

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

**Associação de Bactérias à Cápsula de *Anabaena spiroides*
(Cyanobacteria) em cultura**

INESSA LACATIVA BAGATINI

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.

SÃO CARLOS
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

B144ab

Bagatini, Inessa Lacativa.

Associação de bactérias à cápsula de *Anabaena
spiroides* (Cyanobacteria) em cultura / Inessa Lacativa
Bagatini. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2008.

1. Ecologia microbiana. 2. Bactérias. 3. Cianobactérias.
4. DNAr 16S. 5. Eletroforese em gel com gradiente
desnaturante. 6. *Anabaena spiroides*. I. Título.

CDD: 576.15 (20^a)

Inessa Lacativa Bagatini

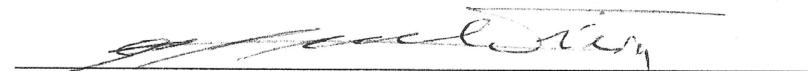
Associação de Bactérias à Cápsula de *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) em cultura

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 30 de maio de 2008

BANCA EXAMINADORA

Presidente



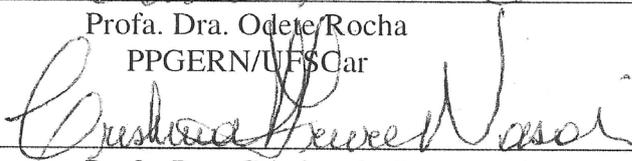
Prof. Dr. Armando A. H. Vieira
(Orientador)

1º Examinador



Profa. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profa. Dra. Cristina de Souza Freire Nordi
UNIFESP/Diadema-SP



Prof. Dra. Dália Maria da Silva Matos
Coordenadora
PPGERN/UFSCar

ORIENTADOR

ARMANDO AUGUSTO HENRIQUES VIEIRA

CO-ORIENTADORA

MIRNA HELENA REGALI SELEGHIM

*“A espantosa realidade das cousas
É a minha descoberta de todos os dias
E é difícil explicar a alguém quanto isso me alegra”.*
(Alberto Caeiro)

AGRADECIMENTOS

Amigo é quem, conhecido ou não, vivo ou morto, nos faz pensar, agir ou se comportar no melhor de nós mesmos... É sempre que agimos no melhor de nós mesmos, melhoramos... É certas pessoas conseguem o milagre de potencializar esse melhor. Sentimo-nos, então, fundamentalmente gratos... Este melhor de nós contém sentimentos, palavras, talentos guardados, bondades exercidas ou não.

... assim é a amizade, forma especial de amor, capaz de ampliar a lucidez e os modos generosos e compreensivos de ver, sentir, perceber o outro e sobretudo - se possível- potencializar os seus melhores ângulos e sentimentos. (Arthur da Távola)

- ☆ À UFSCar e ao PPG-ERN pela infra-estrutura fornecida e pela formação acadêmica.
- ☆ À FAPESP pelo financiamento do projeto temático e à Capes pela bolsa concedida.
- ☆ Ao professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira pelos ensinamentos, pela oportunidade, pela confiança e estímulo (mesmo nos períodos em que a frase que eu mais dizia era “não deu certo!”), pela paciência e amizade.
- ☆ À professora Dra. Mirna Helena Regali Seleghim por ter me ensinado a dar os primeiros passos e ter continuado ao meu lado, mostrando caminhos, me apoiando... e pela enorme paciência que isso exige! Pelo estímulo e, especialmente, pela amizade!
- ☆ À professora Dra. Odete Rocha pelas importantes sugestões para este trabalho, pela disponibilidade de sempre em ajudar e esclarecer as mais diversas dúvidas e por aceitar compor esta banca de mestrado.
- ☆ À professora Dra. Ana Teresa Lombardi pelas valiosas contribuições para este trabalho, pela ajuda com metodologias, com os resumos e traduções.
- ☆ À professora Dra. Cristina de Souza Freire Nordi por aceitar compor a banca do mestrado, pelas conversas enriquecedoras sobre temas diversos e por me ensinar a usar a centrífuga!
- ☆ À professora Dra. Keico O. Nonaka (Departamento de Fisiologia) pela leitura das amostras no cintilador.
- ☆ Ao professor Dr. Flávio Henrique da Silva (Departamento de Genética e Evolução) por disponibilizar equipamentos fundamentais para a execução do trabalho e pelo esclarecimento de dúvidas. A todos os alunos do Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda com os equipamentos e pelas dicas para aperfeiçoar alguns passos do trabalho, em especial: Raquel e Rosseli (também pela amizade!), Fernando, Kesser, Márcia, Simone, Andréa, Andréia, César. Ainda à Raquel e ao Fernando pela ajuda essencial com a PCR e com o seqüenciamento, respectivamente.
- ☆ À professora Dra. Maria Bernadete A. Varesche (Departamento de Hidráulica e Saneamento – USP/São Carlos) por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender a fazer DGGE. Às suas alunas Nora Kátia e Iolanda pelas dicas imprescindíveis para que eu conseguisse desenvolver a técnica aqui no laboratório de fisiologia, por terem me recebido tão bem e por me fazerem acreditar que o DGGE daria certo!

- ☆ Ao professor Dr. Pedro Manuel Galleti Jr. por disponibilizar o sistema de documentação fotográfica para os géis de DGGE e aos seus alunos pela ajuda com o equipamento.
- ☆ À professora Dra. Maria Inês Salgueiro Lima por me deixar usar o forno de microondas do seu laboratório!
- ☆ À Dra. Heliana de Azevedo Gomes (CNEN) pelo fornecimento da timidina tritiada.
- ☆ Ao professor Dr. Reinaldo Brito e ao Dr. Fábio Chinalia pelas explicações fundamentais para que eu conseguisse construir as árvores filogenéticas.
- ☆ Aos professores e funcionários (João, Renata, Graça e Roseli) do PPG-ERN e aos funcionários Marco (Botânica) e Edna (DEBE).
- ☆ Ao Otávio Lino e Silva por me ensinar a usar os programas empregados na construção das árvores filogenéticas.
- ☆ Ao Iderval da Silva Junior Sobrinho pelo fornecimento da metodologia de purificação do DNA e dicas para as análises filogenéticas.
- ☆ Ao Luis e ao Airton pelas coletas, que sem eles não seriam realizadas!
- ☆ Ao Djalma e ao Ademir por me socorrerem quando algo quebrava e por darem forma a algumas idéias minhas.
- ☆ Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos: Carol, Raquel, Marília, Eli e principalmente à Darci, por ter fornecido algumas bactérias usadas neste trabalho e por esclarecer dúvidas em vários momentos, e ao Fernando, pelas dicas sobre contagem bacteriana, por emprestar os filtros para contagem de flagelados, artigos e discussões. Ainda à Darci e ao Fernando pelo carinho, preocupação, palavras de estímulo e amizade!
- ☆ A todos os amigos e colegas do laboratório de Ficologia: Alessandra, Aline, Ana Teresa, Cristina, Danilo Bertolotti, Danilo Giroldo, Fabrício, Helena, Ingritt, Letícia, Luiz, Sandra, Patrícia, Thais, Vanessa e Zezé. A alguns um agradecimento especial, pois foram essenciais durante o mestrado, contribuindo diretamente para o trabalho, ou indiretamente, por deixarem meus dias mais divertidos, pela troca de experiências e pelas palavras de consolo e estímulo quando as coisas não iam bem (rs): Ale, Ana, Cris, Danilo B., Fá, Lê, Luiz, Sandra, Patrícia, Thais, Vanessa e Zezé.
- ☆ Ainda à Ale pelas análises de nitrato, ao Fá e à Lê pelas análises de clorofila e à Lê pela tradução do artigo, ao Luiz pela ajuda em inúmeros momentos no laboratório, à Patrícia pelas dicas com contagem de bactérias e PCR, à Vanessa pela ajuda fundamental com a PCR, à Zezé por me ensinar a fazer clorofila e pela oportunidade de aprender com outro projeto.
- ☆ À Thais! Não sei o que eu teria feito sem a sua ajuda... desde me apresentar quase tudo no laboratório, até a ajuda com várias análises, ajustes de metodologias e em momentos de extremo desespero meu, como a impressão da qualificação!rs.
- ☆ Ao Danilo Giroldo pela ajuda com o DGGE e importantes sugestões para alguns experimentos.
- ☆ Ao José Valdecir de Lucca (Zezinho) pelo empréstimo da tela de nylon, que foi importantíssima para a execução do trabalho. A ele e à Néia pela ajuda com assuntos extra-acadêmicos.
- ☆ Ao Pedro Ivo pelos artigos.

- ☆ À Cris Alves pelas conversas, cafezinhos e bolos!
- ☆ À Ná Allenspach, Ingrid, Julia, Manu, Katiuscia, Rose, Du, Roberta, Carol Mizuno, Fer Fernandes e Mari Gonzaga pela troca de experiências, pelo apoio, conversas e amizade.
- ☆ Às minhas queridas amigas: Li, Má e Nath por estarem sempre presentes, pelo apoio, pelas conversas e risadas (mesmo que por e-mail!).
- ☆ À Alê Arce e à Virginia, pela amizade e pelo exemplo!
- ☆ À Aline e ao Murilo, à Gi Duarte, à Gi de Lucca, à Ju, à Naty e à Pri e ao Bruno pelas conversas, pela amizade, pelo carinho, especialmente à Pri, à Naty e à Gi de Lucca pela companhia e apoio essenciais (também) nesses últimos anos.
- ☆ À Carol, Bárbara, Ritinha e Sol pelas risadas, conversas e convivência agradável durante parte do mestrado.
- ☆ Aos meus avós (especialmente ao vovô Vicente, pelo exemplo), tios, tias, primos e primas, pela presença constante, apoio, carinho, preocupação e estímulo. Também ao Sam, pelas caronas e amizade, e ao Lincoln.
- ☆ A quem nenhuma palavra de agradecimento será suficiente: minha mãe (Izildinha), meu pai (Wilson) e minha irmã (Inara). Mesmo que vocês não entendam nada sobre o que faço (rs), sem o amor, apoio, confiança e estímulo incondicionais de vocês, certamente eu não teria chegado até aqui!
- ☆ A todos os meus familiares e amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão de mais essa etapa!

LISTA DE ABREVIATURAS

³ H-Tim	Timidina tritiada (radioativa)
BA	Bactérias aderidas
BL	Bactérias livres
BLAST	Basic Local Alignment and Search Tool
COAs	Carbono orgânico das células de <i>A. spiroides</i> (com a cápsula e as bactérias aderidas)
COB	Carbono orgânico da fração menor do que 12-20µm (que contém as células de bactérias livres, partículas da cápsula e carbono dissolvido)
COT	Carbono orgânico total
CPS	Polissacarídeo capsular
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados, onde N = adenosina, citidina, guanosina ou timidina
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPS	Exopolissacarídeo ou polissacarídeo extracelular
MOD	Matéria orgânica dissolvida
NFHs	Nanoflagelados heterotróficos
PB	Produção bacteriana
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polietilenoglicol
R1	Réplica 1
R2	Réplica 2
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RDP II	Ribosomal Database Project II
TCA	Ácido tricloroacético
UTOs	Unidades taxonômicas operacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reservatório de Barra Bonita com a localização da estação onde foram coletados os inóculos bacterianos e a espécie fitoplanctônica (coordenadas do ponto de coleta 22°32'50,98"S e 48°29'28,23"W). (modificado de Giroldo 2003) **6**

Figura 2. Filamentos de *Anabaena spiroides* (BB007). (A) Microscopia óptica de campo claro utilizando nanquim (coloração negativa) para melhor observação da cápsula de *A. spiroides* e do exopolissacarídeo desprendendo-se para o meio. (B) Filamento de cultura com 49 dias sem a adição de inóculo bacteriano de Barra Bonita, mas com bactérias contaminantes aderidas à cápsula (microscopia de contraste de fase). (C) Filamento de cultura com 18 dias, adicionada do inóculo bacteriano de Barra Bonita, com bactérias aderidas à cápsula (microscopia de contraste de fase). **7**

Figura 3. Esquema do sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo bacteriano. A entrada de água permanece tampada e é aberta apenas dentro da água; o algodão, autoclavado com o sistema, é colocado na mangueira ligada à bomba para evitar contaminação por bactérias aéreas. **8**

Figura 4. Diagrama do Experimento 1. As amostragens para as análises foram feitas em duas culturas (réplicas) durante o crescimento de *A. spiroides*. BA: bactérias aderidas a *A. spiroides*. BL: bactérias livres na cultura. NFHs: nanoflagelados heterotróficos. O inóculo de *A. spiroides* foi fracionado (entre bactérias livres e aderidas) e submetido à análise de diversidade bacteriana para monitoramento das bactérias contaminantes. **10**

Figura 5. Imagem obtida por microscopia de epifluorescência de amostra de uma cultura, no início da fase estacionária, de *A. spiroides* inoculada com bactérias do reservatório de Barra Bonita, após filtração em tela de nylon (12-20 μ m) e lavagem com água ultrapura. **11**

Figura 6. Concentração de clorofila *a* (μ g.L⁻¹) em função do tempo (em dias), para as duas culturas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. A barra de erros corresponde ao desvio padrão, que foi calculado com n=2 (réplicas de amostragem). **21**

Figura 7. Concentrações (mg.L^{-1}) de carbono orgânico total (COT) e carbono orgânico das células de *A. spiroides* (COAs) em função do tempo (em dias) para as duas réplicas (R1 e R2). As linhas representam os valores médios entre as réplicas. **22**

Figura 8. Concentração (mg.L^{-1}) de carbono orgânico da fração menor do que $20\mu\text{m}$ (COB) em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. Réplica 1 (\blacktriangle); Réplica 2 (\blacksquare). A linha representa os valores médios entre as réplicas. **23**

Figura 9. Densidade ($\text{células.mL}^{-1} \times 10^6$) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* (BA) e das bactérias livres na cultura (BL) em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas. **24**

Figura 10. Produção ($\text{ngC. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e biomassa (ngC. L^{-1}) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas. **26**

Figura 11. Produção ($\text{ngC. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e biomassa (ngC. L^{-1}) das bactérias livres na cultura em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas. **27**

Figura 12. Proporção de morfotipos das bactérias livres na cultura 1 em diferentes dias de cultivo. **28**

Figura 13. Proporção de morfotipos das bactérias livres na cultura 2 em diferentes dias de cultivo. **28**

Figura 14. Fotomicrografia de células bacterianas coradas com DAPI. (A) bactérias livres na cultura 1 no 29º dia de cultivo. (B) bactérias livres na cultura 2 no 29º dia de cultivo. (C) bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 1 no 35º dia de cultivo. (D) bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 2 no 35º dia de cultivo. **30**

Figura 15. Proporção de morfotipos das bactérias aderidas a *A. spiroides* na cultura 1 em diferentes dias de cultivo. **31**

Figura 16. Proporção de morfotipos das bactérias aderidas a *A. spiroides* na cultura 2 em diferentes dias de cultivo. **31**

- Figura 17.** Freqüência relativa (%) das bactérias livres na cultura 1, separadas por classes de comprimento celular, em 4 dias de amostragem: 0, 20, 29 e 35. **32**
- Figura 18.** Freqüência relativa (%) das bactérias livres na cultura 2, separadas por classes de comprimento celular, em 4 dias de amostragem: 0, 20, 29 e 35. **32**
- Figura 19.** Freqüência relativa (%) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 1, separadas por classes de comprimento celular, em 3 dias de amostragem: 0, 20 e 35. **33**
- Figura 20.** Freqüência relativa (%) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 2, separadas por classes de comprimento celular, em 3 dias de amostragem: 0, 20 e 35. **33**
- Figura 21.** Densidade (células.mL⁻¹ x 10³) de nanoflagelados heterotróficos em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. Réplica 1 (▲); Réplica 2 (■). **34**
- Figura 22.** Fotomicrografia de células bacterianas e de nanoflagelados heterotróficos (setas vermelhas) coradas com DAPI no 29º dia de cultivo. (A) células livres na Réplica 1. (B) células livres na Réplica 2. As amostras foram filtradas em membrana de policarbonato de 0,8 µm de poro. **35**
- Figura 23.** Gel de DGGE das bactérias livres. IA, representa o inóculo da cultura de *A. spiroides*; P, padrão. Os números acima das faixas em cada gel representam as réplicas, 1 ou 2, agrupadas por dia de amostragem (0, 2, 7, 13, 20, 26, 29, 31, e 35). A: banda referente a *A. spiroides*; R: banda referente a *Rhodobacter* sp.; J: Banda referente à Alphaproteobacteria clone Jul-eub3. **37**
- Figura 24.** Géis de DGGE e desenho do padrão de bandas das bactérias aderidas. A1, extração 1; A2, extração 2; Ac, inóculo de *A. spiroides*; P, padrão. Os números acima das faixas em cada gel representam as réplicas, 1 ou 2, agrupadas por dia de amostragem. No desenho das bandas os números representam as bandas recortadas e seqüenciadas. L(x) são as linhas que agrupam as bandas consideradas como sendo representativas da mesma espécie. **38**
- Figura 25.** Árvore filogenética utilizando o modelo de máxima parcimônia, com as bactérias associadas a *A. spiroides* (em negrito) e bactérias cuja filogenia foi

comprovada (exceto Korarchaeota e a Acidobacteria 100 M1_C7), obtidas no RDPII (Ribossomal Database Project II) e usadas para sugerir o grupo das bactérias não identificadas. Uma Korarchaeota foi usada como raiz. Os números nos nós representam a porcentagem do teste de *bootstrap* de 1000 réplicas. **42**

Figura 26. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C2 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C2 contaminadas (2 amostragens em cada réplica de cultura). **43**

Figura 27. Concentrações carbono total (mg.L^{-1}) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C2 inoculadas (réplicas de cultura). **44**

Figura 28. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão $n=2$ nas culturas C1 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C1 inoculadas (2 amostragens em cada réplica de cultura). **45**

Figura 29. Concentrações carbono total (mg.L^{-1}) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C1 inoculadas (réplicas de cultura). **46**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração final dos reagentes na mistura de reação para amplificação do 16S rDNA do Domínio Bacteria. **17**

Tabela 2. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvios-padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas réplicas 1 e 2. O desvio padrão foi calculado com $n=2$ (réplicas de amostragem). **22**

Tabela 3. Média dos biovolumes celulares bacterianos (BVm em μm^3) entre os dias de amostragem para as bactérias livres (BL) e bactérias aderidas (BA) a células de *A. spiroides* nas duas culturas (réplica 1 e réplica 2). DP é o desvio padrão, $n=7$. **25**

Tabela 4. Média da produção bacteriana (PB) por célula (em $\text{ngC.h}^{-1} \times 10^{-6}$) entre os dias de amostragem para as bactérias livres (BL) e bactérias aderidas (BA) a células de *A. spiroides* nas duas culturas (réplica 1 e réplica 2). DP é o desvio padrão, $n=7$. **26**

Tabela 5. Bactérias aderidas à *A. spiroides* (incluindo a cianobactéria) identificadas pelo seqüenciamento das bandas recortadas (Figura 24), grupo ao qual pertencem, similaridade obtida no BLAST e fase em que foram detectadas na cultura. As seqüências com menos de 96% não foram consideradas como espécies similares. x_{A_1} e x_{A_2} , bandas obtidas na extração 1 e 2 respectivamente; x_{Ac} , bandas obtidas no inóculo de *A. spiroides*; S, senescência; In, inóculo e início da cultura (até 13º dia). **39**

Tabela 6. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvio padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. O desvio padrão foi calculado com $n = 2$ na cultura C2 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C2 inoculadas (2 amostragens em cada réplica de cultura). **44**

Tabela 7. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvio padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. O desvio padrão foi calculado com $n=2$ nas culturas C1 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C1 contaminadas (2 amostragens em cada réplica de cultura). **46**

RESUMO

A cianobactéria *Anabaena spiroides*, cosmopolita em ambientes eutrofizados como o reservatório de Barra Bonita, é recoberta por uma espessa cápsula de polissacarídeo que fornece um microambiente para o crescimento de uma comunidade bacteriana particular. Os objetivos deste trabalho foram: identificar as bactérias associadas à cápsula de *A. spiroides* para detectar possíveis relações interespecíficas entre estas e a cianobactéria, considerando a seletividade e a dinâmica de sucessão das bactérias associadas; verificar o efeito da adição do inóculo bacteriano (água do reservatório de Barra Bonita filtrada em 1,2 µm) no crescimento da cianobactéria. Para tanto, a densidade, produção, biomassa e a diversidade das bactérias livres e aderidas à cianobactéria, assim como a identificação das bactérias aderidas foram determinadas em duas culturas de *A. spiroides* inoculadas com bactérias do reservatório de Barra Bonita. A diversidade foi verificada pelo número de bandas obtidas em *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) após a amplificação do 16S rDNA das comunidades bacterianas das frações livre e aderida e as bactérias aderidas à cápsula foram identificadas pelo seqüenciamento do fragmento do 16S rDNA. Em outro experimento, o crescimento da cianobactéria foi verificado pela concentração de clorofila *a* e carbono orgânico total após a adição da água de Barra Bonita (filtrada em 1,2µm) em quatro culturas experimentais de *A. spiroides*. Os controles consistiram em culturas de *A. spiroides* sem o inóculo de Barra Bonita. Os resultados mostraram que a densidade, biomassa e produção total das bactérias foram sempre maiores para as bactérias livres, no entanto, com relação à produção por célula, não houve diferença significativa entre aderidas e livres. Este estudo também mostrou que a diversidade das bactérias aderidas foi menor do que das livres e que três linhagens de bactérias aderidas que estavam presentes no inóculo de *A. spiroides*, permaneceram até o início da fase de crescimento exponencial. Essas bactérias foram identificadas como uma Acidobacteria e duas Alphaproteobacteria. Na fase de senescência essas bactérias foram substituídas por outras quatro linhagens: uma Deltaproteobacteria, uma Betaproteobacteria e uma Bacilli (Firmicutes) e uma linhagem não identificada. No segundo experimento as concentrações de clorofila e carbono foram menores nas culturas adicionadas do inóculo bacteriano do que nos controles. O presente estudo demonstrou que houve seleção e sucessão das bactérias aderidas a *A. spiroides* e que a adição da água de Barra Bonita acelera a morte das culturas da cianobactéria.

ABSTRACT

The cyanobacterium *Anabaena spiroides*, a cosmopolitan species occurring in eutrophic environments as in Barra Bonita reservoir, is covered by a thick polysaccharide capsule that provides a microenvironment for association of bacterial communities. The aims of this study were: to identify bacteria attached to *A. spiroides* capsule to evaluate interspecific relationships among bacteria communities and *A. spiroides*, considering bacteria selectivity and succession dynamics of attached bacteria; as well as the effect of bacterial inoculum (1.2 µm filtered water from Barra Bonita reservoir) on cyanobacterial growth. For this purpose, density, production, biomass and diversity of bacteria attached to cyanobacteria capsules and free-living bacteria were determined in two replicate cultures of *A. spiroides* inoculated with bacteria from Barra Bonita reservoir. The diversity was verified by the number of bands obtained through separation of PCR amplification products of 16S rDNA from free-living and attached bacterial communities using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Bacteria attached to the capsule were identified by sequencing the fragment of 16S rDNA. A set of cultures were performed to evaluate cyanobacterial growth as affected by Barra Bonita filtered water. *A. spiroides* cultures without Barra Bonita inoculum were used as control. The results showed that bacterial density, biomass and total production were higher for free-living bacteria, but no significant difference was obtained between attached and free-living bacteria regarding production per cell. The diversity was lower for the attached bacteria than free-living ones. Three strains of attached bacteria present in *A. spiroides* inoculum, identified as one Acidobacteria and two Alphaproteobacteria, remained up to the beginning of exponential growth phase. At the senescence phase these bacteria were replaced by four strains identified as one Deltaproteobacteria, one Betaproteobacteria, one Bacilli (Firmicutes) and one unidentified strain. This research demonstrated that there were selectivity and succession in the bacterial community attached to *A. spiroides*, and that the addition of the filtered water from Barra Bonita inoculum accelerates the death of cyanobacterium cultures.

SUMÁRIO

Abreviaturas	I
Lista de Figuras	II
Lista de Tabelas	VI
Resumo	VII
Abstract	VIII
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
<i>Experimento I</i>	5
<i>Experimento II</i>	5
3. Materiais e Métodos	6
3.1. Local de estudo	6
3.2. Inóculos	7
3.3. Experimento I	9
3.3.1. Condições de cultivo	9
3.3.2. Monitoramento das culturas	9
3.3.3. Concentração de carbono orgânico	12
3.3.4. Clorofila <i>a</i>	12
3.3.5. Densidade, morfologia e biovolume bacterianos	12
3.3.6. Densidade e biovolume de flagelados contaminantes	14
3.3.7. Produção bacteriana	14
3.3.8. Diversidade bacteriana	15
3.3.8.1. Extração do DNA	16
3.3.8.2. Amplificação do DNA	16
3.3.8.3. DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante)	17
3.3.8.4. Seqüenciamento e análise dos dados	18
3.4. Experimento II	19
<i>Condições de cultivo e monitoramento das culturas</i>	19
4. Resultados	21
4.1. Experimento I	21
4.1.1. Crescimento da cianobactéria	21

4.1.2. Crescimento bacteriano	23
4.1.3. Diversidade de morfotipos bacterianos	27
4.1.4. Freqüências relativas das bactérias separadas por classes de tamanho (comprimento)	32
4.1.5. Crescimento de nanoflagelados heterotróficos	33
4.1.6. Diversidade bacteriana	35
<i>Bactérias presentes no inóculo de <u>A. spiroides</u></i>	36
<i>Bactérias provenientes do inóculo de Barra Bonita</i>	40
4.2. Experimento II	43
4.2.1. Crescimento da cianobactéria	43
5. Discussão	47
5.1. Problemas metodológicos: amplificação do DNA e DGGE	47
5.2. Diversidade, seletividade e interações bactérias associadas- <i>A. spiroides</i>	48
5.2.1. Seletividade das bactérias que se aderem à cápsula	48
5.2.2. Bactérias identificadas e sucessão das bactérias aderidas	49
<i>Bactérias presentes no inóculo de <u>A. spiroides</u> e no início das culturas experimentais</i>	50
<i>Bactérias provenientes do inóculo de Barra Bonita que sucederam aquelas presentes inicialmente</i>	51
5.2.3. Interações bactérias- <i>A. spiroides</i>	54
5.3. Produção bacteriana e a influência dos NFHs na comunidade bacteriana (Experimento I)	57
6. Conclusões	61
7. Referências bibliográficas	62
Anexo 1. Tentativas de axenização de <i>A. spiroides</i>	69
Anexo 2. Purificação do DNA com Polietilenoglicol 8000 para seqüenciamento.....	70

1. INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Anabaena spiroides* é uma espécie cosmopolita em ambientes eutrofizados, nos quais produz, freqüentemente, grandes biomassas flutuantes devido à presença de aerótopos em suas células. No Brasil, tem ocorrência descrita nas regiões tropicais e subtropicais (Werner 2002) sendo muito freqüente em reservatórios construídos para gerar energia elétrica.

Essa cianobactéria filamentosa é recoberta por uma espessa cápsula de polissacarídeo que libera continuamente material para o meio em forma de colóides ou pequenos fragmentos (Bittar 2005). Os polissacarídeos extracelulares (EPSs) representam a maior fração dos excretados algais (até 90% da MOD excretada) (Myklestad 1995), possuindo importante papel na produção dos ecossistemas aquáticos. Quando ainda compõem a cápsula, os EPSs são mais especificamente denominados CPSs (Capsular Polysaccharides). A produção desse material mucóide extracelular, enquanto fornece proteção física e química, também constitui uma matriz que suporta micro-habitats para a colonização por bactérias e protozoários (Paerl 1992). Em diversos habitats aquáticos e terrestres, em uma ampla variação de condições ambientais e em vários estágios de crescimento, as cianobactérias são sítios de intensa colonização bacteriana (Paerl 1982, Paerl 1996).

Vários trabalhos mostram que associações entre bactérias e cianobactérias são benéficas para ambas (*e.g.* Paerl e Kellar 1978, Paerl e Gallucci 1985, Paerl 1992). Essas associações podem estimular o crescimento da cianobactéria devido à remineralização de nutrientes e liberação de gás carbônico por parte das bactérias, aliados, no caso de algumas cianobactérias, ao aumento da capacidade de fixação de nitrogênio, uma vez que as bactérias aderidas formam um microambiente com menor concentração de oxigênio na ficosfera, próximo aos heterocitos, aumentando a atividade

da nitrogenase (Gibson & Smith 1982, Paerl 1982, Paerl 1985). Desta forma, esses consórcios e associações simbióticas facilitaram a superação de limitações funcionais/estruturais nas cianobactérias (Margulis 1981 *apud* Paerl 1992), principalmente após o surgimento da fotossíntese oxigênica, uma vez que o oxigênio é tóxico para enzimas relacionadas à fotossíntese e à fixação de nitrogênio.

Por outro lado, relações antagônicas, em que diferentes linhagens de bactérias apresentam efeitos cianobactericidas, também foram documentadas por vários autores (Shilo 1970, Reim *et al* 1974, Manage *et al* 2000, Kim & Lee 2006). Isso por que, a presença das bactérias associadas à ficosfera é um prelúdio para o ataque, lise ou degradação da cianobactéria hospedeira (Paerl 1992). Esse tipo de interação tem sido sugerida para a aplicação no controle de cianobactérias em lagos (Sigee *et al* 1999), uma vez que os *blooms* formados pelas cianobactérias apresentam aspectos problemáticos, como o acúmulo de biomassa flutuante, característicos dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Microcystis* (Paerl 1996), e a produção de cianotoxinas (Chorus e Bartram 1999).

Alguns gêneros de cianobactérias, como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Nodularia*, são encontrados com eubactérias associadas à camada de polissacarídeos que recobre as células (Caldwell e Caldwell 1978, Worm e Søndergaard 1998, Kapustina 2006, Tuomainen *et al* 2006) ou associadas à matéria orgânica dissolvida liberada pelas cianobactérias (Eiler e Bertilsson 2004, Kapustina 2006). Vários autores detectaram relações interespecíficas de eubactérias com espécies do gênero *Anabaena*, mas esses trabalhos se concentram nas associações de bactérias aos heterocitos (Paerl 1977, Paerl e Kellar 1978, Lupton e Marshall 1981, Stevenson e Waterbury 2006), e somente Caldwell e Caldwell (1978) identificaram uma espécie de

eubactéria associada à cápsula de *Anabaena flos-aquae*. Entre os trabalhos com o gênero *Anabaena*, apenas Stevenson e Waterbury (2006) utilizaram técnicas de genética molecular para identificação de uma bactéria associada ao heterocito e não há trabalhos que relatem a sucessão de espécies associadas às cianobactérias em diferentes fases de desenvolvimento de uma cultura.

Entre as técnicas de genética molecular, uma das mais utilizadas atualmente em ecologia microbiana para verificar a estrutura de comunidades é o DGGE (do inglês *Denaturing gradient gel electrophoresis*), pois fornece um rápido padrão de bandas por separar os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com o comportamento de separação da dupla fita de DNA, que varia para diferentes espécies (Muyzer & Smalla 1998). As variações na seqüência de nucleotídeos entre as linhagens afetam a posição exata na qual os fragmentos de DNA amplificados desnaturam e param de migrar no gel. O resultado é um padrão bem definido de bandas específicas que fornece uma representação gráfica da composição da comunidade bacteriana. Desta forma, esta técnica pode ser utilizada para determinar a diversidade genética de populações microbianas complexas e permite identificar a presença e abundância relativa de diferentes espécies (Muyzer *et al* 1993). Essa técnica permite ainda, posterior seqüenciamento do fragmento de DNA de cada banda, possibilitando a identificação de espécies.

No reservatório de Barra Bonita, onde a produção de biomassa de origem fitoplanctônica é dominada por *A. spiroides* e *Microcystis aeruginosa* (Matsumura-Tundisi & Tundisi 2005, Dellamano-Oliveira *et al.* 2007), a produção de carboidratos na forma de EPS liberado pelo fitoplâncton foi estimada em 11.700 ton.ano⁻¹ (Antônio 2006). Devido às suas espessas cápsulas estima-se que *A. spiroides* tenha uma contribuição importante nessa quantidade de carboidratos liberados e, uma vez que o

polissacarídeo extracelular dessa espécie é facilmente degradado pela comunidade bacteriana do reservatório (Colombo *et al.* 2004), estima-se que tenha também importante papel no fluxo de energia pela rede trófica microbiana desse sistema. No entanto, pouco se sabe sobre a comunidade bacteriana que vive associada ao polissacarídeo capsular dessa cianobactéria.

Apesar da distribuição cosmopolita e da enorme quantidade de biomassa e polissacarídeos extracelulares produzidos por *Anabaena spiroides*, informações sobre associações entre eubactérias e essa cianobactéria são raras na literatura. Desta forma a quantificação e a identificação das bactérias que vivem associadas à cápsula de *A. spiroides* são importantes para o melhor entendimento da ecologia e para o conhecimento mais profundo do ciclo biológico cianobactéria, assim como para melhor compreensão da dinâmica dos ecossistemas aquáticos, especialmente os eutrofizados, onde florações desta alga são comuns, como por exemplo, Barra Bonita.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Este trabalho teve o objetivo de identificar e quantificar os organismos da comunidade bacteriana associados à cápsula polissacarídica de *A. spiroides* em diferentes fases de crescimento da cultura no intuito de se detectar possíveis relações interespecíficas e conhecer a dinâmica de sucessão das bactérias associadas, além de verificar o efeito dessas bactérias no crescimento da cianobactéria.

2.2. *Objetivos específicos*

Experimento I

O experimento I teve como objetivos verificar possíveis diferenças na diversidade, densidade e produção entre a comunidade bacteriana aderida a *A. spiroides* e a livre nas culturas em diferentes fases da curva de crescimento da cianobactéria, e identificar as bactérias aderidas.

Experimento II

O experimento II foi realizado a fim de se detectar possíveis efeitos do inóculo bacteriano (água de Barra Bonita filtrada em 1,2 μm) sobre o crescimento da cianobactéria quando adicionado em diferentes fases de desenvolvimento das culturas de *A. spiroides*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de Estudo

O reservatório de Barra Bonita (Figura 1), originado do represamento dos rios Tietê e Piracicaba, está localizado entre os municípios de Barra Bonita e Igarçu do Tietê, no Estado de São Paulo. O clima é de região subtropical, com um período seco de maio a outubro e um período úmido de novembro a abril. Possui uma área de 310 km², um volume total de 3.2 km³ e situa-se a uma altura de 480m acima do nível do mar. As profundidades média e máxima são, respectivamente, 10 e 30m. No verão (estação chuvosa) a vazão é de 1500m³/s e o tempo de retenção de 37 dias, e no inverno (estação seca) esses valores são de 200 m³/s e 137 dias (Matsumura-Tundisi & Tundisi 2005), mas esses valores podem variar de ano para ano, dependendo da operacionalidade da usina.

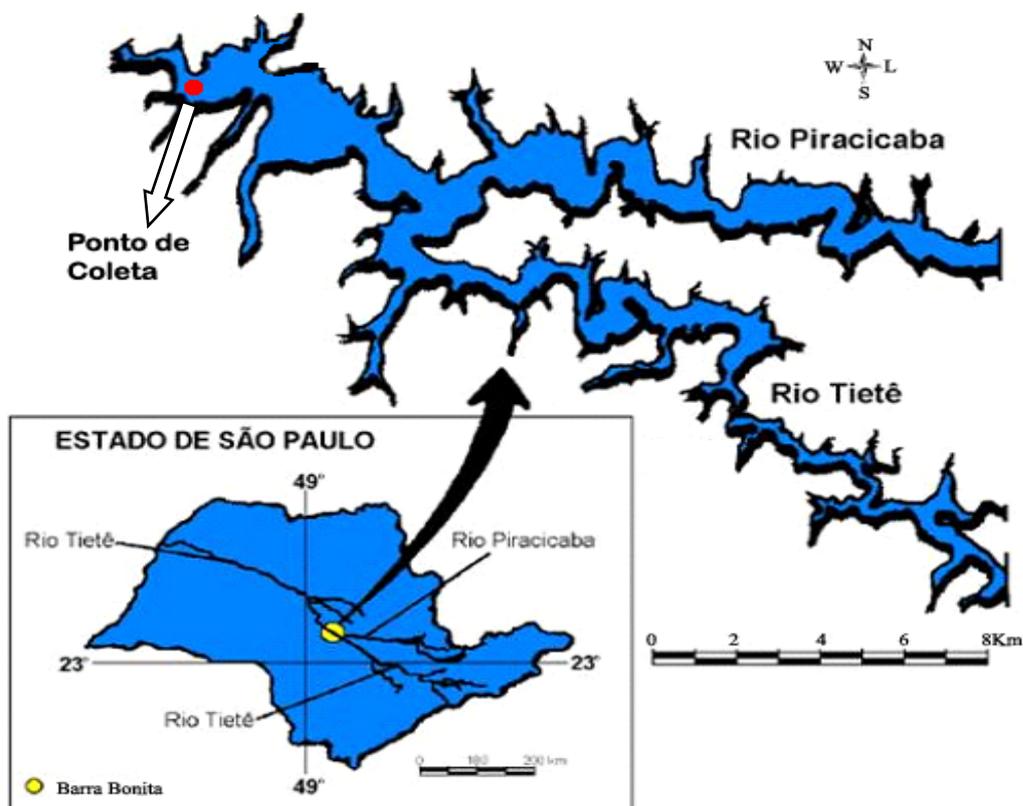


Figura 1. Reservatório de Barra Bonita com a localização da estação onde foram coletados os inóculos bacterianos e a espécie fitoplanctônica (coordenadas do ponto de coleta 22°32'50,98"S e 48°29'28,23"W). (modificado de Giroldo 2003).

3.2. Inóculos

A cianobactéria *Anabaena spiroides* Klebahn, mantida como linhagem BB007 (Figura 2) na coleção de culturas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, SP, Brasil, foi isolada do reservatório de Barra Bonita, Rio Tietê, SP, Brasil. A cianobactéria não estava axênica, apesar dos esforços efetuados nesse sentido (Anexo 1). No entanto, as células foram extensivamente lavadas com meio de cultura estéril antes de serem utilizadas na preparação dos inóculos, para diminuir o número de bactérias iniciais. As bactérias contaminantes foram identificadas para monitorar sua interferência na sucessão bacteriana.



Figura 2. Filamentos de *Anabaena spiroides* (BB007). (A) Microscopia óptica de campo claro utilizando nanquim (coloração negativa) para melhor observação da cápsula de *A. spiroides* e do exopolissacarídeo desprendendo-se para o meio. (B) Filamento de cultura com 49 dias sem a adição de inóculo bacteriano de Barra Bonita, mas com bactérias contaminantes aderidas à cápsula (microscopia de contraste de fase). (C) Filamento de cultura com 18 dias, adicionada do inóculo bacteriano de Barra Bonita, com bactérias aderidas à cápsula (microscopia de contraste de fase).

O inóculo bacteriano foi coletado no mesmo reservatório, no ponto de coleta indicado na Figura 1, com um amostrador que não permite a contaminação com organismos aéreos, previamente autoclavado (Figura 3), e de modo a obter-se uma amostra integrada da coluna d'água (1, 5, 10 e 18 metros). A amostra foi filtrada em condições estéreis, em filtro de fibra de vidro de 1,2 μ m de poro, calcinado, para a remoção de algas, protozoários e detritos. Essa filtração mostrou-se eficiente para remoção de algas e detritos, no entanto, apesar de não terem sido observados logo após a filtração do inóculo, houve crescimento de nanoflagelados heterotróficos (NFHs) nas culturas. Eles foram quantificados apenas do experimento I.

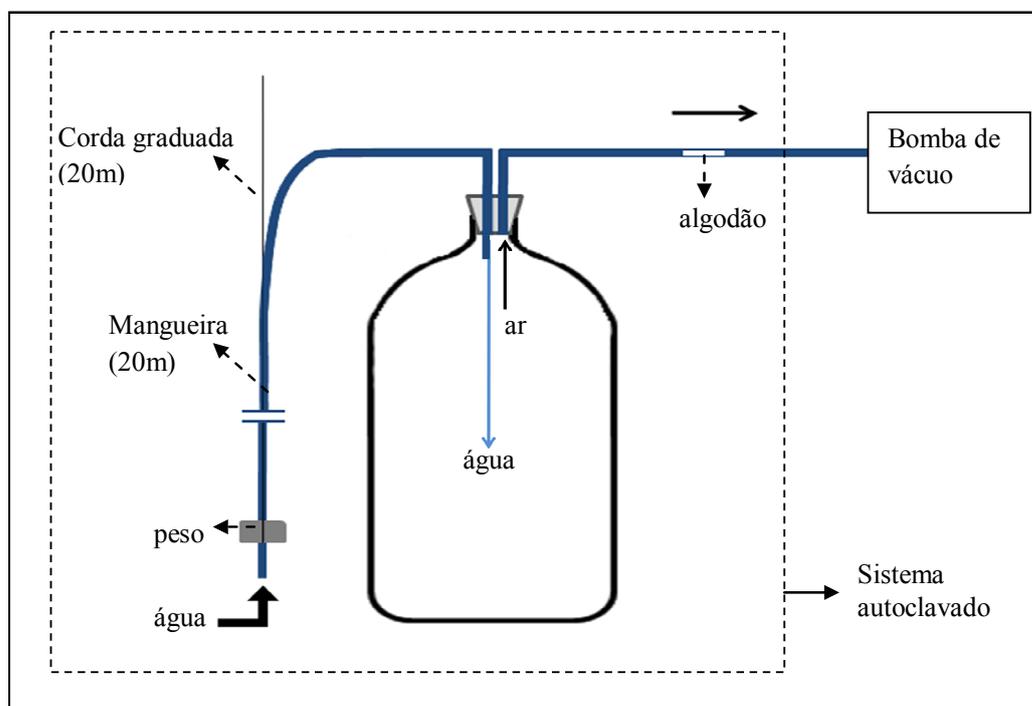


Figura 3. Esquema do sistema de amostragem utilizado para a coleta da água do reservatório de Barra Bonita para compor o inóculo bacteriano. A entrada de água permanece tampada e é aberta apenas dentro da água; o algodão, autoclavado com o sistema, é colocado na mangueira ligada à bomba para evitar contaminação por bactérias aéreas.

3.3. *Experimento I*

3.3.1. *Condições de cultivo*

Foram feitas duas culturas de *A. spiroides* (chamadas de réplica 1 e réplica 2), com volume final de 8 litros, em frascos de 9 litros de capacidade, em meio ASM-1, pH 7,0 (Gorham 1964). Para iniciar o cultivo em cada frasco de cultura adicionou-se 125 mL de um inóculo de *A. spiroides*, que se encontrava no início da fase exponencial de crescimento, e 375 mL de inóculo bacteriano proveniente do reservatório de Barra Bonita. As culturas foram incubadas sob condições controladas de iluminação (80 ± 20 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fotoperíodo (12:12 h) e temperatura (23 ± 1 °C).

3.3.2. *Monitoramento das culturas*

Foram monitorados o crescimento de *A. spiroides*, assim como o crescimento e mudança da composição na comunidade de bactérias heterotróficas aderidas à cianobactéria (BA) e das bactérias livres na cultura (BL) (Figura 4). Para tanto, as bactérias aderidas à mucilagem das células foram operacionalmente definidas como aquelas que permaneceram com a cianobactéria depois que esta foi filtrada em tela de nylon com poros de 12-20 μm , segundo o proposto por Worm e Søndergaard (1998) e lavadas com água ultrapura autoclavada para melhor remoção das células livres. A eficiência da separação das células livres foi conferida em uma amostra de uma cultura de *A. spiroides* inoculada com bactérias do reservatório de Barra Bonita, no início da fase estacionária, após filtração em tela de nylon (12-20 μm) e lavagem com água ultrapura, utilizando-se de contagem direta em microscopia de epifluorescência segundo Porter & Feig (1980). Com este teste, concluiu-se que o método empregado foi eficiente, pois foram observadas poucas células livres após a filtração (Figura 5).

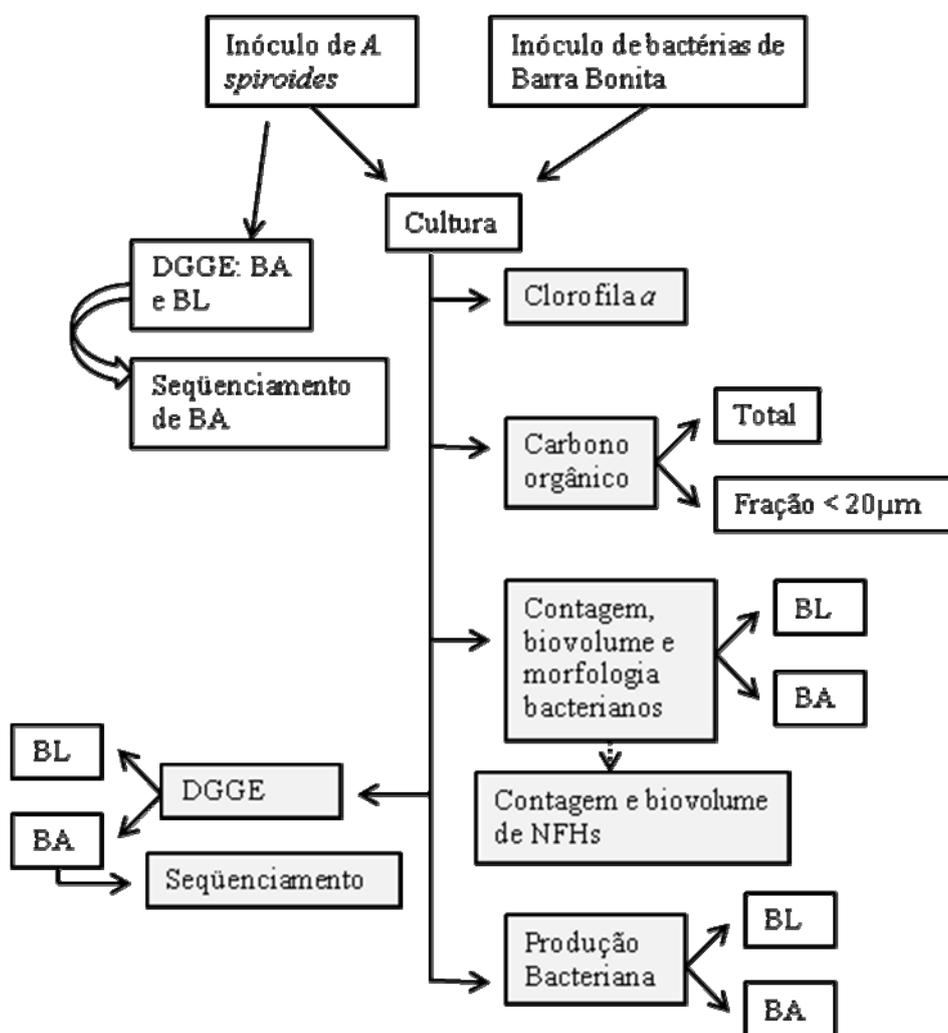


Figura 4. Diagrama do Experimento 1. As amostragens para as análises foram feitas em duas culturas (réplicas) durante o crescimento de *A. spiroides*. BA: bactérias aderidas a *A. spiroides*. BL: bactérias livres na cultura. NFHs: nanoflagelados heterotróficos. O inóculo de *A. spiroides* foi fracionado (entre bactérias livres e aderidas) e submetido à análise de diversidade bacteriana para monitoramento das bactérias contaminantes.

O crescimento de *A. spiroides* nas culturas foi acompanhado pela concentração de clorofila *a* e do carbono orgânico total (COT) e carbono das células (COAs), por 12 amostragens durante 35 dias de experimento.

A mudança da composição na comunidade de bactérias heterotróficas aderidas à cianobactéria (BA) e das bactérias livres na cultura (BL) foi averiguada por meio da técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) durante 37 dias de cultivo e seqüenciamento do 16S rDNA das BAs. O crescimento das bactérias nas duas frações (aderidas e livres) foi monitorado por contagem direta em microscopia de epifluorescência e pela produção bacteriana quantificada pela incorporação de [H^3]-Timidina.



Figura 5. Imagem obtida por microscopia de epifluorescência de amostra de uma cultura, no início da fase estacionária, de *A. spiroides* inoculada com bactérias do reservatório de Barra Bonita, após filtração em tela de nylon (12-20µm) e lavagem com água ultrapura.

3.3.3. *Concentração de carbono orgânico*

O carbono foi quantificado em um analisador de carbono TOC-Vcph Shimadzu. O carbono orgânico total (COT) foi medido a partir de uma alíquota integral das culturas. O carbono orgânico das células de *A. spiroides* com a cápsula e as bactérias aderidas (COAs) foi obtido pela diferença entre o COT e o carbono orgânico da fração menor do que 12-20 μ m (COB), que compreende o carbono orgânico das bactérias livres, partículas de exopolissacarídeos e carbono orgânico dissolvido.

3.3.4. *Clorofila a*

A clorofila *a* foi extraída com etanol 90% a quente (Nusch 1980), seguindo as recomendações de Marker *et al* (1980) e quantificada segundo Lorenzen (1967).

Um volume variável de acordo com o dia de amostragem (entre 25 e 70 mL) foi filtrado em filtros de fibra de vidro de 1,2 μ m de poro, em réplica. Os filtros foram armazenados a -5°C no escuro por no máximo 30 dias. No momento da extração, os filtros foram acondicionados em tubos de plástico, adicionados de aproximadamente 4 mL de etanol 90% a 80°C e macerados com um bastão de vidro. O macerado foi deixado a 4°C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para a separação da fibra de vidro e o volume de sobrenadante foi medido e armazenado em tubos limpos para a leitura em espectrofotômetro (Hewlett Packard, Diode Array Spectrophotometer 8452A) a 665 e 750 nm. Depois da primeira leitura as amostras foram acidificadas com HCl 1 M (100 μ L para cada 5 mL de amostra) e lidas novamente, após 15 minutos, nos mesmos comprimentos de onda.

3.3.5. *Densidade, morfologia e biovolume bacterianos*

A densidade, morfologia e biovolume bacterianos do experimento foram obtidos por microscopia de epifluorescência (microscópio Zeiss Axioplan 2, Jena, Germany) utilizando-se imagens capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc e tratadas com

o auxílio do software de análise de imagens Axiovision release 4.5 (Zeiss) após as amostras serem coradas com o fluorocromo DAPI ($0,5$ a $1\mu\text{g mL}^{-1}$) segundo Porter & Feig (1980) e filtradas em membranas de policarbonato de poro de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) coradas com Sudan Black.

Amostras de bactérias livres foram obtidas pela filtração de uma alíquota da cultura (volume entre 15 e $40\ \text{mL}$ dependendo do dia de amostragem) em tela de nylon (12 - $20\ \mu\text{m}$ de poro). As células de *A. spiroides* com as bactérias aderidas que permaneceram na tela de nylon foram lavadas com água ultrapura autoclavada, ressuspendidas para o volume original e sonificadas (Bransonic 1210) por 25 minutos, ou até que se observasse o rompimento das células da cianobactéria. Ambas as frações, bactérias aderidas e bactérias livres, foram fixadas com formalina (concentração final de 2%). Em teste realizado com um inóculo bacteriano proveniente de Barra Bonita, a sonificação não alterou significativamente ($\alpha = 0,05$) a quantidade ($p = 0,0860$ teste t não pareado), o biovolume médio ($p = 0,3995$ teste t não pareado), nem a morfologia das bactérias ($p = 0,0905$ teste t pareado).

O biovolume de cada célula foi calculado segundo Sun & Liu (2003) assumindo-se as fórmulas de esferóide prolato para coco e cocobacilo e de cilindro com duas hemisferas para os demais morfotipos: bacilo, espirilo (células espiraladas ou em forma de S), víbrio (bacilos ou filamentos curvados, em forma de C) e filamento. Os morfotipos foram obtidos segundo a razão comprimento/largura proposta por Racy *et al.* (2005). A partir da densidade bacteriana e do biovolume, calculou-se a biomassa por meio da multiplicação do número de células em cada amostragem pelo biovolume médio e pelo fator de conversão de $0,12\ \text{pg C}\cdot\mu\text{m}^3$ (Nagata & Watanabe 1990).

3.3.6. *Densidade e biovolume de flagelados contaminantes*

Os flagelados foram quantificados a partir da fração utilizada para contagem de bactérias livres empregando-se a mesma metodologia de contagem de bactérias (Porter & Feig 1980), porém, utilizando-se membranas de policarbonato de 0,8 μm de poro. O biovolume médio foi calculado assumindo-se morfologia celular elipsóide rotacional (Weisse 1997).

3.3.7. *Produção bacteriana*

A produção bacteriana foi quantificada com base na metodologia da incorporação da timidina tritiada ($^3\text{H-Tim}$) pelo DNA (Fuhrman & Azam 1980) com modificações (Regali-Selegim 2001). Utilizou-se timidina radioativa (atividade específica de 86 Ci mmol^{-1} - Amersham Biosciences) a uma concentração final de 17,4 nM.

Uma amostra de 25 mL de cada cultura (réplicas) foi retirada, dividida em 5 alíquotas de 5 mL e incubadas, por no máximo 1 hora, nas mesmas condições das culturas. Das cinco alíquotas, uma foi utilizada como controle (fixada com formaldeído antes da adição da timidina radioativa), uma para quantificar a produção total e três para verificar a produção, separadamente, das bactérias aderidas e das bactérias livres. Após a incubação as amostras foram fixadas com 0,5 mL de formaldeído, adicionadas de 0,3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 100% e deixadas em banho a 0°C. As frações de bactérias livres e bactérias aderidas foram separadas por filtração em tela de nylon com poros de 12-20 μm . O que passou pela tela foi diretamente recolhido em um copo de outro sistema de filtração e filtrado em membrana Millipore de Acetato de Celulose de 0,22 μm de porosidade. Após o término dessa primeira filtração, as células presas à tela de nylon foram lavadas duas vezes com 5mL de TCA 5% gelado, que também foi recolhido e filtrado na mesma membrana de acetato da filtração anterior. A membrana

de acetato com as bactérias livres foi lavada uma última vez com a solução de TCA 5%. As células de *A. spiroides* com bactérias aderidas, que ficaram presas ao nylon, foram ressuspensas em água ultrapura, filtradas em outra membrana de acetato de celulose de poro 0,22 μm e lavadas com 5 mL de TCA 5%. As membranas de acetato de celulose foram colocadas em ampolas de vidro adicionando-se em seguida 0,5 mL de acetato de etila e 3,5 mL de coquetel de cintilação (Optiphase 'Hisafe' 3 PerkinElmer) para a radioanálise (cintilador Tri-Carb 2100TR Packard).

O cálculo de produção bacteriana foi obtido a partir das taxas de incorporação de timidina tritiada (Wetzel & Likens 1991). Os valores obtidos nos controles foram subtraídos das amostras considerando-se a proporção de incorporação entre aderidas e livres. Após o cálculo da incorporação de timidina, a produção bacteriana (PB) foi estimada a partir do biovolume obtido por meio das lâminas feitas para contagem de bactérias, como descrito anteriormente, com o fator de conversão para carbono de 0,12 $\text{pgC} \cdot \mu\text{m}^3$ (Nagata & Watanabe 1990).

3.3.8. *Diversidade bacteriana*

Nas amostragens para análises de diversidade microbiana, alíquotas da cultura (entre 30 e 150mL, volume variável de acordo com o dia de amostragem) foram filtradas em filtros para seringa, previamente autoclavados com as telas de nylon (12-20 μm), e lavadas após a filtração com 20 mL de água ultrapura autoclavada para melhor remoção das células bacterianas livres. A tela, com as células da cianobactéria e bactérias aderidas, foi armazenada em tubos de 1,5 mL com etanol absoluto a -5°C até o momento das análises. As células de bactérias livres foram recuperadas do filtrado em outro filtro para seringa, com membrana de policarbonato (Millipore) com poro de 0,22 μm , acoplado ao filtro com a tela de nylon. Após alguns dias de cultivo, a quantidade de material particulado que passava pela tela de nylon tornou impossível a filtração em

membrana de poro de 0,22 μm e as células bacterianas livres foram, então, coletadas por centrifugação a 16.000 $\times\text{g}$ por 20 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS-64). Os filtros e as células recuperadas por centrifugação foram armazenados em tubos de 1,5 mL em etanol absoluto a -5°C .

3.3.8.1. Extração do DNA

A extração e a lavagem do DNA foram realizadas de acordo com Colombo (2006) modificada pela adição de extração mecânica por meio da utilização de pérolas de vidro.

As amostras foram centrifugadas a 16.000 $\times\text{g}$ para retirada do etanol e lavadas com água autoclavada. Após a obtenção do *pellet* adicionou-se 100 μL de solução de lise (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de proteinase K em tampão TE – Tris 10mM, EDTA pH 8,0) e 0,2g de pérolas de vidro (150-212 μm , Sigma-Aldrich). As amostras foram levadas ao “vortex” por 30 segundos e tratadas com banhos térmicos: 55°C por 15 minutos e mais 15 minutos a 80°C .

Após a extração, foi realizada a lavagem do material para a retirada da proteinase K e purificação do lisado, uma vez que sob esta forma o DNA não é estável por muito tempo devido à ação de nucleases (Oliveira *et al.* 2000). O material extraído foi lavado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), clorofórmio, etanol 70% e acetato de sódio (concentração final 1M) e etanol 100% (Colombo 2006). O DNA obtido foi ressuspenso em 20 μL de água ultrapura autoclavada

3.3.8.2. Amplificação do DNA

Foram realizadas amplificações da região 16S rDNA por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* 968f com grampo CG e 1401r, para o Domínio Bacteria (Heuer *et al.* 1997), que amplificam as regiões variáveis

V6, V7 e V8 do 16S rDNA . Os reagentes e suas concentrações utilizadas na mistura de reação da PCR encontram-se especificados na Tabela 1.

O programa de amplificação utilizado foi: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos; 10 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por 45 segundos e 72 °C por 2 minutos; extensão final a 72°C por 5 minutos e finalização com resfriamento a 4°C. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris-Borato-EDTA 1x (TBE). O restante do material amplificado foi utilizado para a realização do DGGE.

Tabela 1 – Concentração final dos reagentes na mistura de reação para amplificação do 16S rDNA do Domínio Bacteria.

Reagentes	Estoque	Concentração final por reação	Volume por reação (50 µL)
<i>Primer 968f</i>	10 µM	0,3 µM	1,5 µL
<i>Primer 1401r</i>	10 µM	0,3 µM	1,5 µL
Tampão da <i>Taq</i> ¹	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
dNTPs ²	1,25mM*	200 µM	8 µL
<i>Taq</i> -polimerase	5U/µL	2U	0,4 µL
DNA	---	---	4 µL
Água	---	---	28,1 µL

¹ Solução tampão da *Taq* 10X (200mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl).

² Solução de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfatados, onde N = adenosina, citidina, guanosina ou timidina). * Concentração final de cada dNTP.

3.3.8.3. DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante)

O DNA amplificado foi utilizado para eletroforese em gel de poliácridamida 6% (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) com gradiente desnaturante (DGGE) (equipamento da Scieplas). Os reagentes foram preparados de acordo com Oliveira *et al.* (2000) exceto as concentrações utilizadas de TEMED (N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina) e Persulfato de Amônio 10% que foram respectivamente de 11 e 111µL para cada 14mL de gel (Dra. Nora K. D'Águila Saavedra, comunicação pessoal). Utilizou-se um

gradiente de 40 a 60% de desnaturante (100% de desnaturante definido como 7 M de uréia e 40% [v/v] de formamida deionizada) e a eletroforese foi realizada a 65°C por 15 horas a 60V em tampão TAE 1x (0,04M de Tris; 0,02M de ácido acético glacial e 1mM de EDTA). Depois da eletroforese os géis foram corados por 30 minutos com brometo de etídio (1µg /mL de tampão TAE 1x). As imagens foram capturadas com uma câmera DC 290 Kodak com o auxílio do software Kodak 1D V.3.5.0.

Para que fosse possível comparar diferentes géis de DGGE, foram utilizados como padrões os produtos de PCR de espécies conhecidas de bactérias: *Staphylococcus epidermidis* (ou *Serratia marcescens*), *Proteus vulgaris*, *Micrococcus luteus* e *Mycobacterium stigmatis*. As respectivas bandas ocorrem nesta mesma ordem nos géis, da menor concentração (40%) à maior concentração (60%).

3.3.8.4. Seqüenciamento e Análise dos dados

Após a obtenção da imagem, as bandas do gel de DGGE foram recortadas com lâmina estéril e colocadas em tubos com 20µL de água ultrapura autoclavada, deixadas por aproximadamente 15 horas 4°C para a eluição do DNA e congeladas até a realização da PCR para seqüenciamento (Dra. Nora K. D'Águila Saavedra, comunicação pessoal). Para esta amplificação utilizou-se o mesmo par de *primers*, sem o grampo de CG e o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 49 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, extensão final a 72°C por 5 minutos e finalização com resfriamento a 4°C.

Após a amplificação o DNA foi precipitado acrescentando-se igual volume de solução de PEG 8000 (Polietilenoglicol) 20% e NaCl 1M (Lis e Schleif 1975) ao produto da PCR e lavado duas vezes com 125 µL de etanol 80%. O protocolo de purificação do DNA para seqüenciamento está descrito no Anexo 2 e foi fornecido pelo Dr. Iderval da Silva Junior Sobrinho. O material purificado foi amplificado utilizando-

se o *primer* 968f junto ao *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* e seqüenciado com *MegaBACE 500 Flex*, de 48 capilares (*GE Healthcare*) de acordo com as instruções dos fabricantes. A análise das seqüências foi feita pelo *software Sequence Analyser, Base Caller Cimarron 3.12*.

As seqüências obtidas, cujo fragmento com boa qualidade foi maior do que 200pb e com índice de qualidade (determinado pelo *software*) maior do que 85, foram procuradas no GenBank por meio do BLAST (Basic Local Alignment and Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Foram consideradas espécies análogas àquelas do BLAST, as seqüências cuja similaridade foi maior do que 96%.

A árvore filogenética foi construída utilizando-se as seqüências das linhagens análogas obtidas no BLAST e as seqüências não identificadas. Para melhor inferir os grupos dessas últimas, foram inseridas na árvore seqüências cuja filogenia já foi averiguada, obtidas no RDP II (Ribosomal Database Project II - <http://rdp.cme.msu.edu>). As seqüências foram alinhadas com o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall 1999) utilizando o ClustalW *multiple alignment* (Thompson *et al* 1994) com *gap penalties* de 15 (*gap open*) e 6,66 (*gap extend*). A árvore foi gerada pelo programa MEGA versão 4 (Tamura *et al.* 2007) empregando-se o método de máxima parcimônia com valores de *bootstrap* determinados usando 1000 réplicas.

3.4. *Experimento II*

Condições de cultivo e monitoramento das culturas

Foram feitas 6 culturas com volume final de 1,6 litros, em frascos de 2 litros de capacidade, em meio ASM-1, pH 7,0 (Gorham *et al* 1964) que foram incubadas sob condições controladas de iluminação ($100 \pm 15 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fotoper\u00edodo (12:12 h) e temperatura ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

Essas culturas foram divididas em 2 grupos de 3 culturas, sendo que em cada grupo uma cultura permaneceu como controle, ou seja, sem a adição do inóculo de bactérias e as outras duas culturas receberam 80mL de inóculo bacteriano, obtido como descrito para o experimento I.

O primeiro grupo de culturas (C1) foi inoculado com *A. spiroides* 18 dias antes de ser acrescentado o inóculo de bactérias de Barra Bonita, para que este fosse adicionado quando a cultura estivesse no final da fase de crescimento exponencial ou início da fase de senescência; o outro grupo (C2) foi inoculado ao mesmo tempo com *A. spiroides* e as bactérias.

As amostragens foram feitas nos dias 1 (18 horas), 4, 7, 10 e 16 após a adição do inóculo de bactérias para todas as culturas e ainda no 21º dia para as culturas C2. Uma vez que as culturas C1 já estavam crescendo quando o inóculo bacteriano foi adicionado, a primeira amostragem foi no 18º dia de cultivo, não havendo dados da curva de crescimento da cianobactéria até esse dia. As culturas foram monitoradas por meio das concentrações de clorofila *a* e carbono total. A metodologia empregada está descrita nos tópicos 3.3.3 (COT) e 3.3.4 (clorofila *a*).

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I

4.1.1. Crescimento da cianobactéria

O crescimento da cianobactéria quantificado pela concentração de clorofila foi bastante semelhante entre as réplicas com exceção do 29º dia de cultivo (Figura 6, Tabela 2). Embora o carbono orgânico total (COT) acompanhe o mesmo padrão obtido para clorofila-*a*, tanto o COT como o COAs foram maiores para a réplica 1 a partir do 26º dia (exceto no 37º dia) como pode ser visto na Figura 7.

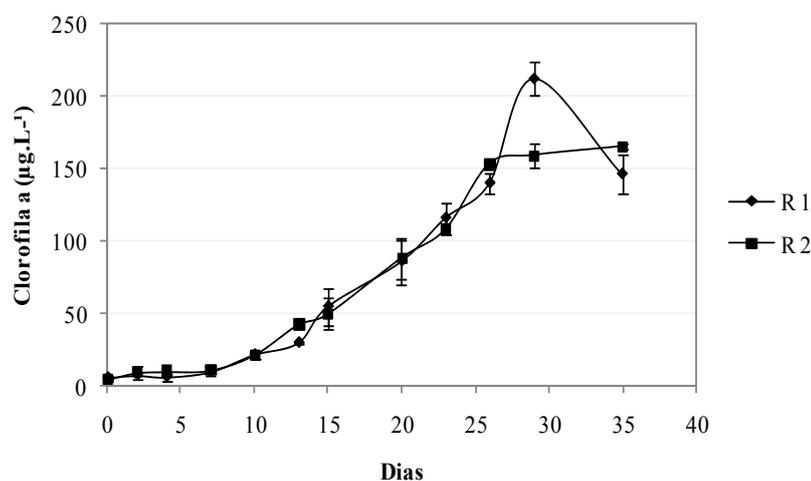


Figura 6. Concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo (em dias), para as duas culturas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. A barra de erros corresponde ao desvio padrão, que foi calculado com $n = 2$ (réplicas de amostragem).

Tabela 2. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvios-padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas réplicas 1 e 2. O desvio padrão foi calculado com $n=2$ (réplicas de amostragem).

Dia	Concentração de Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				Teste <i>t</i> de Student
	R1	DP	R2	DP	P
0	5,41	1,49	4,23	1,12	0,465
2	6,96	0,37	8,88	4,38	0,600
4	5,84	3,11	9,70	0,20	0,222
7	9,42	0,00	10,64	4,19	0,720
10	21,36	2,30	21,13	2,40	0,931
13	29,65	0,10	42,28	---	---
15	54,71	12,91	49,61	10,99	0,720
20	85,98	15,45	88,32	13,99	0,888
23	116,11	10,81	108,21	---	---
26	140,26	6,81	153,48	1,89	0,118
29	212,40	11,45	159,42	8,29	0,034*
35	146,60	13,87	165,48	1,66	0,196

* significativo; --- dados não existentes

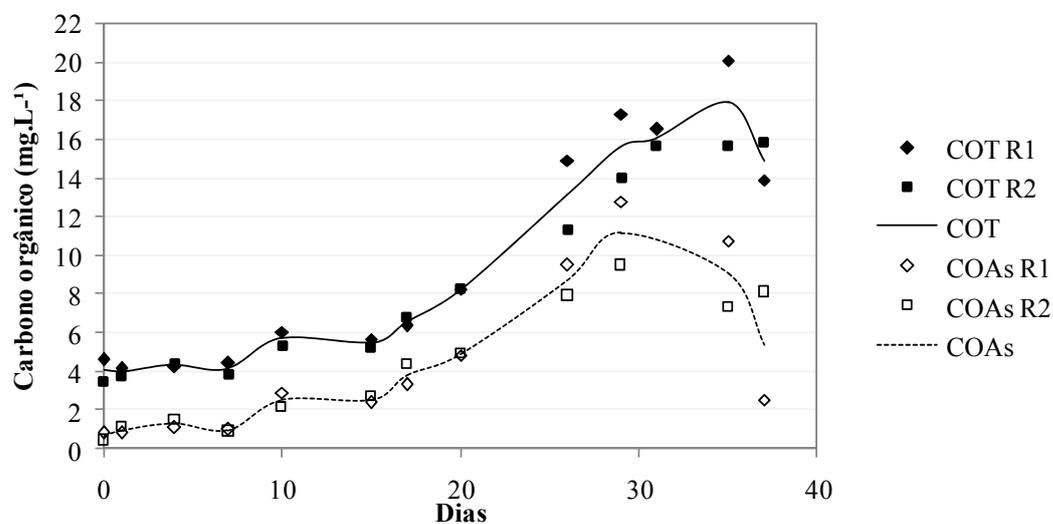


Figura 7. Concentrações (mg.L^{-1}) de carbono orgânico total (COT) e carbono orgânico das células de *A. spiroides* (COAs) em função do tempo (em dias) para as duas réplicas (R1 e R2). As linhas representam os valores médios entre as réplicas.

A concentração de COB manteve-se estável até o 20º dia de cultivo (Figura 8) com valores médios de 3,26 e 2,88 mg C.L⁻¹ nas réplicas 1 e 2, respectivamente. A partir do 26º dia, a concentração de COB foi maior para a réplica 1, assim como os valores de COT e COAs.

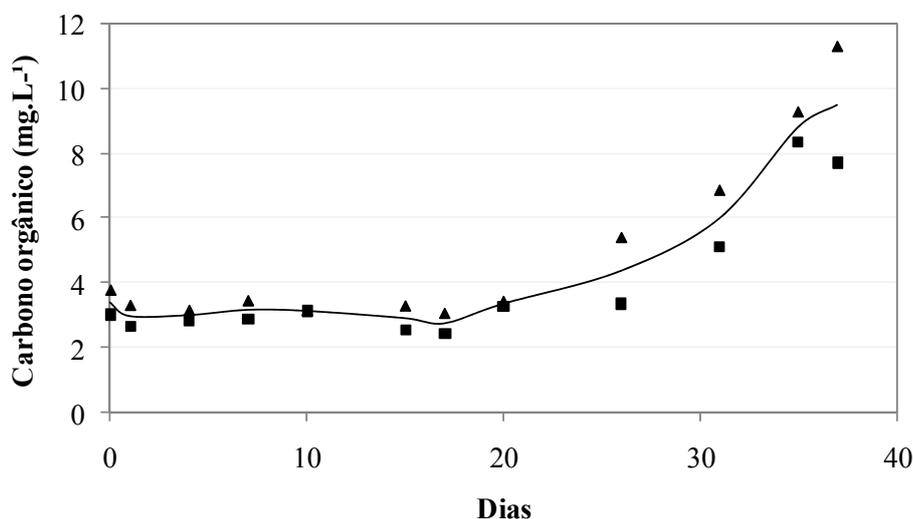


Figura 8. Concentração (mg.L⁻¹) de carbono orgânico da fração menor do que 20µm (COB) em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. Réplica 1 (▲); Réplica 2 (■). A linha representa os valores médios entre as réplicas.

4.1.2. Crescimento bacteriano

Em qualquer fase das culturas, a densidade de bactérias aderidas foi menor do que as de bactérias livres (Figura 9). A densidade de bactérias aderidas manteve-se praticamente constante até o 20º dia com média de $5,87 \times 10^5$ células.mL⁻¹. A partir desse dia, até o final do experimento, houve um crescimento exponencial. As densidades máximas de bactérias aderidas foram de $1,45 \times 10^7$ células.mL⁻¹ para a réplica 1 e $1,35 \times 10^7$ células.mL⁻¹ para a réplica 2.

A partir do 20º dia até o 35º dia ocorreu um aumento médio (entre as réplicas) de 13,6 vezes na densidade de bactérias aderidas, enquanto o aumento médio entre as livres no mesmo período foi de aproximadamente 4 vezes.

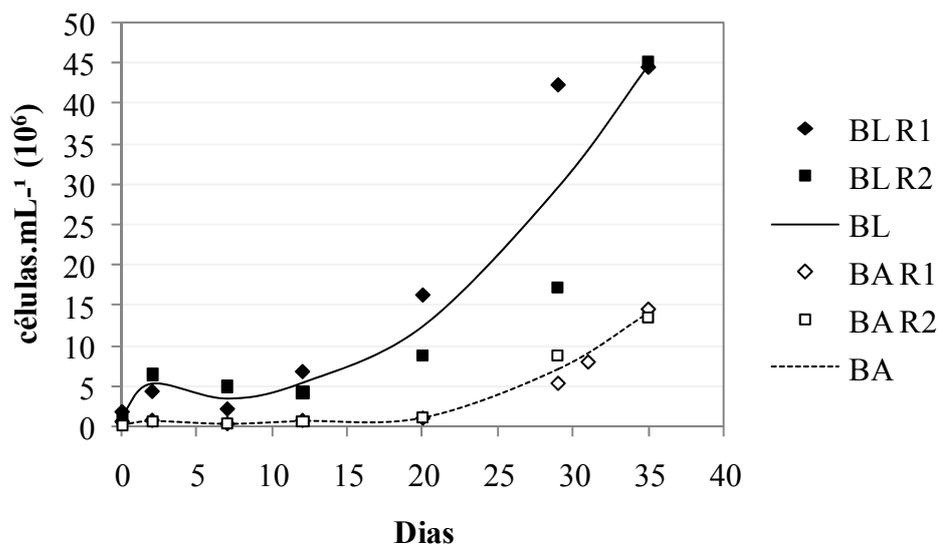


Figura 9. Densidade ($\text{células.mL}^{-1} \times 10^6$) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* (BA) e das bactérias livres na cultura (BL) em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas.

Com relação às bactérias livres a densidade variou um pouco mais entre as réplicas, com maiores diferenças nos dias 20 e 29, nos quais a densidade de bactérias livres na cultura 1 foi aproximadamente o dobro daquela da cultura 2. No entanto, ao final do experimento as densidades das duas réplicas foram praticamente iguais (Figura 9).

O crescimento das bactérias aderidas não acompanhou o crescimento da cianobactéria até o 20º dia de cultivo. Os tempos de duplicação (G) das bactérias aderidas e da cianobactéria, calculadas a partir das médias de densidade bacteriana e de concentração de clorofila das duas culturas, mostram que entre os dias 7 e 20 de cultivo o tempo de duplicação para *A. spiroides* (4,17 dias) foi menor do que o tempo de duplicação das BAs (7,01 dias). No entanto, entre o 20º e o 29º dias a duplicação foi mais rápida para as bactérias aderidas (3,26 dias), do que para a cianobactéria (8,23 dias).

O biovolume celular médio considerando-se o biovolume médio de cada dia de amostragem, embora não tenha sido estatisticamente diferente entre as réplicas ($p=0,81$ entre as livres e $p=0,94$ entre as aderidas – teste de Wilcoxon pareado) e entre aderidas e livres ($p=0,39$ na réplica 1 e $p=0,68$ na réplica 2 – teste de Wilcoxon pareado) foi ligeiramente maior para as bactérias aderidas (Tabela 3).

Tabela 3. Média dos biovolumes celulares bacterianos (BVm em μm^3) entre os dias de amostragem para as bactérias livres (BL) e bactérias aderidas (BA) a células de *A. spiroides* nas duas culturas (réplica 1 e réplica 2). DP é o desvio padrão, $n=7$.

	Réplica 1		Réplica 2	
	BA	BL	BA	BL
BVm	0,131	0,108	0,129	0,113
DP	0,088	0,040	0,066	0,028

As bactérias livres apresentaram maior biomassa (valores máximos de $4,19 \times 10^2$ ngC/L para a réplica 1 e $8,23 \times 10^2$ ngC/L para a réplica 2) do que as aderidas (valores máximos de $1,25$ e $1,51 \times 10^2$ ngC/L para as réplicas 1 e 2 respectivamente) como mostrado nas Figuras 10 e 11, em concordância com as curvas de densidade.

A produção bacteriana absoluta das bactérias livres foi maior do que das aderidas (Figuras 10 e 11) e embora a produção por célula também tenha sido, em média, maior para as bactérias livres (Tabela 4) estatisticamente não houve diferenças significativas entre as aderidas e livres da réplica 1 ($p = 0,5625$ teste de Wilcoxon pareado) nem entre as mesmas frações na réplica 2 ($p = 0,4688$ teste de Wilcoxon pareado). Em relação à réplica 2, a diferença na média de produção por célula (Tabela 4), que foi maior para as bactérias livres, deveu-se principalmente à produção nos dois últimos pontos amostrados (29 e 35° dias).

Quando comparadas ponto a ponto, por dia de amostragem, foram encontradas diferenças significativas na produção por célula entre aderidas e livres apenas no 20° dia

na réplica 1 ($p = 0,0043$ teste t de Student) e nos dias 7 e 29 na réplica 2 ($p = 0,06$ e $p > 0,0001$, respectivamente, teste t de Student). Nas análises estatísticas utilizando as médias entre as culturas não houve diferença significativa na produção bacteriana por célula entre aderidas e livres em nenhum dia de amostragem.

Para o cálculo da produção das bactérias aderidas da réplica 1 no 29º dia de cultivo, utilizou-se o biovolume obtido nas bactérias do 31º dia, uma vez que não há esse dado para o 29º dia.

Tabela 4. Média da produção bacteriana (PB) por célula (em $\text{ngC.h}^{-1} \times 10^{-6}$) entre os dias de amostragem para as bactérias livres (BL) e bactérias aderidas (BA) a células de *A. spiroides* nas duas culturas (réplica 1 e réplica 2). DP é o desvio padrão, $n=7$.

	Réplica 1		Réplica 2	
	BA	BL	BA	BL
PB/célula	2,98	3,60	4,16	7,75
DP	2,25	2,63	2,88	8,75

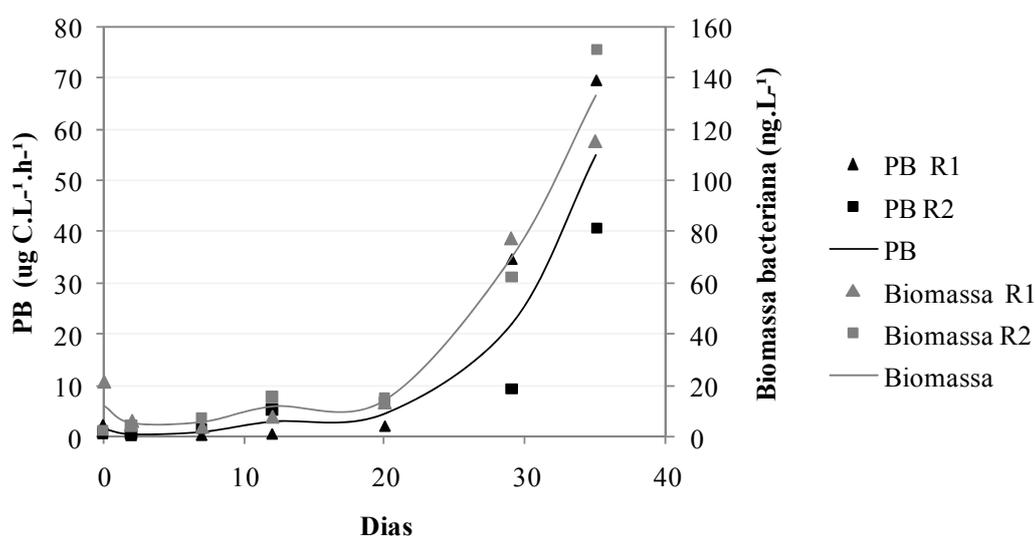


Figura 10. Produção ($\text{ngC. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e biomassa (ngC. L^{-1}) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas.

As curvas representando os valores de biomassa e produção, tanto em aderidas como em livres, acompanharam o mesmo padrão das curvas de densidade bacteriana e são condizentes com os parâmetros de crescimento de *A. spiroides*.

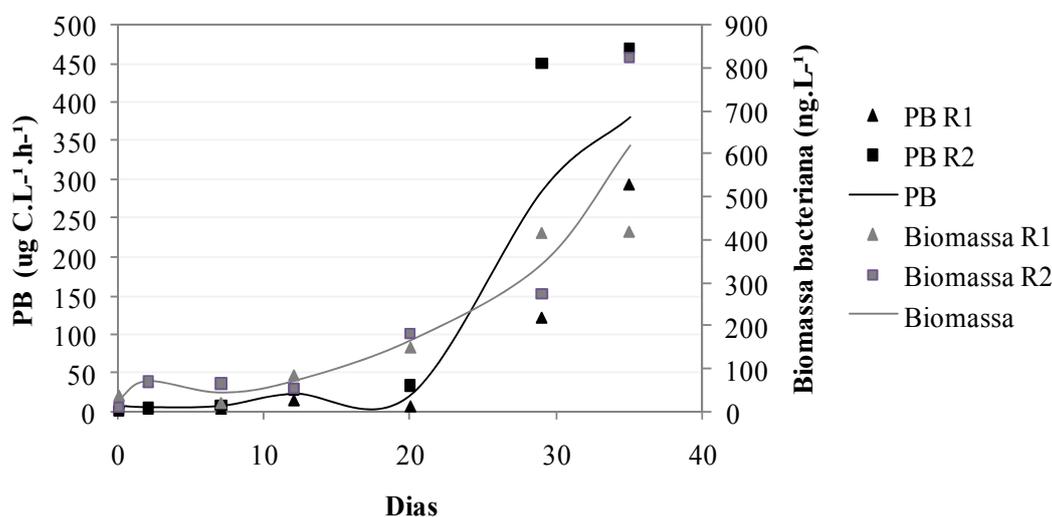


Figura 11. Produção ($\text{ngC. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e biomassa (ngC. L^{-1}) das bactérias livres na cultura em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. R1, réplica 1; R2, réplica 2. As linhas representam os valores médios entre as réplicas.

4.1.3. Diversidade de morfotipos bacterianos

Uma vez que os flagelados podem influenciar os morfotipos bacterianos encontrados, e as densidades e biovolumes dos flagelados foram diferentes entre as culturas (seção 4.1.5), a diversidade de morfotipos e de tamanhos das bactérias serão apresentados separadamente para as réplicas.

Em ambas as culturas, houve ocorrência de todos os morfotipos entre as bactérias livres no primeiro dia de cultivo (Figuras 12 e 13), sendo que o morfotipo predominante inicialmente foi “bacilo”. Até o 13º dia de cultivo houve uma diminuição na porcentagem de bacilos e um aumento de cocobacilos, principalmente, e também de cocos. A partir do 20º dia houve um aumento na porcentagem de filamentos entre as bactérias da réplica 1 (Figuras 12 e 14), enquanto que na réplica 2 percebe-se um

aumento na proporção de víbrios acompanhado de um pequeno aumento da porcentagem do morfotipo “espirilo” no 35º dia.

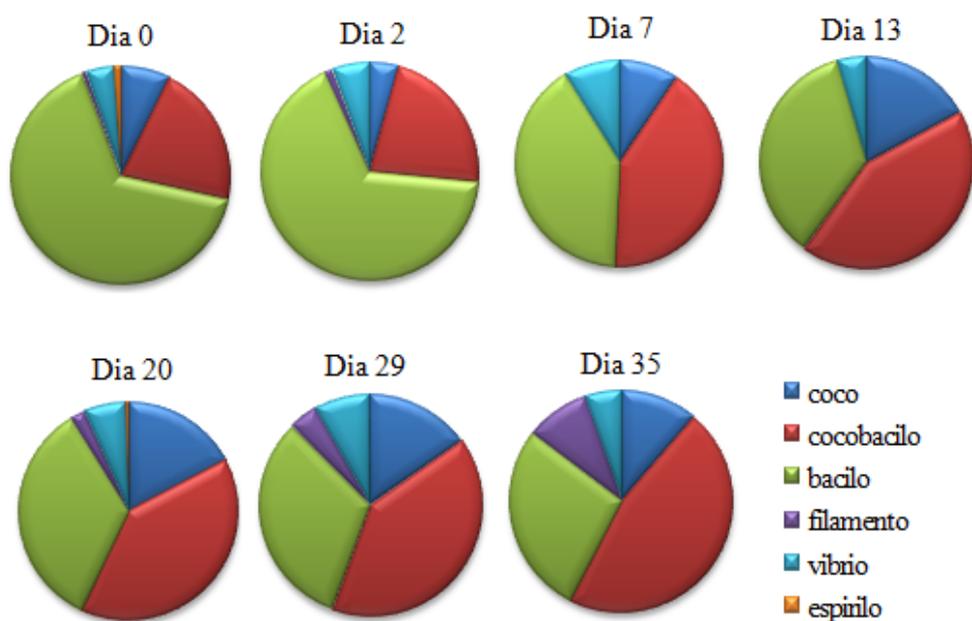


Figura 12. Proporção de morfotipos das bactérias livres na cultura 1 em diferentes dias de cultivo.

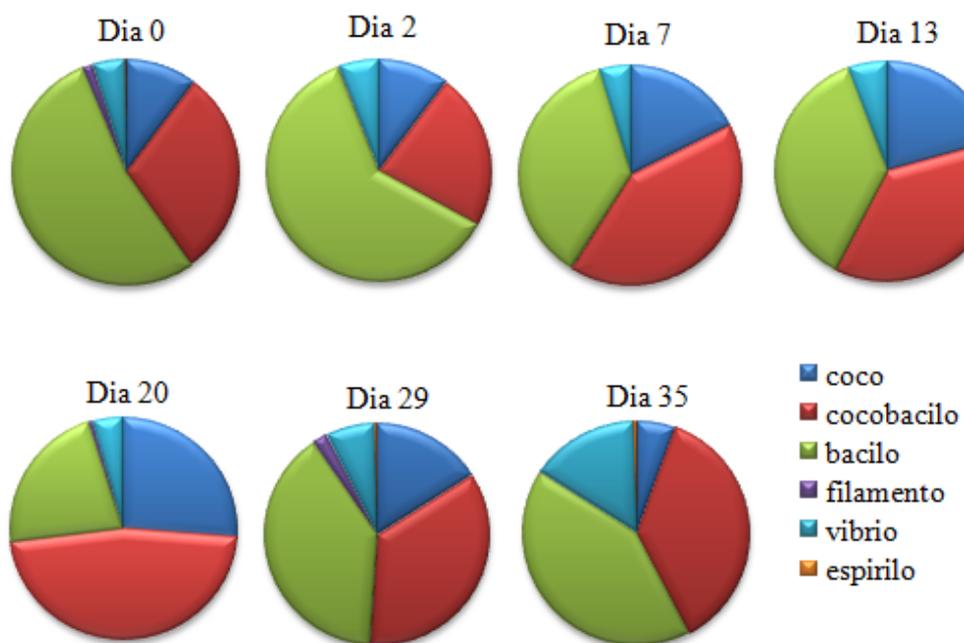


Figura 13. Proporção de morfotipos das bactérias livres na cultura 2 em diferentes dias de cultivo.

Entre as bactérias aderidas a *A. spiroides* o morfotipo predominante inicialmente foi também de “bacilo” (Figuras 15 e 16). Além desse morfotipo, no primeiro dia de experimento foram observados cocos e cocobacilos aderidos às células da cianobactéria em ambas as culturas. Na réplica 2 foram observados também os morfotipos “filamento” e “víbrio”, sendo que cada um correspondeu a apenas 2% do total de bactérias aderidas. No entanto, após o 13º dia a diversidade de morfotipos entre as bactérias aderidas foi menor na réplica 2 do que na réplica 1.

Comparando-se o número de morfotipos das bactérias aderidas no primeiro e no último dia de amostragem, não houve diferenças na réplica 2, no entanto, na réplica 1 ocorreu maior número de morfotipos ao final do experimento.

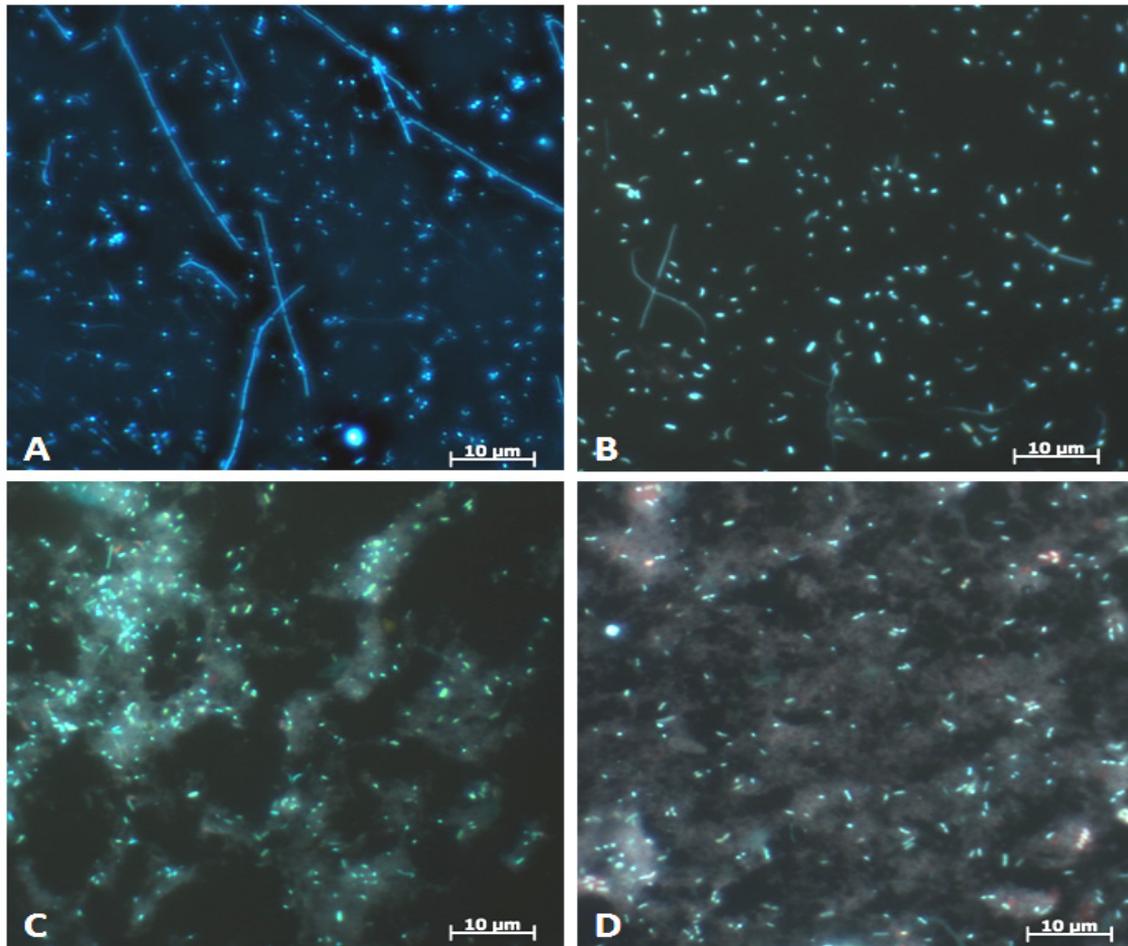


Figura 14. Fotomicrografia de células bacterianas coradas com DAPI. (A) bactérias livres na cultura 1 no 29º dia de cultivo. (B) bactérias livres na cultura 2 no 29º dia de cultivo. (C) bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 1 no 35º dia de cultivo. (D) bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 2 no 35º dia de cultivo.

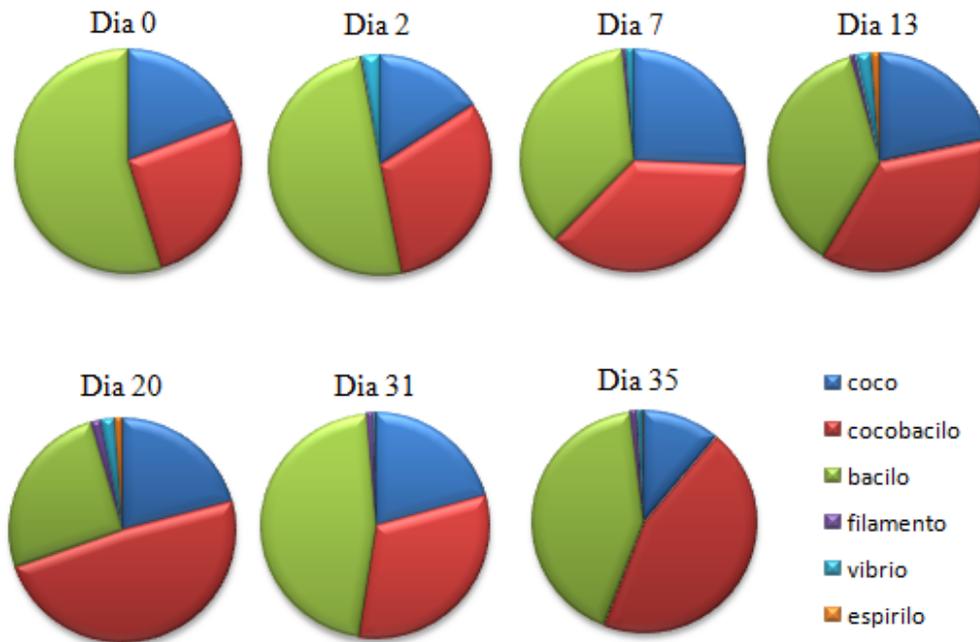


Figura 15. Proporção de morfotipos das bactérias aderidas a *A. spiroides* na cultura 1 em diferentes dias de cultivo.

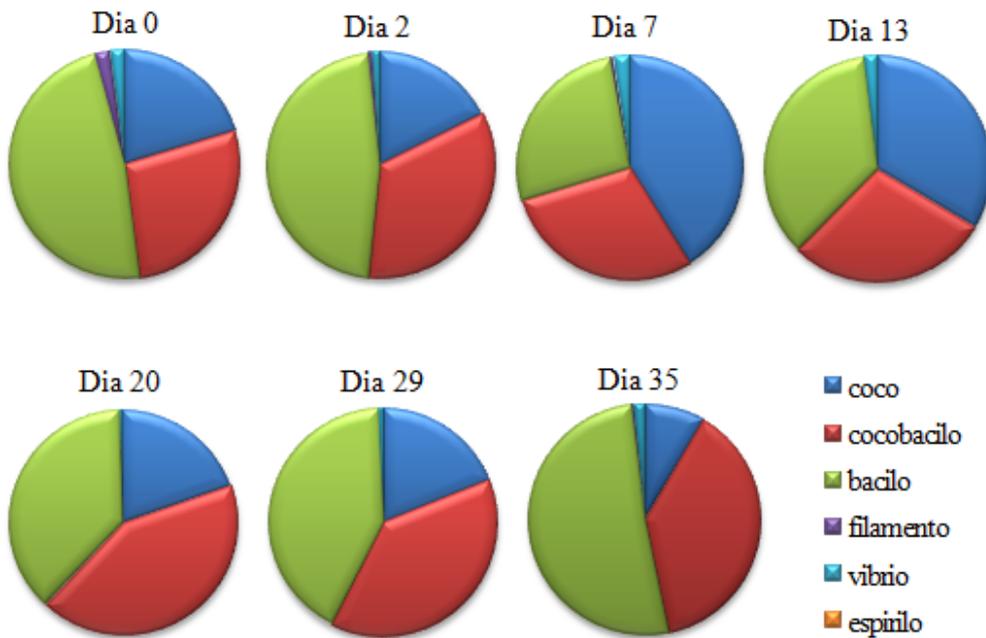


Figura 16. Proporção de morfotipos das bactérias aderidas a *A. spiroides* na cultura 2 em diferentes dias de cultivo.

4.1.4. *Frequências relativas das bactérias separadas por classes de tamanho (comprimento).*

Uma vez que a principal diferença entre bacilos e filamentos é a razão comprimento/largura das células, o aumento de filamentos na fração das bactérias livres na réplica 1 também pode ser visto por meio da separação das bactérias por classes de comprimento. Com essa separação, observou-se que desde o início até o final do experimento houve uma diminuição da frequência relativa das bactérias com comprimento maior ou igual a 0,8 μm entre as bactérias livres, exceto na classe maior do que 2,4 μm na réplica 1 (Figuras 17 e 18). Concomitantemente ocorreu aumento nas classes entre 0 e 0,8 μm .

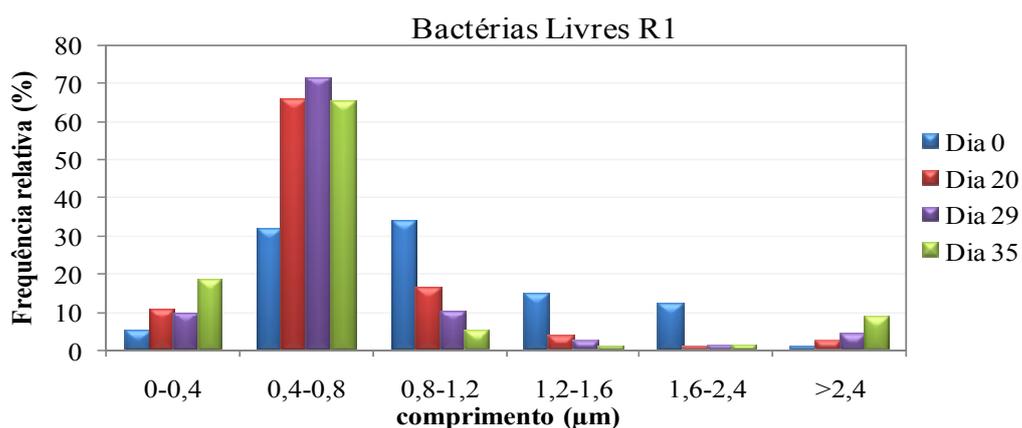


Figura 17. Frequência relativa (%) das bactérias livres na cultura 1, separadas por classes de comprimento celular, em 4 dias de amostragem: 0, 20, 29 e 35.

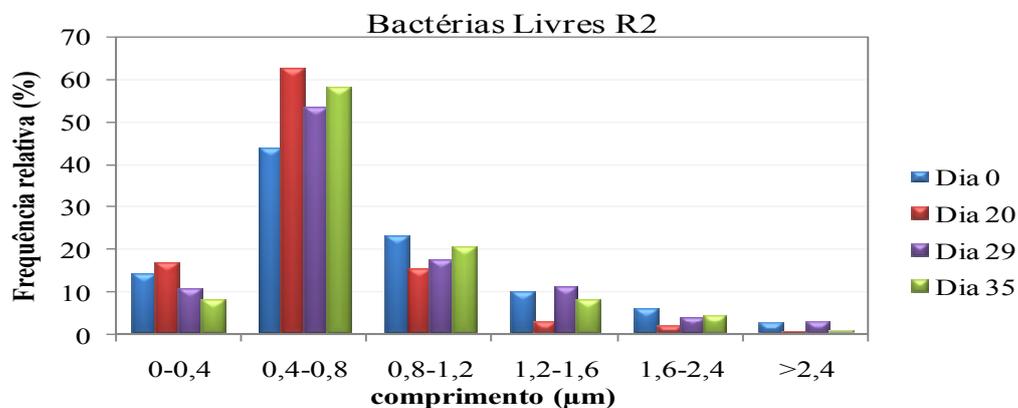


Figura 18. Frequência relativa (%) das bactérias livres na cultura 2, separadas por classes de comprimento celular, em 4 dias de amostragem: 0, 20, 29 e 35.

As mudanças de classes de tamanho foram mais acentuadas na réplica 1 do que na réplica 2 tanto nas bactérias livres como nas aderidas. Entre as bactérias aderidas foi verificada uma menor proporção das bactérias de maior comprimento (Figuras 19 e 20).

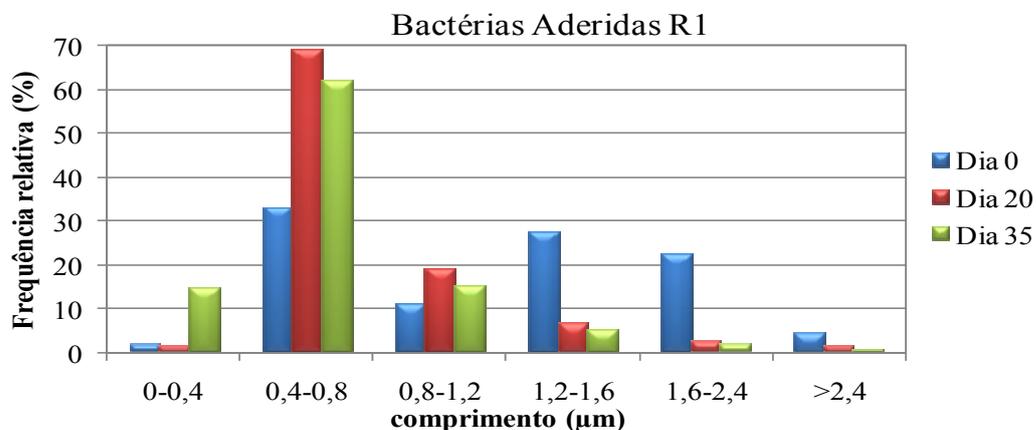


Figura 19. Frequência relativa (%) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 1, separadas por classes de comprimento celular, em 3 dias de amostragem: 0, 20 e 35.

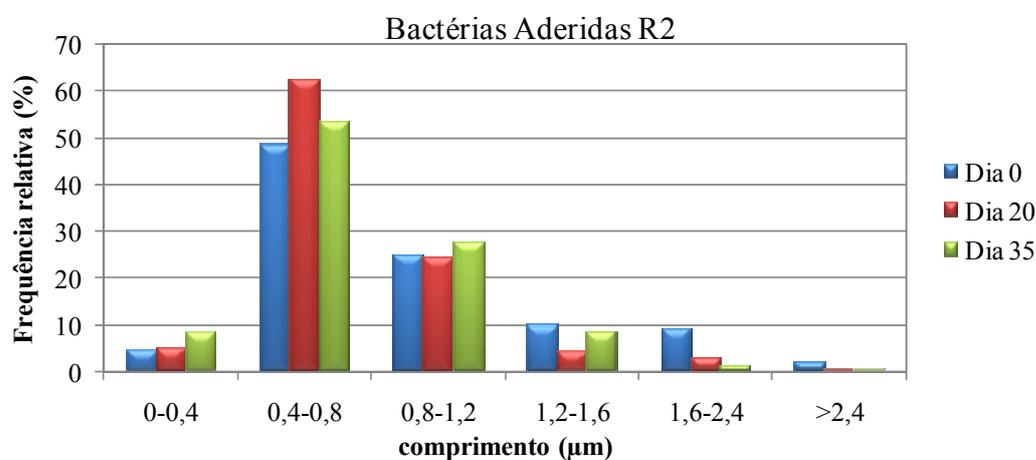


Figura 20. Frequência relativa (%) das bactérias aderidas a *Anabaena spiroides* na cultura 2, separadas por classes de comprimento celular, em 3 dias de amostragem: 0, 20 e 35.

4.1.5. Crescimento de nanoflagelados heterotróficos

No 7º dia foi constatada a presença de NFHs contaminantes, que foram inoculados juntamente com as bactérias por não terem sido retidos nos filtros de fibra de vidro de 1,2 μm de poro. A densidade dos NFHs manteve-se estável até o 20º dia de

cultivo, a partir do qual o número aumentou consideravelmente (Figura 21), alcançando os valores de $7,73 \times 10^4$ NFH $\times \text{mL}^{-1}$ na réplica 1 e $5,38 \times 10^4$ NFH $\times \text{mL}^{-1}$ na réplica 2 no final do experimento (35° dia).

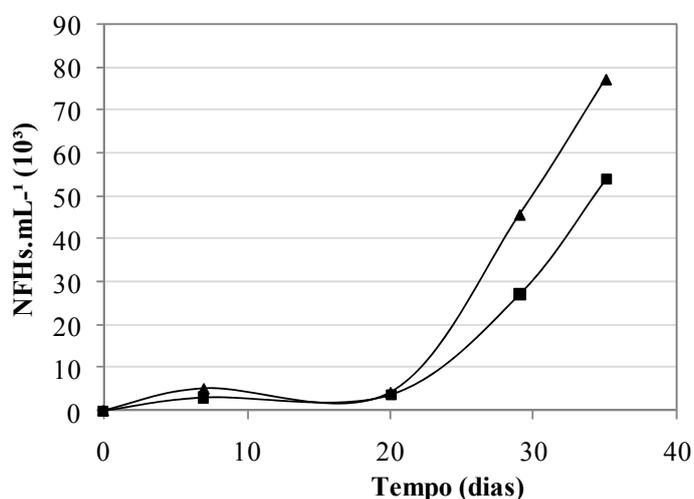


Figura 21. Densidade (células.mL⁻¹ x 10³) de nanoflagelados heterotróficos em função do tempo (em dias), para as duas réplicas. Réplica 1 (▲); Réplica 2 (■).

O biovolume médio dos NFHs (média ponderada, considerando-se a densidade dos flagelados nos diferentes dias de amostragem) foi significativamente maior ($p=0,0288$ teste t de Student) na réplica 1 do que na réplica 2, com valores de $26,00$ e $18,53 \mu\text{m}^3$ respectivamente. A Figura 22 mostra uma fotomicrografia das lâminas preparadas para contagem de flagelados em ambas as culturas no 29° dia cultivo.

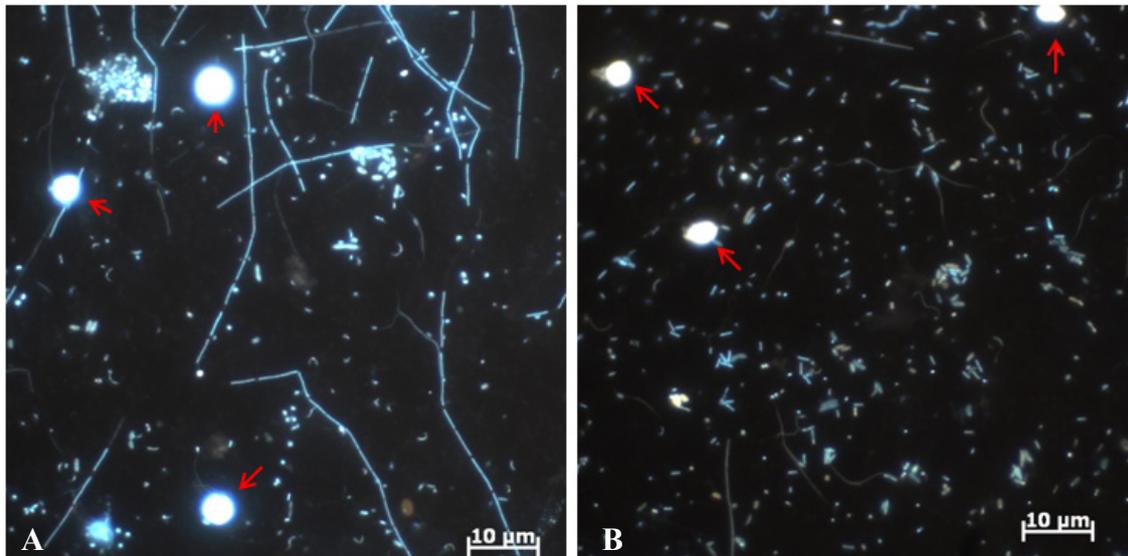


Figura 22. Fotomicrografia de células bacterianas e de nanoflagelados heterotróficos (setas vermelhas) coradas com DAPI no 29º dia de cultivo. (A) células livres na Réplica 1. (B) células livres na Réplica 2. As amostras foram filtradas em membrana de policarbonato de 0,8 μm de poro.

4.1.6. *Diversidade bacteriana*

Embora Stackebrandt & Goebel (1994) tenham encontrado que espécies similares compartilham pelo menos 97% de similaridade, neste trabalho foram consideradas espécies análogas àquelas do BLAST, as seqüências cuja similaridade foi maior do que 96%, uma vez que algumas bandas que representam a mesma seqüência de acordo com a altura no gel de DGGE foram similares à mesma linhagem cadastrada no BLAST, porém com semelhança variável: uma com 96% e outra(s) com mais de 97% de similaridade (Figura 24, Tabela 5).

A análise dos géis de DGGE mostra que há um maior número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) nas amostras de bactérias livres, em qualquer fase da cultura (Figuras 23 e 24). As bandas do gel de bactérias livres não foram seqüenciadas, sendo que este está sendo apresentado apenas para comparação do número de UTOs com as bactérias aderidas.

Um problema encontrado nesta etapa foi a documentação dos géis, uma vez que algumas bandas com intensidade menor, que eram observadas diretamente, não apareciam nas imagens capturadas, devido à limitação do sistema de documentação utilizado. Para contornar esse problema, o gel foi desenhado antes de proceder-se à retirada das bandas, respeitando as distâncias entre elas. Estão apresentadas aqui as fotos dos géis sem as bandas mais fracas e não alinhadas e o desenho dos géis das bactérias aderidas com essas bandas já adicionadas e alinhadas utilizando como referência a linha de bandas que representam *A. spiroides* (linha 6, Figura 24) e bactérias utilizadas como padrões (seção 3.3.8.3. e Figura 24).

Na Figura 24 estão apresentados dois géis, o primeiro feito a partir do DNA extraído como descrito na metodologia (A_1) e o segundo com o DNA re-extraído a partir do material restante da primeira extração (A_2). A realização de uma segunda extração deveu-se ao fato de que o polissacarídeo capsular de *A. spiroides* pudesse ter dificultado a extração do material genético das bactérias aderidas, além do que a grande quantidade de DNA da cianobactéria pudesse estar prejudicando a amplificação do DNA das bactérias heterotróficas presentes em menor número. Uma vez que nem todas as bandas foram retiradas para posterior sequenciamento, aquelas que se encontravam na mesma altura nos três géis (A_1 , A_2 e Inóculo) foram consideradas como sendo representantes do mesmo microrganismo.

Os padrões de bandas das bactérias presentes no inóculo de *A. spiroides* estão apresentados nas Figuras 23 e 24 indicados pelas legendas BA (bactérias aderidas) (Figura 24) e BL (bactérias livres) (Figura 23).

Bactérias presentes no inóculo de A. spiroides

As bactérias aderidas presentes no inóculo de *A. spiroides* foram detectadas nas culturas inoculadas até o 13º dia de cultivo (Tabela 7, Figura 24). A bactéria de solo não

identificada clone 24, uma Acidobacteria (bandas 30A₁, 13A₂, 14Ac e 15Ac) foi detectada até o 13º dia de cultivo. As outras espécies presentes no inóculo são da subdivisão Alphaproteobacteria: *Rhodobacter* sp. não cultivada clone PSB-M-1 (bandas 15A₂ e 18Ac, linha 8 Figura 24), detectada somente até o 7º dia de cultivo nas culturas inoculadas e uma bactéria não cultivada clone Jul-eub3 (bandas 20Ac e 17A₂), detectada apenas na réplica 2 nos dias 7 e 13. Ambas Alphaproteobacteria ocorreram também entre as bactérias livres do inóculo (Figura 23).

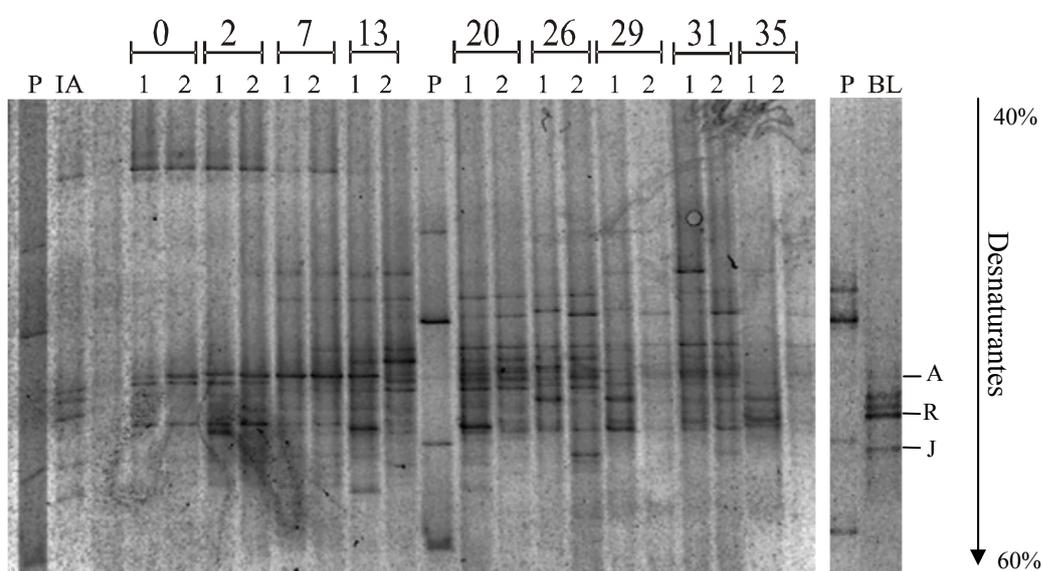


Figura 23 – Gel de DGGE das bactérias livres. IA, representa o inóculo da cultura de *A. spiroides*; P, padrão. Os números acima das faixas em cada gel representam as réplicas, 1 ou 2, agrupadas por dia de amostragem (0, 2, 7, 13, 20, 26, 29, 31, e 35). A: banda referente a *A. spiroides*; R: banda referente a *Rhodobacter* sp.; J: Banda referente à Alphaproteobacteria clone Jul-eub3.

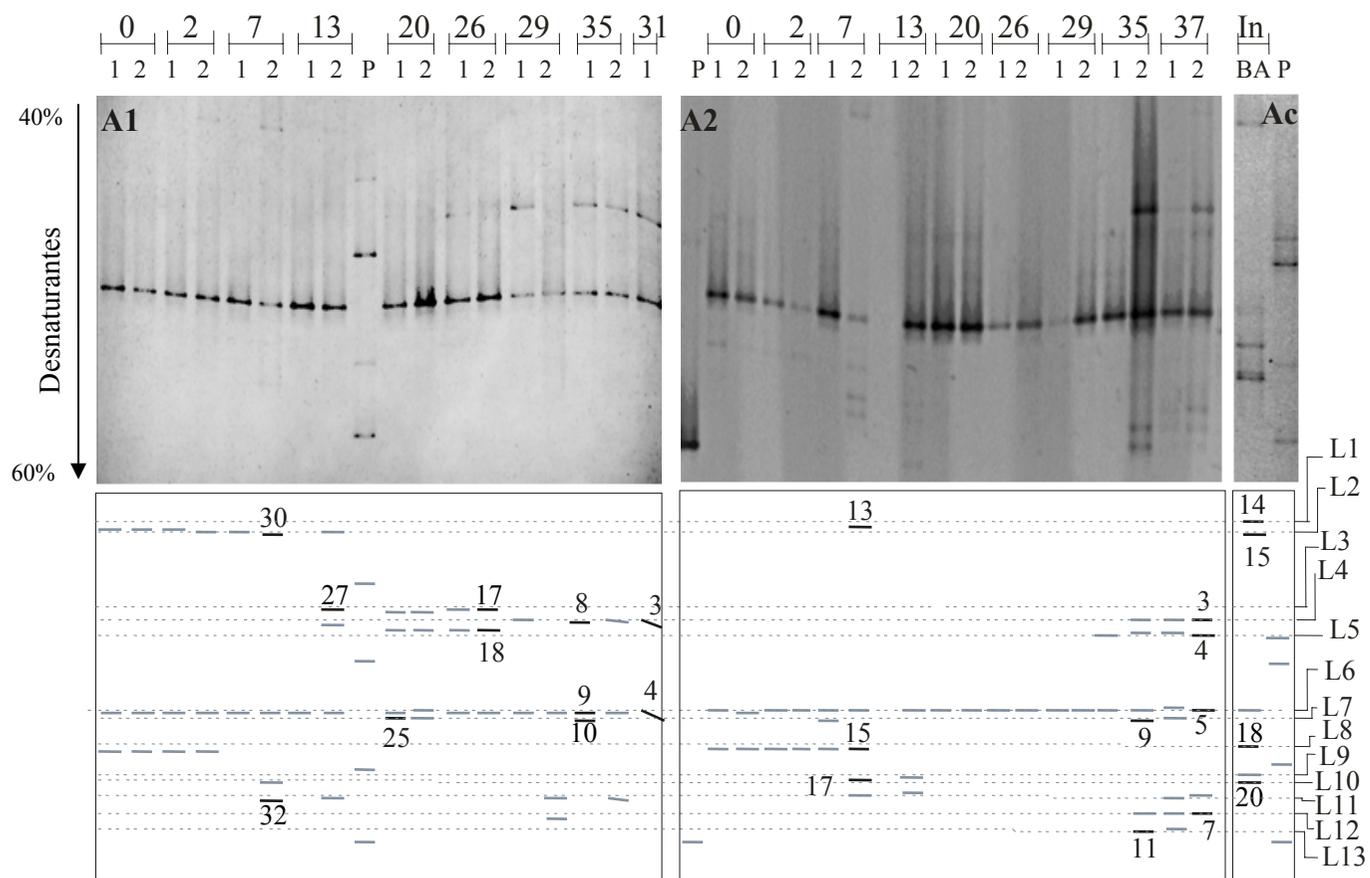


Figura 24 – Géis de DGGE e desenho do padrão de bandas das bactérias aderidas. A1, extração 1; A2, extração 2; Ac, inóculo de *A. spiroides*; P, padrão. Os números acima das faixas em cada gel representam as réplicas, 1 ou 2, agrupadas por dia de amostragem. No desenho das bandas os números representam as bandas recortadas e seqüenciadas. L(x) são as linhas que agrupam as bandas consideradas como sendo representativas da mesma espécie.

Tabela 5 - Bactérias aderidas a *A. spiroides* (incluindo a cianobactéria) identificadas pelo seqüenciamento das bandas recortadas (Figura 24), grupo ao qual pertencem, similaridade obtida no BLAST e fase em que foram detectadas na cultura. As seqüências com menos de 96% não foram consideradas como espécies similares. xA₁ e xA₂, bandas obtidas na extração 1 e 2 respectivamente; xAc, bandas obtidas no inóculo de *A. spiroides*; S, senescência; In, inóculo e início da cultura (até 13º dia).

Eubacteria identificada (número de acesso no BLAST)	Bandas seqüenciadas	Grupo	Similaridade	Fase
<i>Anabaena spiroides</i> linhagem PMC9702 (AJ293118)	5A ₂ , 10A ₁	Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae	97-98%	-
<i>Anabaena spiroides</i> LMECYA 161 (EU078524)	4A ₁ , 4A ₂ , 9A ₁ , 9A ₂ , 17A ₁ , 18A ₁ , 25A ₁ , 27A ₁ , 42A ₁	Cyanobacteria; Nostocales; Nostocaceae	96-99%	-
Bactéria não cultivada clone CJRC133 (DQ202186)	7A ₂	Proteobacteria; Deltaproteobacteria *	96%	S
Bactéria não cultivada clone Jul-eub3 (DQ363601)	17A ₂ , 20Ac	Proteobacteria; Alphaproteobacteria	96-98%	In
Uncultured <i>Rhodobacter</i> sp. clone PSB-M-1 (AY128090)	18Ac, 15A ₂	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	96-97%	In
Bactéria de solo não identificada clone 24 (AM168160)	13A ₂ , 14Ac, 15Ac, 30A ₁	Acidobacteria	97-99%	In
Bactéria não cultivada clone RL304_aal73h02 (DQ824276)	3A ₁ , 3A ₂	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales *	88%	S
<i>Lactobacillus equi</i> (AB048833)	8A ₁	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales *	88%	S
<i>Dechloromonas</i> sp. EMB 50 (DQ413149)	32A ₁	Proteobacteria; Betaproteobacteria *	89%	Após 7º dia** e S
não identificado	11A ₂	não identificado		S

* sugerido também pela construção da árvore filogenética

** apenas na cultura 2

Bactérias provenientes do inóculo de Barra Bonita

Observa-se para as bactérias aderidas uma mudança na composição bacteriana que se inicia no 7º dia com o aparecimento da UTO 32A₁ (banda 32 – gel referente à extração 1 – Figura 24). No entanto, esta UTO aparece apenas na réplica 2, e nos dias 7 e 13. Este microrganismo corresponde, provavelmente, a uma Betaproteobacteria (Figura 24). Outras bandas em altura bastante próxima a esta aparecem na cultura 2 no 29º dia e nas duas culturas no 37º dia de cultivo, no entanto, não foi possível o seqüenciamento para verificar se correspondem à mesma bactéria. Apesar disso, existe a possibilidade de que esta UTO não tenha sido detectada entre nos dias 20 e 26 devido a vieses da amplificação, como será discutido posteriormente.

Entre os dias 20 e 26 não foram observadas bandas correspondentes a bactérias associadas, provavelmente, devido à limitação da técnica. Verificou-se após o seqüenciamento que as diferentes bandas que ocorreram nesses dias de amostragens são todas de *A. spiroides*. No entanto, os vieses do DGGE, como a ocorrência de mais de uma banda para o mesmo indivíduo, podem ser esclarecidos com o seqüenciamento das bandas (Boutte *et al.* 2006), não atrapalhando a análise dos resultados.

A partir do 29º dia, quando as culturas entraram em fase estacionária/senescência, notou-se uma mudança da comunidade bacteriana associada a *A. spiroides*, em ambas as culturas. Na linha 4 da Figura 24, cujas bandas seqüenciadas foram 3A₁, 8A₁ e 3A₂, constatou-se que o material genético pertence a uma espécie não cadastrada no Genbank, mas pela construção da árvore filogenética (Figura 25) foi comprovado que correspondem à mesma espécie, que é provavelmente uma bactéria do filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales. Nesta fase de crescimento da cianobactéria ocorreram ainda outras duas UTOs (linhas 12 e 13, Figura 24). A primeira, 7A₂, foi identificada como bactéria não cultivada clone CJRC133 (número de

acesso no BLAST: DQ202186), pertencente, segundo a árvore construída, ao Filo Proteobacteria, classe Deltaproteobacteria, provavelmente ordem Myxococcales. A segunda, 11A2, não apresentou similaridade da seqüência de nucleotídeos com seqüências cadastradas no BLAST. No RDP II esta seqüência, de 396pb, apresentou baixa similaridade (entre 67 e 68%) com três grupos: Betaproteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria. No entanto, na maioria das árvores construídas (dados não apresentados), ficou como um grupo externo, assim como na árvore apresentada (Figura 25).

No 35º notou-se a presença de agregados sem células de *A. spiroides* nas culturas, que poderiam ficar retidos nos filtros utilizados para separar os filamentos da cianobactéria e bactérias aderidas. Alguns agregados foram isolados da cultura 1 neste dia e submetidos à análise de diversidade bacteriana para verificar possíveis interferências nos resultados obtidos para as bactérias aderidas. A separação do produto da PCR deste material em gel de DGGE forneceu apenas três bandas (dados não apresentados), sendo que duas foram seqüenciadas e identificadas como: *A. spiroides* e uma bactéria do Filo Verrucomicrobia não cultivada. Esta bactéria apresentou 98% de similaridade a 6 clones de Verrucomicrobia. A outra banda não seqüenciada ocorreu na mesma posição da bactéria encontrada no inóculo: *Rhodobacter* sp.

As linhagens cadastradas no GenBank com similaridade mais próxima às seqüências obtidas neste trabalho, seus respectivos grupos, similaridade e bandas cujo DNA foi seqüenciado estão apresentadas na Tabela 5.

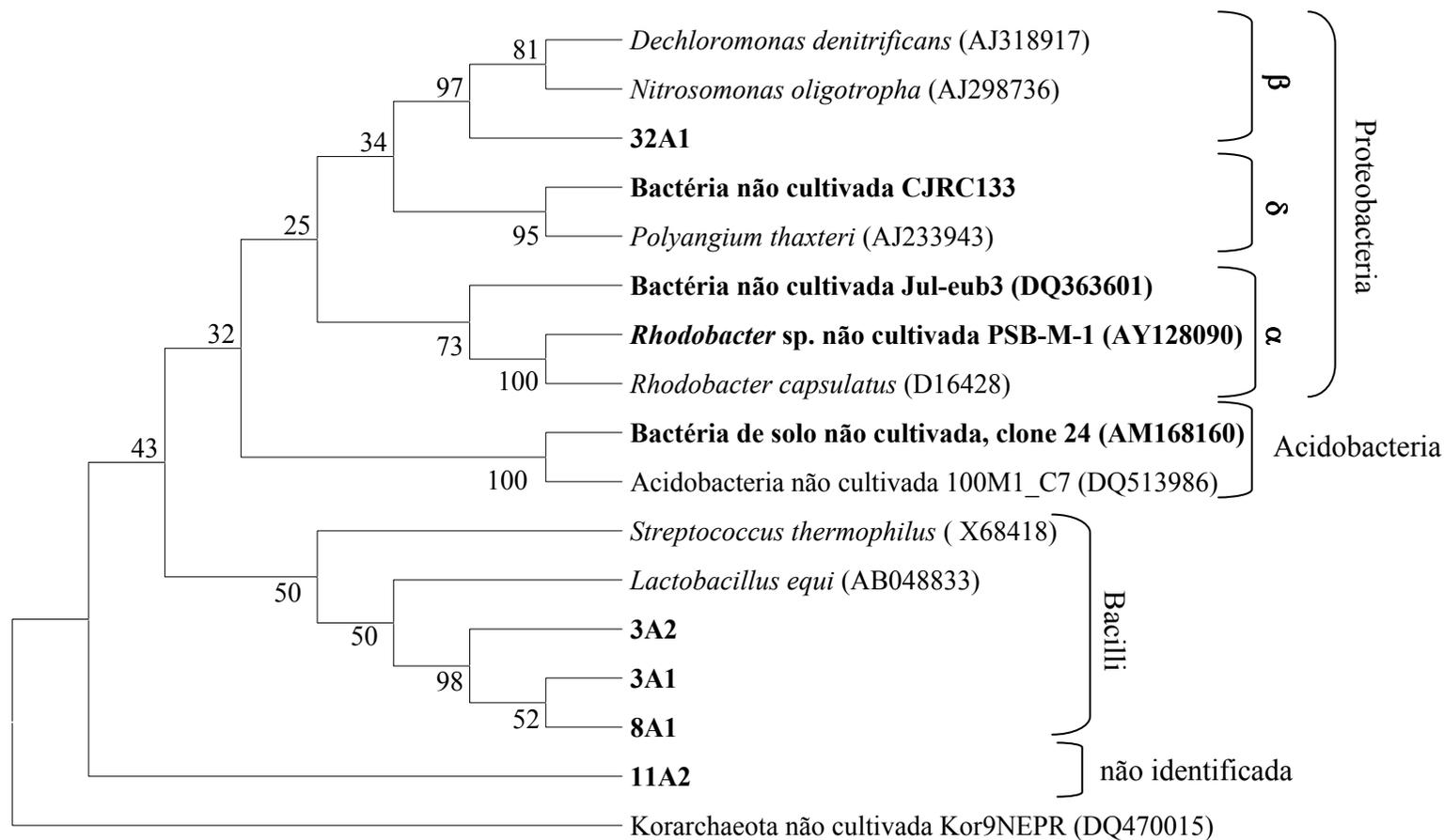


Figura 25 – Árvore filogenética utilizando o modelo de máxima parcimônia, com as bactérias associadas a *A. spiroides* (em negrito) e bactérias cuja filogenia foi comprovada (exceto Korarchaeota e a Acidobacteria 100 M1_C7), obtidas no RDPII (Ribossomal Database Project II) e usadas para sugerir o grupo das bactérias não identificadas. Uma Korarchaeota foi usada como raiz. Os números nos nós representam a porcentagem do teste de *bootstrap* de 1000 réplicas.

4.2. Experimento II

4.2.1. Crescimento da cianobactéria

Tanto as curvas de concentração de clorofila como de carbono total mostram maiores diferenças entre os tratamentos e o controle no final do experimento, para os dois grupos de culturas: C2, inoculado com água de Barra Bonita (filtrada em 1,2 μm) desde o início das culturas (Figuras 26 e 27) e C1, inoculado com água de Barra Bonita (filtrada em 1,2 μm) quando as culturas de *A. spiroides* estavam em fase estacionária de crescimento (Figuras 28 e 29).

As culturas C2 apresentaram diferenças significativas ($p = 0,0307$ teste t de Student), com maior concentração de clorofila a no controle do que nas culturas inoculadas, apenas no último dia de amostragem (21º dia de cultivo) (Tabela 6).

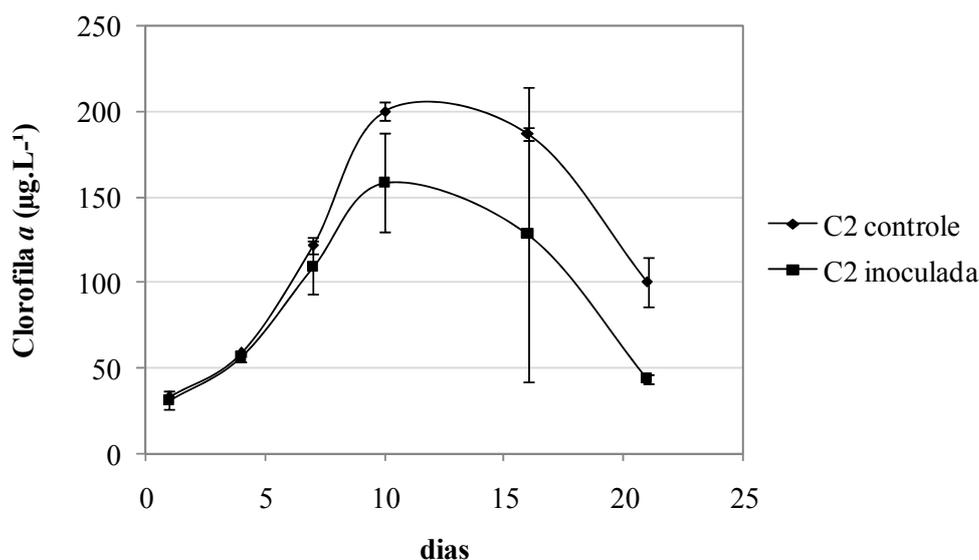


Figura 26. Concentrações de clorofila a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C2 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C2 inoculadas (2 amostragens em cada réplica de cultura).

Tabela 6. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvio padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. O desvio padrão foi calculado com $n=2$ nas culturas C2 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C2 inoculadas (2 amostragens em cada réplica de cultura).

Tempo Dias	Concentração de Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				teste <i>t</i> de Student
	C2 controle	DP	C2 inoculada	DP	P
1	32,23	0,00	31,08	5,74	0,93
4	57,97	0,76	55,77	2,61	0,32
7	121,68	5,09	108,78	15,31	0,33
10	200,19	5,07	158,42	29,00	0,13
16	187,18	3,54	128,03	86,33	0,41
21	100,05	14,14	43,32	2,70	0,03*

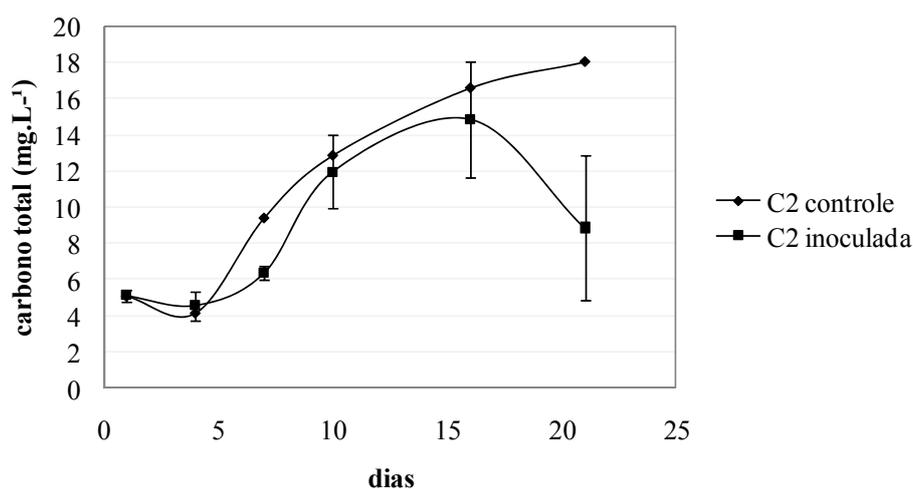


Figura 27. Concentrações carbono total (mg.L^{-1}) nas culturas C2 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C2 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C2 inoculadas (réplicas de cultura).

Já nas culturas C1, que receberam o inóculo com idade de 18 dias, e foram amostradas no 19º dia de cultivo (18 horas após receberem o inóculo), as diferenças na concentração de clorofila *a* entre as culturas inoculadas e o controle foram estatisticamente significativas apenas nos dois últimos dias de cultivo (Tabela 7), quando também foram observadas maiores diferenças nas concentrações de carbono

total (Figura 29). Embora as diferenças estatísticas não tenham sido significativas até a idade de 25 dias das culturas (7 dias após a adição do inóculo), a partir da inoculação da água de Barra Bonita houve sempre um decaimento da concentração de clorofila *a* nas culturas inoculadas, evidenciando que este inóculo acelera a morte das culturas, quando comparadas aos controles.

Nas culturas C1 o efeito do inóculo bacteriano de Barra Bonita foi significativo 9 dias após a adição deste, enquanto que nas culturas C2 o efeito no crescimento da cianobactéria foi evidente apenas 21 dias após a adição do inóculo. Esses resultados mostram maior susceptibilidade das culturas mais velhas de *A. spiroides* ao inóculo de Barra Bonita.

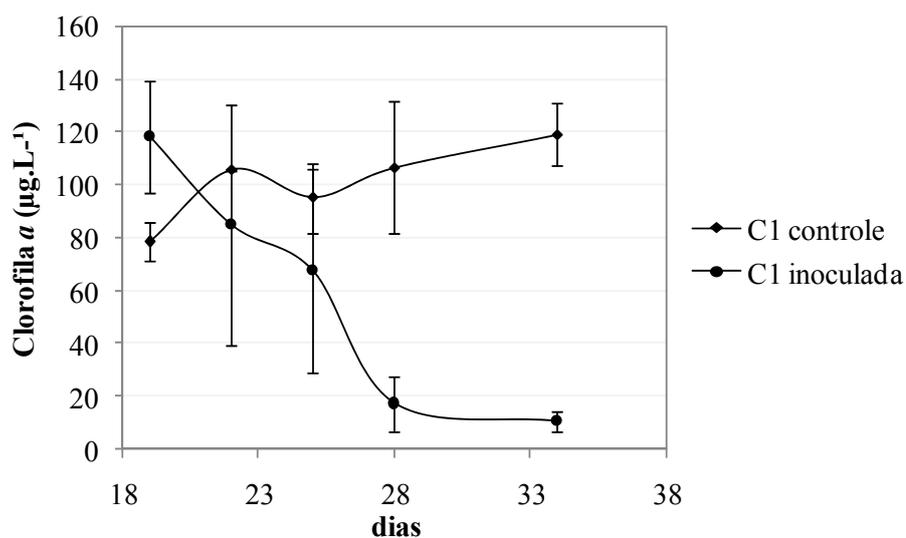


Figura 28. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão $n=2$ nas culturas C1 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C1 inoculadas (2 amostragens em cada réplica de cultura).

Tabela 7. Concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$), desvio padrão (DP) e os valores de “p” (teste *t* de Student) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. O DP foi calculado com $n=2$ nas culturas C1 controle (réplicas de amostragem) e $n=4$ nas culturas C1 contaminadas (2 amostragens em cada réplica de cultura).

Tempo dias	Concentração de Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				Teste <i>t</i> de Student
	C1 controle	DP	C1 inoculada	DP	P
19	78,50	7,42	118,10	21,17	0,0709
22	105,84	0,48	85,02	45,81	0,5478
25	95,18	13,10	67,61	38,48	0,4016
28	106,63	24,88	17,27	10,37	0,0025**
34	119,08	11,67	10,57	4,04	< 0.0001***

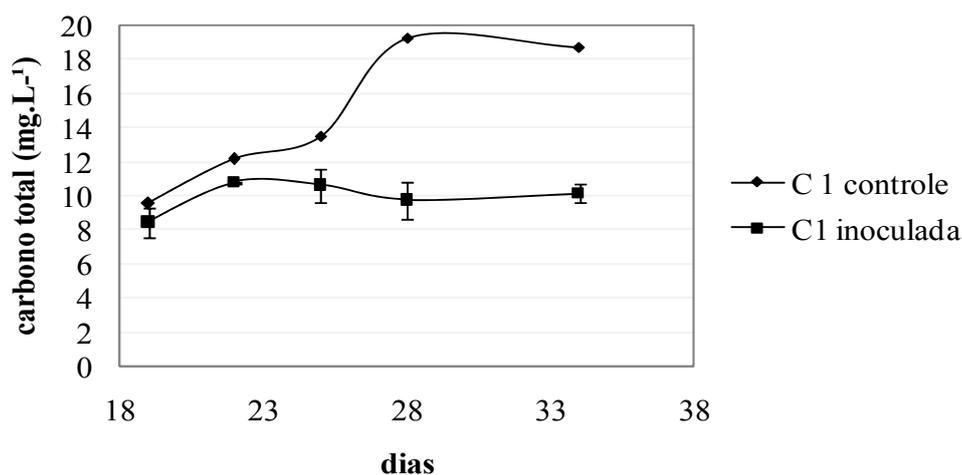


Figura 29. Concentrações carbono total (mg.L^{-1}) nas culturas C1 controle (sem adição do inóculo de Barra Bonita) e C1 inoculadas (adicionadas do inóculo de Barra Bonita) em função do tempo de cultivo. As barras representam o desvio padrão: $n=2$ nas culturas C1 inoculadas (réplicas de cultura).

5. DISCUSSÃO

5.1. *Problemas metodológicos: amplificação do DNA e DGGE*

O excesso de DNA de *A. spiroides* pode ter prejudicado a amplificação do material genético das bactérias aderidas que estavam em menor densidade em todos os dias de amostragem, mas especialmente nos dias 20 e 26 em que o crescimento da cianobactéria não foi acompanhado por aumento na densidade bacteriana aderida. Zhang *et al.* (2007b) mostraram que o DGGE detecta principalmente as linhagens dominantes nas comunidades bacterianas. Desta forma, é possível que o número de espécies aderidas tenha sido subestimado, uma vez que nos trabalhos com outras cianobactérias a quantidade de espécies de bactérias aderidas foi maior do que a encontrada neste trabalho (Eiler *et al.* 2006, Salomon *et al.* 2003) e que algumas espécies de bactérias, embora não detectadas durante toda a curva de crescimento, estivessem constantemente associadas à cápsula de *A. spiroides*. Sugere-se como medida para amenizar este problema, a sonificação das amostras para rompimento das células da cianobactéria, como realizado para proceder às contagens das bactérias aderidas, e lavagem das células restantes (bactérias) por centrifugação antes de iniciar a extração do material genético.

A grande quantidade de material genético da cianobactéria pode também ter contribuído para obtenção de seqüências idênticas a partir de bandas diferentes, uma vez que amplicons dominantes podem estar distribuídos em diferentes posições com o mesmo padrão (Nikolausz *et al.* 2005). Além disso, a distribuição de bandas referentes à mesma espécie em diferentes posições no gel pode dever-se à presença de *single-stranded* DNA (Jensen & Strauss 1993) e também tem sido bastante relatada em trabalhos de diversidade microbiana devido à formação de heteroduplex (Boutte *et al.* 2006, Jensen & Straus 1993, Muyzer & Smalla 1998, Nikolausz *et al.* 2005), que pode

ser formada pelo anelamento de produtos de PCR de diferentes organismos (Muyzer & Smalla 1998). Para verificar a formação de heteroduplex faz-se necessário o seqüenciamento bidirecional dos fragmentos obtidos em cada banda, mas neste trabalho foi realizado o seqüenciamento utilizando-se apenas o *primer forward* (968f). Contudo, uma vez que pelo menos uma banda de cada linha foi seqüenciada, a possível formação de heteroduplex não prejudicou a análise dos resultados.

5.2. *Diversidade, seletividade e interações bactérias associadas-A. spiroides.*

5.2.1. *Seletividade das bactérias que se aderem à cápsula*

Comparando-se os padrões de bandas dos géis de bactérias aderidas e do gel de bactérias livres é possível perceber a grande diferença na diversidade encontrada entre essas duas frações, evidenciando uma seleção das bactérias que se associam à cápsula de *A. spiroides*. Alguns trabalhos apontam diferenças na diversidade entre o bacterioplâncton livre e o aderido a cianobactérias ou agregados (DeLong *et al.* 1993, Riemann & Winding 2001, Eiler *et al.* 2006). Essa seletividade das bactérias aderidas a cianobactérias ou agregados pode dever-se à quimiotaxia que determina associações específicas entre cianobactérias e bactérias (Paerl & Gallucci 1985, Lupton & Marshall 1981), à quantidade e tipos de açúcares que podem servir de sítios de ligação para bactérias (Hori *et al.* 1996, Tien *et al.* 2005), à capacidade de metabolizar polissacarídeos de alta massa molecular (DeLong *et al.* 1993) e à produção de compostos antimicrobianos pela cianobactéria, uma vez que se sabe que *A. spiroides* produz compostos tóxicos a outras cianobactérias (Kaya *et al.* 2002) e bactérias (Kreitlow *et al.* 1999).

Em concordância com os argumentos acima apresentados, as curvas de crescimento da cianobactéria (clorofila e carbono – Figuras 6 e 7) e das bactérias aderidas (densidade e produção – Figuras 9 e 10) no experimento I, assim como seus tempos de duplicação calculados pela curva de clorofila e de densidade bacteriana, mostram que o início da fase exponencial de crescimento de *A. spiroides* não é acompanhado por aumento na densidade ou produção das bactérias aderidas que aumentam a partir do 20º dia. Além disso, há um aumento na densidade de bactérias livres a partir do 12º dia, mesmo sem um aumento da concentração de carbono orgânico maior do que 20µm (COB – Figura 7), que só ocorre a partir do 20º dia, mostrando que a inibição no crescimento ocorreu principalmente nas bactérias aderidas. As possíveis explicações para essa inibição seriam a produção de antibióticos pela cianobactéria ou pelas bactérias aderidas a *A. spiroides*.

5.2.2. Bactérias identificadas e sucessão das bactérias aderidas

Os estudos de bactérias associadas ao gênero *Anabaena*, que são direcionados principalmente àquelas aderidas aos heterocitos, citam: *Zoogloea* sp. *Pseudomonas* sp e Pseudomonadidos (Caldwell & Caldwell 1978, Lupton & Marshall 1981, Paerl & Gallucci 1985) cuja classificação foi baseada em características morfológicas e fisiológicas, e *Rhizobium* sp (Stevenson e Waterburry 2006) baseado em análises moleculares. No presente trabalho, dentre as bactérias aderidas não foram detectados os gêneros citados acima. Supõe-se que a comunidade bacteriana inoculada, o local de isolamento da cianobactéria e a espécie e/ou linhagem de *Anabaena* utilizada sejam os motivos principais desses resultados. Além disso, *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. foram encontrados associados aos heterocitos, e neste estudo foram observados poucos filamentos com heterocitos e apenas na fase final do experimento, uma vez que o meio de cultura utilizado contém elevada concentração de nitrato. A espécie *Zoogloea* sp,

citada acima, foi obtida por cultivo em meio sólido, que é mais seletivo do que os métodos de estudo de diversidade por análises genéticas, mas que pode também selecionar espécies mais raras, não detectadas pelas técnicas moleculares (Pedrós-Alió 2006).

Bactérias presentes no inóculo de A. spiroides e no início das culturas experimentais - Neste trabalho, a única bactéria identificada em nível de gênero foi uma *Rhodobacter* não cultivada, clone PSB-M-1 (Tabela 5), que pode realizar fotossíntese em condições de anaerobiose (Kerstens *et al.* 2006). O gênero *Rhodobacter* foi encontrado também associado a agregados da cianobactéria *Nodularia* sp. (Tuomainen *et al.* 2006). Esta espécie pertence ao grupo das bactérias púrpuras não-sulfurosas, subdivisão Alphaproteobacteria que tem ampla ocorrência em ambientes aquáticos (DeLong *et al.* 1993, Simon *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2007a, Grossart *et al.* 2008) e é encontrada com bastante frequência associada a florações de cianobactérias (Eiler *et al.* 2006, Kolmonen *et al.* 2004, Maruyama *et al.* 2003, Salomon *et al.* 2003, Stevenson e Waterbury 2006, Tuomainen *et al.* 2006).

Além de *Rhodobacter* sp. a espécie de bactéria não cultivada, clone Jul-eub3 (DQ363601) pertence também ao grupo das Alphaproteobacteria. A sequência de nucleotídeos obtida que apresentou similaridade a este clone, apresentou similaridade de 94% com os clones LIUU-11-267 e LIUU-1-169 (número de acesso no BLAST AY509420 e AY509419 respectivamente) que foram identificados em florações de cianobactérias (Eiler e Bertilsson 2004). Devido à grande diversidade metabólica do grupo (Kerstens *et al.* 2006) não é possível inferir possíveis papéis da associação deste clone com a cianobactéria. Esta Alphaproteobacteria foi detectada apenas na cultura 2 e nos dias 7 e 13, mas é possível que estivesse presente desde o início da cultura, uma vez

que também ocorreu no inóculo de *A. spiroides* e que não tenha sido detectada devido aos artefatos metodológicos discutidos anteriormente.

Outra espécie que ocorreu no inóculo da cianobactéria e esteve presente até o início da fase exponencial de crescimento foi a bactéria de solo não cultivada, clone 24 (AM168160), uma Acidobacteria. Este grupo é bastante comum em solo, mas poucas colônias foram isoladas, por isso, pouco se sabe sobre a fisiologia dessas bactérias (Janssen 2006, Lim *et al.* 2005). Ocorre também em ambientes de água doce (Barns *et al.* 1999), no entanto, existem poucos relatos de Acidobacteria associada a *blooms* de Cyanobacteria (Eiler e Bertilsson 2004, Eiler *et al.* 2006).

Bactérias provenientes do inóculo de Barra Bonita que sucederam aquelas presentes inicialmente - Uma bactéria não identificada, 32A₁, membro das Betaproteobacteria, ocorreu nos dias 7 e 13 da Réplica 2 do primeiro experimento e possivelmente em ambas as réplicas na fase de senescência. Esta classe de bactérias também é bastante comum em florações de cianobactérias, juntamente com as Alphaproteobacteria (Eiler *et al.* 2006, Kolmonen *et al.* 2004, Maruyama *et al.* 2003, Salomon *et al.* 2006, Tuomainen *et al.* 2006). Maruyama *et al.* (2003) relataram que as Betaproteobacteria foram o grupo dominante de bactérias aderidas às células de *Microcystis* durante um *bloom* dessa cianobactéria. Dentro desta classe encontra-se a espécie *Alcaligenes denitrificans* que causa lise e morte de *Microcystis* spp. (Manage *et al.* 2000), assim como espécies que não apresentam efeitos significativos sobre o crescimento de *Nodularia spumigena* (Salomon *et al.* 2003).

É possível que a bactéria 32A₁ ocorra também nas duas culturas durante a fase de senescência, no entanto é necessário realizar novamente o seqüenciamento dessas bandas nesta fase para confirmar tal fato, uma vez que as seqüências obtidas não eram de boa qualidade.

Membros dos grupos *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) e Gammaproteobacteria, que comumente acompanham *blooms* de cianobactérias ou encontram-se associados a elas (Eiler *et al.* 2006, Kolmonen *et al.* 2004, Maruyama *et al.* 2003, Salomon *et al.* 2003, Tuomainen *et al.* 2006), não foram detectados associados a *A. spiroides*. Contudo, foi identificada uma bactéria do grupo Firmicutes, provavelmente da ordem Lactobacillales que não havia sido encontrada ainda associada a Cyanobacteria. Entre os trabalhos citados acima apenas uma espécie de Firmicutes, da classe Clostridia ocorreu associada à cianobactéria *Gloeotrichia echinulata* (Eiler *et al.* 2006) e entre os estudos sobre efeitos de bactérias em cianobactérias, Reim *et al.* (1974) encontraram uma bactéria do gênero *Bacillus* (classe Bacilli, ordem Bacillales) com atividade cianobactericida. A bactéria do grupo Firmicutes, encontrada no presente trabalho, foi detectada apenas no final da fase de crescimento exponencial e na fase de senescência da cianobactéria.

Outras bactérias foram encontradas apenas no final da fase de crescimento exponencial e durante a fase estacionária/senescência em ambas as culturas, evidenciando uma mudança na comunidade bacteriana entre as fases de crescimento de *A. spiroides*. As demais bandas que ocorrem na fase de senescência são referentes à linhagem não identificada 11A₂ e à bactéria não cultivada clone CJRC133 (DQ202186), que é uma Deltaproteobacteria, provavelmente da ordem Myxococcales. Analisando o eletroferograma da seqüência 11A₂, supõe-se que a não identificação deveu-se, mais provavelmente, à mistura de duas espécies na mesma banda do gel, sendo necessária outra corrida de DGGE para verificar tal fato; ou pode tratar-se de uma nova espécie pertencente a uma divisão bacteriana ancestral, uma vez que na maioria das árvores construídas (utilizando diferentes métodos) ficou como um grupo externo às Eubacteria utilizadas.

Na literatura, registros de Deltaproteobacteria não são tão comuns em florações de cianobactérias, como são os de Alpha e Betaproteobacteria. Kolmonen *et al.* (2004) detectaram 2 espécies pertencentes à classe Deltaproteobacteria associadas a *bloom* de cianobactérias. Quando ocorrem associadas às Cyanobacteria, parecem estar vinculadas à lise das células por degradarem a camada de peptidoglicano, como descrito para *Microcystis* (Maruyama 2003). As Deltaproteobacteria da ordem Myxococcales são encontradas principalmente em solo e todas são capazes de degradar macromoléculas biológicas, além de usar ectoenzimas para lisar bactérias e leveduras (Dawid 2000). São conhecidas por produzirem compostos bioativos (Gerth *et al.* 2003) e há relatos de mixobactérias capazes de produzir lise celular em *Nostoc* sp. (Shilo 1970). É bastante provável, deste modo, que a presença desta Deltaproteobacteria nesta fase acelere a morte das células de *A. spiroides*.

A bactéria pertencente ao Filo Verrucomicrobia encontrada em material particulado no 35º dia, porém não aderida à cianobactéria, apresentou similaridade a 6 clones de Verrucomicrobia, entre eles, o clone Jo119-01 (número de acesso no BLAST AJ620838) encontrado por Kolmonen *et al.* (2004) no lago Joutikas (Finlândia) em *bloom* de cianobactérias. Neste mesmo trabalho os autores encontraram que o grupo Verrucomicrobia foi o mais abundante em dois anos de amostragens. Eiler & Bertilson (2004), Eiler *et al.* (2006) e Pope & Patel (2008) também encontraram Verrucomicrobia em florações de cianobactérias. Segundo Woese (2006) e Schlesner *et al.* (2006) embora o conhecimento sobre esse grupo seja limitado devido à existência de poucas linhagens isoladas a aplicação de técnicas de biologia molecular mostrou que este grupo tem ampla ocorrência em habitats aquáticos e terrestres e é claramente um grupo ecologicamente muito importante.

Os resultados mostraram uma sucessão das bactérias aderidas a *A. spiroides* com duas populações distintas: uma com as bactérias presentes no inóculo de *A. spiroides* que ocorreram até o 13º dia e outra na fase de senescência da cianobactéria. Diferenças na matéria orgânica excretada nas diferentes fases de desenvolvimento da cultura (Tien *et al.* 2005), assim como menor seletividade dos filamentos senescentes em relação aos saudáveis, devido, por exemplo, à menor produção de substâncias inibidoras (Suikkanen *et al.* 2004, Kreitlow *et al.* 1999) são possíveis explicações para tal observação. Além disso, interações entre as espécies de bactérias aderidas, como a produção de compostos antimicrobianos por essas bactérias, podem também explicar a sucessão, assim como a seletividade observada.

5.2.3. Interações bactérias- *A. spiroides*

É possível que as bactérias associadas a *A. spiroides* no início da cultura, presentes desde o inóculo, sejam benéficas para o seu crescimento, uma vez que, segundo revisão realizada por Paerl (1996), com poucas exceções, os gêneros de cianobactérias de água doce não axênicas apresentam taxas de crescimento maiores e são mais fáceis de serem mantidas em cultura do que as linhagens axênicas (*e.g.* Gibson e Smith 1982). Este fato explica também a grande dificuldade e as tentativas, sem resultados positivos, de obtenção de uma linhagem axênica durante a fase inicial deste trabalho (Anexo 1).

A hipótese de que essas associações sejam benéficas para a cianobactéria suporta-se ainda nas teorias evolutivas, como discutido por Giroldo (2003). É pouco provável que tal gasto energético na produção de EPS pelas cianobactérias seja uma característica neutra para o desenvolvimento e reprodução das espécies. Desta forma, a produção de EPS, principalmente na forma de CPS em *A. spiroides*, se não traz benefícios por meio das associações com as bactérias, deve trazer benefícios de outras

formas, de modo a superar o risco e o prejuízo causado pela colonização de bactérias com efeitos antagônicos à cianobactéria, como observado neste trabalho. No entanto, não foi possível verificar esse fato devido à falta de um controle axênico.

Apesar disso, os resultados do experimento II mostram efeitos negativos do inóculo de Barra Bonita no crescimento de *A. spiroides*. Uma vez que no experimento I ocorreram bactérias que potencialmente têm efeitos antagônicos às cianobactérias na fase de senescência de *A. spiroides* e que o número de bactérias aderidas aumentou principalmente no final da fase de crescimento exponencial da cianobactéria, possivelmente essas bactérias aceleram sua morte. Um resultado que nos permite ainda inferir sobre o efeito antagônico das bactérias sobre a cianobactéria é que o crescimento exponencial das bactérias aderidas se inicia entre os dias 20 e 29 e em uma taxa muito superior ao das bactérias livres e culmina com o início da fase estacionária/senescência das culturas. Uma vez que esse período corresponde também à mudança na diversidade das bactérias aderidas, é bastante provável que parte das bactérias livres tenham passado à fração aderida.

No entanto, a adesão das bactérias pode ter ocorrido devido à senescência e morte da cianobactéria, acelerada por outro fator que não a interação com as bactérias. Simon & Tilzer (1982) encontraram baixa densidade de bactérias aderidas durante um *bloom* fitoplanctônico no lago Constance, sendo que após a morte do fitoplâncton e a degradação da matéria orgânica dissolvida lábil, as bactérias começaram a se aderir às partículas, sugerindo que células algais saudáveis são menos susceptíveis à adesão de bactérias.

Além das bactérias associadas à cápsula de *A. spiroides*, a matéria orgânica excretada pela cianobactéria e liberada para o meio suporta uma alta densidade e grande diversidade de bactérias livres, que provavelmente também desempenham papéis

importantes para o crescimento da cianobactéria, como regeneração de nutrientes, mas também antagônicos a ela. Embora Bershova *et al.* (1968 *apud* Paerl 1982) tenham encontrado que várias linhagens de bactérias isoladas de lagos que continham cianobactérias apresentavam capacidades antagônicas, enquanto aquelas isoladas da mucilagem da cianobactéria apresentavam pouca tendência antagônica, alguns trabalhos relatam a necessidade de contato direto da bactéria à cianobactéria para que ocorra a lise celular (Shilo 1970, Manage *et al.* 2000). As divergências entre esses estudos podem dever-se à fase do ciclo de vida da cianobactéria em que as bactérias foram isoladas, uma vez que, baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, as bactérias aderidas a *A. spiroides* que poderiam ser isoladas seriam diferentes em diferentes fases da cultura (ou do *bloom*), alterando desta forma, seus efeitos potenciais sobre a cianobactéria.

Apesar dos vários relatos de linhagens de bactérias com efeitos antagônicos diretos à cianobactérias, existe uma complicação em interpretar essas relações antagônicas, principalmente tratando-se de culturas do tipo *batch* acompanhadas por longos períodos, uma vez que, segundo Paerl (1982) há dificuldade em diferenciar o ataque bacteriano direto (lise) da competição bacteriana por nutrientes e fatores de crescimento como a causa da morte da cianobactéria.

Juntamente à ação das bactérias, a presença potencial de cianófagos pode também explicar as diferenças encontradas entre as curvas de crescimento das culturas controle e inoculadas com amostras de Barra Bonita, obtidas no experimento II. No entanto, não é possível inferir sobre o efeito desses vírus a partir dos resultados obtidos, uma vez que no controle não foi inoculada uma fração da água de Barra Bonita menor do que 0,22 μ m, e o tempo de ação do vírus, as taxas de infecção e lise das cianobactérias parecem depender de muitos fatores, como densidade de células,

densidade de partículas virais, tipo de vírus, e quantidade de partículas nas quais os vírus podem ficar adsorvidos e, portanto, inócuos (Padan & Shilo 1973, Manage *et al.* 1999, Suttle 2000)

5.3. Produção bacteriana e influência dos NFHs na comunidade bacteriana (Experimento I)

A manutenção da similaridade de réplicas de culturas que contam com a interação de diferentes populações de microrganismos torna-se bastante complexa por longos períodos. Embora não muito relevantes, as diferenças observadas entre as réplicas do experimento 1 podem dever-se a vários fatores, um deles, possivelmente, é a presença de maior número de NFHs na réplica 1, principalmente a partir do 20º dia de cultivo, e maior biovolume médio dos NFHs nessa réplica. Sabe-se que os flagelados são importantes predadores do bacterioplâncton, controlando as densidades bacterianas nos ambientes aquáticos e assim, atuando significativamente na regeneração de nutrientes (*e.g.* Azam *et al.* 1983, Porter *et al.* 1985, Boenigk e Arndt 2002, Pernthaler 2005).

A predação por NFHs explica também, em parte, os valores menores de biomassa bacteriana do que o esperado pelos altos valores de produção encontrados em ambas as culturas. Outro importante fator para o controle da produção bacteriana em ambientes aquáticos é a lise causada pelo ataque de vírus (Weinbauer & Höfle 1998, Zhang *et al.* 2007a), no entanto, não temos dados sobre bacteriófagos neste trabalho. No caso das bactérias aderidas, além da predação por NFHs e o possível ataque de bacteriófagos, o desprendimento das células bacterianas para o meio também pode ser responsável por essa diferença (Worm e Søndergaard 1998).

Os valores de produção, assim como as densidades obtidas para bactérias livres foram maiores do que aqueles obtidos para as aderidas. Contudo, com relação à produção por célula não foram encontradas diferenças significativas entre aderidas e livres, o que indica que não há diferenças significativas na taxa de crescimento entre as bactérias dessas duas frações. Isso se deve provavelmente ao fato de que na cultura não há limitação de nutrientes para as bactérias livres, o que é normalmente sugerido como um dos fatores responsáveis pela menor produção destas em relação às bactérias aderidas no ambiente (Azam *et al.* 1993, Regali-Selegim 2001). Alldredge *et al.* (1986) também não encontraram diferenças na produção entre células bacterianas livres e aderidas a agregados marinhos, quando ocorreram diferenças, a incorporação de timidina foi maior para as livres.

Entre as bactérias livres, a densidade foi bastante alta mesmo em baixas concentrações de COB (fração do carbono orgânico menor do que 20 μ m), por exemplo, 3mg de C/L até o 20º dia de cultivo, foi capaz de suportar o crescimento, em média, de $1,23 \times 10^7$ bactérias/mL (e de $3,95 \times 10^3$ flagelados/mL), que em ambiente natural seriam consumidos por níveis tróficos superiores, o que demonstra a importância da excreção desses carboidratos para a rede trófica microbiana nesses sistemas.

Paerl (1992) relata que há uma grande variedade de protozoários colonizadores em agregados e colônias durante os períodos de crescimento máximo de algumas cianobactérias (*Microcystis*, *Gloeotrichia* e *Anabaena*) e que na maioria dos casos, esses protozoários parecem consumir exaustivamente as bactérias epibiontes. No entanto, ao estimarmos o consumo de biomassa bacteriana (dados não apresentados) assumindo uma taxa de predação por nanoflagelados para bactérias aderidas de 15 células.flagelado⁻¹.hora⁻¹ para agregados saturados de bactérias (Kjørboe *et al.* 2003) e uma taxa de filtração para bactérias livres de 10⁵ unidades de volume celular do NFH

por hora (Boenigk & Arndt 2000, Boenigk & Arndt 2002) que considera a densidade de bactérias e o biovolume dos flagelados nas culturas, os resultados revelam que o impacto da predação sobre as bactérias aderidas é significativamente menor do que sobre as bactérias livres no presente trabalho. Artolozaga *et al.* (2002) mostraram que há menor influência da predação de NFHs sobre bactérias aderidas do que sobre as bactérias livres.

Além disso, a menor influência dos NFHs sobre as bactérias aderidas pode ser apoiada pelos dados de densidade bacteriana, uma vez que as diferenças entre as réplicas foram menores entre as aderidas do que entre as livres e pelos dados de mudanças morfológicas, apresentados nos gráficos de morfotipos e separação das bactérias por classes de tamanho (seções 4.1.3 e 4.1.4). Entre as várias mudanças fenotípicas nas populações bacterianas submetidas à predação por flagelados é freqüente a redução e/ou aumento no tamanho das células (Pernthaler 2005, Hahn *et al.* 1999, Hahn & Höfle 1999) levando a uma seleção disruptiva, ou seja, com fenótipos extremos.

Os dados mostram ainda a maior influência dos flagelados na réplica 1, com aumento da freqüência de bactérias livres filamentosas, característica observada por Hahn *et al.* (1999) em bactérias sob predação por flagelados, e com diminuição na freqüência das classes de tamanho intermediário (Pernthaler *et al.* 1996). Pernthaler *et al.* (1996) sugeriram que as bactérias com comprimento menor do que 0,4 μ m são fracamente afetadas pela predação de protistas, enquanto que bactérias entre 0,4 e 1,6 μ m de comprimento são vulneráveis, entre 1,6 e 2,4 μ m são suprimidas e as maiores do que 2,4 μ m são resistentes à predação por protistas. Essa seleção disruptiva ficou evidente apenas entre as bactérias livres da réplica 1 (Figura 15), na qual pôde ser observado também que há diferenças na predação das bactérias dentro da classe de

comprimento de 0,4 a 1,6 μ m proposta por Pernthaler *et al.* (1996). Na réplica 1 as bactérias de tamanho entre 1,2 e 1,6 μ m tiveram menor frequência ao final do experimento, enquanto a frequência das bactérias entre 0,4 e 1,2 μ m aumentou.

Na cultura 2 as diferenças nos tamanhos ao longo tempo foram mais discretas do que na cultura 1, possivelmente devido à menor densidade de flagelados e menor biovolume destes, mas as bactérias podem ter também usado de outros mecanismos de proteção contra a predação dos NFHs, como mudança nos padrões de mobilidade, excreção de compostos tóxicos (Pernthaler 2005) que não puderam ser detectados neste trabalho.

Apesar das diferenças entre as réplicas nas curvas produção e biomassa bacterianas e das diferenças nos morfotipos e tamanhos (comprimento) das bactérias, não houve diferenças significativas na diversidade das bactérias associadas à cápsula de *A. spiroides* entre as duas réplicas. Ocorreram apenas diferenças pontuais, ou seja, quando comparadas amostras do mesmo dia, mas não quando comparadas as fases de crescimento da cianobactéria. Desta forma, se a presença desses predadores alterou quantitativamente a diversidade bacteriana (Jürgens & Matz 2002), isso ocorreu de forma semelhante nas duas culturas.

6. Conclusões

A partir do *pool* de bactérias presentes na cultura há uma seleção das bactérias que se associam à cápsula de *A. spiroides*, uma vez que foi observado menor número de espécies entre as bactérias aderidas do que entre as livres. Além disso, ocorreu uma sucessão das bactérias aderidas, com mudança da comunidade bacteriana no final da fase de crescimento exponencial e início da fase de senescência das culturas de *A. spiroides*.

Em relação à produção bacteriana por célula, não houve diferenças significativas entre bactérias livres e aderidas em cultura, possivelmente devido à alta concentração de nutrientes disponível nas duas frações (livre e aderida).

A fração menor do que 1,2 μ m da água de Barra Bonita (ou seja, o inóculo bacteriano, que possivelmente inclui cianófagos), acelera a morte da cultura de *A. spiroides*. O efeito do inóculo é mais rápido quando este é adicionado em culturas na fase estacionária de crescimento do que no início do cultivo, mostrando maior susceptibilidade de células mais velhas.

7. Referências bibliográficas

- ALLDREDGE AL, COLE JJ, CARON DA (1986) Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnol Oceanogr* 31:68-78
- ANTÔNIO S (2006) Produção primária com ênfase na excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas naturais do reservatório de Barra Bonita, SP. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 110 p.
- ARTOLOZAGA I, VALCARCEL M, AYO B, LATATU A, IRIBERRI J (2002) Grazing rates of bacterivorous protists inhabiting diverse marine planktonic microenvironments. *Limnol Oceanogr* 47:142-150
- AZAM F, FENCHEL T, FIELD JG, GRAY JS, MEYER-REIL L-A, THINGSTAD F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257-263
- AZAM F, SMITH DC, STEWARD GF, HANGSTRM A (1993) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb Ecol* 28:167-179
- BARNS SM, TAKALA SL, KUSKE CR (1999) Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom Acidobacterium in the environment. *Appl Environ Microbiol* 65: 1731–1737
- BITTAR, TB (2005) Produção de TEP (Transparent Exopolymer Particles) em culturas de três espécies de microalgas isoladas do reservatório de Barra Bonita (Rio Tiete/SP). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 87 p.
- BOENIGK J, ARNDT H (2000) Comparative studies on the feeding behavior of two heterotrophic nanoflagellates: the filter-feeding choanoflagellate *Monosiga ovata* and the raptorial-feeding kinetoplastid *Rhynchomonas nasuta*. *Aquat Microb Ecol* 22:243-249
- BOENIGK J, ARNDT H (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* 81 465-480
- BOUTTE C, GRUBISIC S, BALTHASART P, WILMOTTE A (2006) Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J Microbiol Meth* 65:542-550
- CALDWELL DE, CALDWELL SJ (1978) A *Zoogloea* sp. associated with blooms of *Anabaena flos-aquae*. *Can J Microbiol* 24:922-931
- CHORUS I, BARTRAM J (1999) Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. London, E & FN Spon on behalf of WHO, p. 416.
- COLOMBO V (2006) Polissacarídeos Extracelulares e atividade enzimática das glicosidases no reservatório de Barra Bonita, SP, Brasil. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 103p.

- COLOMBO V, VIEIRA AAH, MORAES G (2004) Activity of glycosidases from freshwater heterotrophic microorganisms on the degradation of extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). *Braz J Microbiol* 35:110-116
- DAWID W (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev* 24:403-427
- DELLAMANO-OLIVEIRA MJ, COLOMBO-CORBI V, VIEIRA AAH (2007) Carboidratos dissolvidos do reservatório de Barra Bonita (Estado de São Paulo, Brasil) e sua relação com as algas fitoplanctônicas abundantes. *Biota Neotropica* 7:59-66
- DELONG EF, FRANKS DG, ALLDREDGE AL (1993) Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. free-living marine bacterial assemblages. *Limnol Oceanogr* 38:924-934
- EILER A, BERTILSSON S (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ Microbiol* 6:1228-1243
- EILER A, OLSSON JA, BERTILSSON S (2006) Diurnal variations in the auto- and heterotrophic activity of cyanobacterial phycospheres (*Gloeotrichia echinulata*) and the identity of attached bacteria. *Freshw Biol* 51:298-311
- FUHRMAN JA, AZAM F (1980) Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica, and California. *Appl Environ Microbiol* 39:1085-1095
- GERTH K, PRADELLA S, PERLOVA O, BEYER S, MÜLLER R (2003) Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotech* 106:233-253
- GIBSON CE, SMITH RV (1982) Freshwater plankton. In: Carr NG, Whitton BA (Eds) *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.463-489
- GIROLDO D (2003) Especificidade em associações alga/bactéria vinculadas aos carboidratos excretados por três espécies fitoplanctônicas de um reservatório tropical eutrófico do estado de São Paulo (Barra Bonita). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 152 pp
- GORHAM PR, MCLACHLAN J, HAMMER UT, KIM WK (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. *Verh Int Verein Theor Angew Limnol* 15:796-804
- GROSSART H-P, JEZBERA J, HORŇÁK K, HUTALLE KML, BUCK U, ŠIMEK K (2008) Top-down and bottom-up induced shifts in bacterial abundance, production and community composition in an experimentally divided humic lake. *Environ Microbiol* 10:635-652

- HAHN MW, HOFLE MG (1999) Flagellate Predation on a Bacterial Model Community: Interplay of Size-Selective Grazing, Specific Bacterial Cell Size, and Bacterial Community Composition. *Appl Environ Microb* 65:4863-4872
- HAHN MW, MOORE ERB, HOFLE MG (1999) Bacterial Filament Formation, a Defense Mechanism against Flagellate Grazing, Is Growth Rate Controlled in Bacteria of Different Phyla. *Appl Environ Microb* 65:25
- HALL TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- HEUER H, KRSEK M, BAKER P, SMALLA K, WELLINGTON EMH (1997) Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16s rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microb* 63:3233-3241
- HORI K, OGATA T, KAMIYA H, MIMURO M (1996) lectin-like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins. *J Phycol* 32:783-790
- JANSSEN PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microb* 72:1719-1728
- JENSEN MA, STRAUS N (1993) Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *Genome Res.* 3:186
- JÜRGENS K, MATZ C (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:413-434
- KAPUSTINA LL (2006) Experimental study of *Microcystis*-associated and free-living bacteria. *Microbiology* 75:606-610
- KAYA K, MAHAKHANT A, KEOVARA L, SANO T, KUBO T, TAKAGI H (2002) Spiroidesin, a novel lipopeptide from the cyanobacterium *Anabaena spiroides* that inhibits cell growth of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J Nat Prod* 65:920-921
- KERSTERS K, VOS PD, GILLIS M, SWINGS J, VANDAMME P, STACKEBRANDT E (2006) Introduction to the Proteobacteria. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Eds) *The Prokaryotes*, vol. 5, Springer Science, New York, pp 3-37.
- KIM JD, LEE CG (2006) Characterization of two algal lytic bacteria associated with management of the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Biotechnol Bioproc E* 11:382-390
- KIØRBOE T, TANG K, GROSSART HP, PLOUG H (2003) Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: Colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl Environ Microb* 69:3036-3047

- KOLMONEN E, SIVONEN K, RAPALA J, HAUKKA K (2004) Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland. *Aquat Microb Ecol* 36:201–211
- KREITLOW S, MUNDT S, LINDEQUIST U (1999) Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances. *J Biotechnol* 70:61-63
- LIM HK, CHUNG EJ, KIM JC, CHOI GJ, JANG KS, CHUNG YR, CHO KY, LEE SW (2005) Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microb* 71:7768
- LIS JT, SCHLEIF R (1975) Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res* 2:383-389
- LORENZEN CJ (1967) Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol Oceanogr* 12:343-346
- LUPTON FS, MARSHALL KC (1981) Specific adhesion of bacteria to heterocysts of *Anabaena* spp and its ecological significance. *Appl Environ Microb* 42:1085-1092
- MANAGE PM, KAWABATA Z, NAKANO S (1999) Seasonal changes in densities of cyanophage infectious to *Microcystis aeruginosa* in a hypereutrophic pond. *Hydrobiologia* 411:211-216
- MANAGE PM, KAWABATA Z, NAKANO S (2000) Algicidal effect of the bacterium *Alcaligenes denitrificans* on *Microcystis* spp. *Aquat Microb Ecol* 22:111-117
- MARKER AFH, NUSCH EA, RAI H, RIEMANN B (1980) The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch Hydrobiol Beih* 14:91-106
- MARUYAMA T, KATO K, YOKOYAMA A, TANAKA T, HIRAISHI A, PARK HD (2003) Dynamics of microcystin-degrading bacteria in mucilage of *Microcystis*. *Microb Ecol* 46:279-288
- MATSUMURA-TUNDISI T, TUNDISI JG (2005) Plankton richness in a eutrophic reservoir (Barra Bonita Reservoir, SP, Brazil). *Hydrobiologia* 542:367-378
- MUYZER G, DEWAAL EC, UITTERLINDEN AG (1993) Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. *Appl Environ Microb* 59:695-700
- MUYZER G, SMALLA K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127–141
- MYKLESTAD SM (1995) Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci Total Environ* 165:155-164

- NAGATA T, WATANABE Y (1990) Carbon-to-volume and nitrogen-to-volume ratios of bacterioplankton grown under different nutritional conditions. *Appl Environ Microb* 56:1303-1309
- NIKOLAUSZ M, SIPOS R, REVESZ S, SZEKELY A, MARIALIGETI K (2005) Observation of bias associated with re-amplification of DNA isolated from denaturing gradient gels. *FEMS Microbiol Lett* 244:385-390
- NUSCH EA (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Arch Hydrobiol Beih* 14:14-36
- OLIVEIRA VM, FANTINATTI F, MANFIO G P, DESTÉFANO SAL, PIZA FF (2000) Métodos moleculares para a caracterização de diversidade microbiana. Apostila Teórica de curso de treinamento, Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil.
- PADAN E, SHILO M (1973) Cyanophages-viruses attacking blue-green algae. *Bacteriological Rev* 37:343
- PAERL HW (1977) Specific association of the bluegreen algae *Anabaena* and *Aphanizomenon* with bacteria in freshwater blooms. *J Phycol* 12:431-435
- PAERL HW (1982) Interactions with bacteria. In: Carr NG, Whitton BA (Eds) *The Biology of Cyanobacteria*, vol. 19, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 441-461.
- PAERL HW (1985) Microzone formation: its role in the enhancement of aquatic N₂ fixation. *Limnol Oceanogr* 30:1246-1252
- PAERL HW (1992) Epi-and endobiotic interactions of cyanobacteria. In: Reisser W (ed) *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Biopress, England, pp 537-565.
- PAERL HW (1996) Microscale Physiological and Ecological Studies of Aquatic Cyanobacteria: Macroscale Implications. *Microscopy Research and Technique* 33:47-72
- PAERL HW, GALLUCCI KK (1985) Role of chemotaxis in establishing a specific nitrogen-fixing cyanobacterial-bacterial association. *Science* 227:647-649
- PAERL HW, KELLAR PE (1978) Significance of bacterial *Anabaena* (Cyanophyceae) associations with respect to N₂ fixation in freshwater. *J Phycol* 14:254-260
- PEDRÓS-ALIÓ C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* 14:257-263
- PERNTHALER J (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol* 3:537-546
- PERNTHALER J, SATTLER B, SIMEK K, SCHWARZENBACHER A, PSENNER R (1996) Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquat Microb Ecol* 10:255-263

- POPE PB, PATEL BKC (2008) Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 9–27
- PORTER KG, FEIG YS (1980) The use of Dapi for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943-948
- PORTER KG, SHERR EB, SHERR BF, PACE M, SANDERS RW (1985) Protozoa in planktonic food webs. *J Protozool* 32:409-415
- RACY F, GODINHO MJ, REGALI-SELEGHIM MH, BOSSOLAN NRS, FERRARI AC, LUCCA JV (2005) Assessment of the applicability of morphological and size diversity indices to bacterial populations of reservoirs in different trophic states. *Acta Limnol Bras* 17:395-408
- REGALI-SELEGHIM MH (2001) Rede Trófica Microbiana em um Sistema Eutrófico Raso (Reservatório do Monjolinho - São Carlos-SP): Estrutura e Função. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 92 p.
- REIM RL, SHANE MS, CANNON RE (1974) The characterization of a *Bacillus* capable of blue-green bactericidal activity. *Can J Microbiol* 20:981-986
- RIEMANN L, WINDING A (2001) Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microb Ecol* 42:274-285
- SALOMON PS, JANSON S, GRANALI E (2003) Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae* 2:261-272
- SCHLESNER H, JENKINS C, STALEY JT (2006) The Phylum Verrucomicrobia: A Phylogenetically Heterogeneous Bacterial Group. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Eds) *The Prokaryotes*, vol. 7, Springer Science, New York, pp 881–896.
- SHILO M (1970) Lysis of blue-green algae by myxobacter. *J Bacteriol* 104:453-461
- SIGEE DC, GLENN R, ANDREWS MJ, BELLINGER EG, BUTLER RD, EPTON HAS, HENDRY RD (1999) Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiologia* 395:161-172
- SIMON M, GROSSART HP, SCHWEITZER B, PLOUG H (2002) Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat Microb Ecol* 28:175-211
- SIMON M, TILZER MM (1982) Bacterial decay of the autumnal phytoplankton in Lake Constance (Bodensee). *Schweiz. Z. Hydrol.* 44:263-275
- STACKEBRANDT E, GOEBEL BM (1994) A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s Ribosomal-RNA Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849
- STEVENSON BS, WATERBURY JB (2006) Isolation and identification of an epibiotic bacterium associated with heterocystous *Anabaena* cells. *Biol Bull* 210:73-77.

- SUIKKANEN S, FISTAROL GO, GRANÉLI E (2004) Allelopathic effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermannii* on algal monocultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 308:85-101
- SUN J, LIU D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J Plankton Res* 25:1331-1346
- SUTTLE CA (2000) Cyanophages and Their Role in the Ecology of Cyanobacteria. In Whitton BA, Potts M (Eds) *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 563–589
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- TIEN CJ, SIGEE DC, WHITE KN (2005) Characterization of surface sugars on algal cells with fluorescein isothiocyanate-conjugated lectins. *Protoplasma* 225:225-233
- TUOMAINEN J, HIETANEN S, KUPARINEN J, MARTIKAINEN PJ, SERVOMAA K (2006) Community structure of the bacteria associated with *Nodularia* sp (cyanobacteria) aggregates in the Baltic Sea. *Microb Ecol* 52:513-522
- WEINBAUER MG, HOFLE MG (1998) Significance of Viral Lysis and Flagellate Grazing as Factors Controlling Bacterioplankton Production in a Eutrophic Lake. *Appl Environ Microb* 64:431
- WEISSE T (1997) Growth and production of heterotrophic nanoflagellates in a meso-eutrophic lake. *J Plankton Res* 19:703-722
- WERNER, V.R (2002) Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagoas da planície costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 363p.
- WETZEL RG, LIKENS GE (1991) *Limnological analysis*. Springer-Verlag, New York.
- WOESE CR (2006) How We Do, Don't and Should Look at Bacteria and Bacteriology. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Eds) *The Prokaryotes*, vol. 1, Springer Science, New York, pp 3–23.
- WORM J, SØNDERGAARD M (1998) Dynamics of heterotrophic bacteria attached to *Microcystis* spp. (Cyanobacteria). *Aquat Microb Ecol* 14:19-28
- ZHANG R, LIU BZ, LAU SCK, KI JS, QIAN PY (2007a) Particle-attached and free-living bacterial communities in a contrasting marine environment: Victoria Harbor, Hong Kong. *FEMS Microbiol Ecol* 61:496-508
- ZHANG R, WEINBAUER MG, QIAN PY (2007b) Viruses and flagellates sustain apparent richness and reduce biomass accumulation of bacterioplankton in coastal marine waters. *Environ Microbiol* 9:3008-3018

ANEXO 1. Tentativas de axenização de *A. spiroides*

Foram realizadas quatro tentativas de axenização de *A. spiroides*, no entanto, não obtivemos o resultado esperado. Foram testados os seguintes métodos:

A. Obtenção de acinetos por sonificação (35 minutos) e congelamento dos filamentos, múltiplas lavagens por centrifugação e exposição das células lavadas à solução de Dakin (1mL para 40 mL de cultura) em diferentes tempos (1, 12, 15 e 17 minutos). Não foi observado crescimento após a inoculação de frações das suspensões dos acinetos em tubos de ensaio com meio de cultura.

B. Isolamento de células vegetativas após leve sonificação (2 minutos) para retirada da cápsula seguida de lavagens por centrifugação. Foram isolados 30 células/fragmentos de filamentos em 30 tubos com meio ASM-1, apenas 3 cresceram, não axênicos. Foram feitas lâminas utilizando coloração de Gram com as bactérias livres no meio e foram identificadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

C. Utilização de antibiótico para bactérias Gram-positivas. As células foram lavadas por centrifugação, inoculadas em tubos com diferentes concentrações do antibiótico despacilina (16; 7,25; 3,8; 2 e 0,05 U/mL). Não foi observado crescimento de *A. spiroides*.

D. Isolamento de colônias em meio sólido (ASM1 + Tris pH 7,0 com 1,5% de Agar). A partir de células lavadas por centrifugação, foram feitas várias diluições em tubos de ensaio. Uma pequena alíquota foi inoculada e espalhada sobre meio em placa de Petri. Não houve crescimento de colônias de *A. spiroides*.

ANEXO 2. Purificação do DNA com Polietilenoglicol (PEG) 8000 para seqüenciamento (Dr. Iderval da Silva Junior Sobrinho, comunicação pessoal).

Solução de PEG : 20% de Polietilenoglicol 8000 e NaCl com concentração final de 1M

Precipitação do DNA

1. Acrescentar igual volume de solução de PEG e amostra. *Homogeneizar imediatamente.*
2. Levar a banho-maria por 37-40°C por 15 minutos.
3. Centrifugar a 16000 xg por 15 minutos.

Lavagem do material

4. Retirar o sobrenadante com uma pipeta. Descartar o sobrenadante.
Obs.: cuidado para não tocar o fundo ou as laterais do tubo. Retirar lentamente.
5. Adicionar *lentamente*, escorrendo pela parede do tubo, 125 µL de etanol 80% gelado.
6. Centrifugar a 16000 xg por 2 minutos
7. Retirar lentamente o sobrenadante com uma pipeta. Descartar o sobrenadante.
Obs.: mesmos cuidados tomados no passo 4.
8. Repetir passos 5 a 7.
Nota: no último passo (retirada do sobrenadante) deixar aproximadamente 5-10 µL do sobrenadante (etanol 80%), pois neste ponto o precipitado está mais solto.

Secagem

9. Secar em estufa a 37°C por aproximadamente 30 minutos à 1 hora. Olhar periodicamente para não deixar os tubos secarem em excesso. Ou
- 9'. Secar em banho-maria aberto a 50°C por 5 minutos.
10. Adicionar água ou tampão. Sugestão 12 a 20 µL.