue: a quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides. *Journal of Phycology*. 13:345-348.

REVELANTE N & GILMARTIN M 1991. The phytoplankton composition and population enrichment in gelatinous 'macroaggregates' in the northern Adriatic during the summer of 1989. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 146:217-233.

RIEBESELL U 1991. Particle aggregation during a diatom bloom. II. Biological aspects. *Marine Ecology Progress Series*. 69:281-291.

RIEBESELL U, SCHLOSS I & SMETACEK V 1991. Aggregation of algae released from melting sea ice: implications for seeding and sedimentation. *Polar Biology*. 11:239-248.

SCHUSTER S & HERNDL GJ 1995. Formation and significance of transparent exopolymer particles in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 124:227-236.

SHIMETA J 1993. Diffusional encounter of submicrometer particles and small cells by suspension feeders. *Limnology and Oceanography*. 38:456-465.

SIGLEO AC 1996. Biochemical components in suspended particles and colloids carbohydrates in the Potomac and Patuxent estuaries. *Organic Geochemistry*. 24(1):83-93.

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

TALLING JF & DRIVER D 1963. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. In *Proceedings of a conference on primary productivity measurements, marine and fresh water*. University of Hawaii, Honolulu. 1961. U.S. Atomic Energy Commission. TID-7633. 142-146.

TRANVIK LJ, SHERR EB & SHERR BF 1993. Uptake and utilization of 'coloidal DOM' by heterotrophic flagellates in seawater. *Marine Ecology Progress Series*. 92:301-309.

VIEIRA AAH & MYKLESTAD S 1986. Production of extracellular carbohydrate in cultures of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). *Journal of Plankton Research*. 8:985-994.

WAITE AM, OLSON RJ, DAM HG & PASSOW U 1995. Sugar-containing compounds on the cell surfaces of marine diatoms measured using concanavalin A and flow cytometry. *Journal of Phycology*. 31:925-933.

WELLS ML & GOLDBERG ED 1993. Colloid aggregation in seawater. *Marine Chemistry*. 41:353-358.

WOOD AM & VAN VALEN LM 1990. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Marine Microbial Food Webs*. 4(1):103-116.

ZHOU J, MOPPER K & PASSOW U 1998. The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography*. 43(8):1860-1871.